

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Mestrado em Medicina Tropical

**Diferentes genótipos do locus da Proteína de Superfície de Merozoíto 1(MSP-1)  
de *Plasmodium falciparum*: uma contribuição ao estudo da infecção plasmodial  
assintomática no município de Barcelos, Amazonas.**

Ana Paula de Barros Silva

Rio de Janeiro  
2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz  
Pós Graduação em Medicina Tropical

Ana Paula de Barros Silva

**Diferentes genótipos do locus da Proteína de Superfície de Merozoíto 1 (MSP1)  
de *Plasmodium falciparum*: uma contribuição ao estudo da infecção plasmodial  
assintomática no município de Barcelos, Amazonas.**

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

Orientadora: Dra. Martha Cecília Suárez-Mutis

Rio de Janeiro

2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Pós Graduação em Medicina Tropical

Autora: Ana Paula de Barros Silva

**Diferentes genótipos do locus da Proteína de Superfície de Merozoíto 1 (MSP1)  
do *Plasmodium falciparum*: uma contribuição ao estudo da infecção plasmódial  
assintomática no município de Barcelos, Amazonas.**

Orientadora: Dra. Martha Cecília Suárez-Mutis

Aprovada em: 14/12/2012

Banca Examinadora

Dra. Patrícia Cuervo Escobar

Dra. Ana Acácia Pinheiro Caruso Neves

Dra. Lilian Rose Pratt Riccio

Suplentes

Dra. Simone da Silva Santos

Dr. Filipe Anibal de Carvalho

Rio de Janeiro, 14 de dezembro de 2012

Banca Examinadora

---

Dra. Patrícia Cuervo Escobar

---

Dra. Ana Acácia Pinheiro Caruso Neves

---

Dra. Lilian Rose Pratt Riccio

Suplentes

---

Dra. Simone da Silva Santos

---

Dr. Filipe Anibal de Carvalho

Rio de Janeiro, 14 de dezembro de 2012

*À minha família;  
Ao meu esposo e meus filhos;  
Aos meus mestres.*

## **Agradecimentos**

A Deus por me dar forças e coragem para prosseguir.

À minha mãe, Dalva e meu padraсто Lázaro e sua família por me apoiarem sempre.

Ao meu esposo Diego e meus filhos Breno e Danilo por me alegrarem e me ajudarem sempre nos momentos difíceis.

Aos meus sogros, Dona Ana e Seu Altamir e todos os meus cunhados e sobrinhos, por me acolherem em sua família.

Às minhas avós Ivone e Julia, por me incentivarem e sempre orarem por mim.

Aos meus tios e primos pelo apoio.

À minha orientadora, Dra Martha, pela sua amizade, ensinamentos e imensa paciência para comigo.

À Simone Santos pela ajuda nos trabalhos de laboratório e pela revisão da dissertação.

À Jéssica pela ajuda com os experimentos.

À Renata, Vivian, Carla, Juliana e Grazi pela convivência.

Ao Dr. Adeilton Brandão por permitir a realização dos experimentos em seu laboratório.

Ao meu amigo Franklyn Samúdio, pela sua amizade, seus conselhos e momentos de descontração.

Aos amigos e colegas do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas: Tainah, Mariangela, Aline, Bill, Ícaro, Maria, Myllena, Juliana, Priscila e Dário.

Ao professor José Rodrigues Coura, por me acolher em seu laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias: Ângela, Cristina, Carlos José, Vanessa, Laura e Celeste.

Aos meus amigos da UFRRJ: Cristiane, Juan, Nete, Thiago, Adriane, e todos do GOU Renascer; e aos meus amigos do Coral da Rural pela amizade e pelos bons momentos que compartilhamos.

A todos os voluntários de Barcelos, que participaram deste estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

## Sumário

1) INTRODUÇÃO.....	1
2) MARCO TEÓRICO.....	3
2.1) A Malária no Brasil e no mundo.....	3
2.2) Agentes etiológicos e vetores.....	4
2.3) Ciclo de vida do <i>Plasmodium sp.</i> .....	5
2.4) Sintomas da malária.....	7
2.5) Diagnóstico.....	9
2.6) Tratamento.....	11
2.7) Classificação epidemiológica.....	13
2.7.1) Intensidade da Transmissão.....	13
2.7.2) Estabilidade da Transmissão.....	14
2.7.3) Estratificação Epidemiológica de Risco.....	15
2.8) Infecção assintomática.....	15
2.9) Malária no município de Barcelos.....	16
2.10) Estudo da diversidade genética de <i>Plasmodium sp.</i> .....	17
2.10.1) Proteína de Superfície de Merozoíto 1 – MSP1.....	20
3). OBJETIVO GERAL.....	23
3.1) Objetivos específicos.....	23
4) JUSTIFICATIVA.....	24
5) MATERIAL E MÉTODOS.....	25
5.1) Área de estudo.....	25
5.2) Desenho do estudo.....	26
5.3) Definição de casos.....	27
5.3.1) Caso de malária por <i>P. falciparum</i> .....	27
5.3.2) Caso de infecção assintomática.....	28
5.4) Métodos de coleta de amostras.....	28
5.5) Extração de DNA.....	28
5.6) PCR diagnóstico para <i>Plasmodium sp.</i> .....	29
5.7) Genotipagem do MSP-1.....	32
5.8) Análise estatística.....	35
5.9) Aspectos éticos.....	36

6) RESULTADOS.....	37
6.1) Aspectos demográficos.....	37
6.2) Antecedentes de malária.....	43
6.3) Status clínico.....	45
6.4) Genotipagem do gene MSP1.....	48
6.4.1) Análise da diversidade genética.....	48
6.4.2) Multiplicidade da infecção.....	60
7) DISCUSSÃO.....	64
7.1) Diversidade genética do parasito.....	64
7.2) Multiplicidade da infecção.....	66
7.3) Limitações.....	71
8) CONCLUSÕES.....	72
9) PERSPECTIVAS.....	72
10) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
11) ANEXOS.....	88
Anexo 1) Questionário domiciliar.....	88
Anexo 2) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	89
Anexo 3) Parecer do Comitê de Ética.....	90

## Lista de figuras

2.1) Distribuição da malária no Mundo.....	3
2.2) Classificação das áreas de risco para malária segundo incidência parasitária anual (IPA).....	4
2.3) Ciclo de vida do <i>Plasmodium sp.</i> .....	7
2.4) Determinantes para o desfecho clínico da malária.....	9
2.5) Formas sanguíneas de <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> e <i>P. malariae</i> respectivamente visualizadas em lâminas de gota espessa.....	10
2.6) Diagnóstico imunológico da malária através de teste imunocromatográfico.....	11
2.7) Esquema representativo do gene MSP1.....	21
5.1) Mapa do Estado do Amazonas com destaque para o município de Barcelos (amarelo).....	26
6.1) Média da idade dos indivíduos infectados pelo <i>P. falciparum</i> segundo sexo.....	38
6.2) Média de episódios prévios de malária em todos os indivíduos estudados segundo o gênero.....	44
6.3) Número de episódios prévios x idade dos indivíduos.....	45
6.4) Número de episódios prévios x idade em portadores de malária clínica.....	47
6.5) Correlação entre número de episódios prévios de malária e a idade entre os indivíduos com infecção assintomática.....	47
6.6a) Genótipos isolados de amostras de indivíduos infectados com <i>P. falciparum</i> visualizados em gel de agarose 2%.....	48
6.6b) Genótipos isolados de amostras de indivíduos infectados com <i>P. falciparum</i> visualizados em gel de agarose 2%. (continuação).....	49
6.6c) Genótipos isolados de amostras de indivíduos infectados com <i>P. falciparum</i> visualizados em gel de agarose 2%. (continuação).....	49
6.6d) Genótipos isolados de amostras de indivíduos infectados com <i>P. falciparum</i> visualizados em gel de agarose 2%. (continuação).....	50

6.7) Número total de indivíduos de acordo com a multiplicidade da infecção e desfecho clínico.....	60
6.8) Percentual de indivíduos segundo multiplicidade da infecção e desfecho clínico.....	60

## Lista de Tabelas

6.1) Número de indivíduos segundo faixa etária.....	37
6.2) Classificação dos indivíduos conforme nível de escolaridade.....	39
6.3). Classificação dos indivíduos de acordo com a ocupação.....	40
6.4) Classificação dos indivíduos de acordo com o local de nascimento.....	41
6.5) Classificação dos indivíduos nascidos em diferentes localidades de Barcelos.....	42
6.6) Classificação dos indivíduos de acordo com o bairro de residência.....	43
6.7) Distribuição dos indivíduos assintomáticos e com malária, comparando-os segundo número total, sexo, idade e número de episódios prévios da doença.....	46
6.8) Distribuição dos genótipos isolados em cada indivíduo.....	51
6.9) Diversidade da infecção por genótipos diferentes encontrados nos indivíduos infectados por <i>P. falciparum</i> no município de Barcelos, Amazonas.....	53
6.10) Diversidade da infecção de acordo com o gênero: números e percentuais de homens e mulheres portadores dos diversos genótipos de acordo com o tamanho das bandas.....	54
6.11) Diversidade da infecção de acordo com a idade: números e percentuais de indivíduos portando diferentes números de genótipos.....	55
6.12) Diversidade da infecção de acordo com o desfecho clínico.....	56
6.13) Diversidade da infecção conforme o local de moradia: Frequências individuais dos genótipos/bairro.....	57
6.14) Distribuição dos genótipos de MSP1 de <i>Plasmodium falciparum</i> circulantes nas áreas rural e urbana no município de Barcelos, Amazonas.....	58
6.15) Distribuição de genótipos circulantes em áreas de alto e médio risco de transmissão de malária no município de Barcelos, Amazonas.....	59

6.16) Multiplicidade da infecção: número de genótipos de acordo com a faixa etária.....	61
6.17) Distribuição da multiplicidade da infecção de acordo com o gênero no município de Barcelos, Amazonas.....	62
6.18) Multiplicidade da infecção de acordo com a história pregressa de malária nos indivíduos de Barcelos, Amazonas.....	62
6.19) Percentual e números de genótipos de acordo com o local de moradia.....	63

## Lista de Quadros

5.1) Iniciadores da primeira PCR diagnóstica.....	30
5.2) Iniciadores da segunda PCR diagnóstica.....	30
5.3) Mix de reagentes da primeira PCR diagnóstica.....	30
5.4) Perfil térmico da primeira PCR diagnóstica.....	31
5.5) Mix de reagentes da segunda PCR diagnóstica.....	31
5.6) Perfil térmico da segunda PCR diagnóstica.....	32
5.7) Iniciadores da primeira reação MSP1.....	33
5.8) Iniciadores da segunda reação MSP1.....	33
5.9) Mix de reagentes da primeira PCR MSP1.....	33
5.10) Perfil térmico da primeira reação MSP1.....	34
5.11) Mix de reagentes da segunda PCR MSP1.....	34
5.12) Perfil térmico - MSP1 – SEGUNDA REAÇÃO.....	35

## Lista de Siglas

WHO – World Health Organization

OMS – Organização Mundial da Saúde

MS – Ministério da Saúde

MSP1 – Merozoite Surface Protein 1 (Proteína de Superfície de Merozoíto 1)

MSP2 – Merozoite Surface Protein 2 (Proteína de Superfície de Merozoíto 2)

SUS – Sistema Único de Saúde

PNCM – Programa Nacional de Controle da Malária

6-GDP – Glicose 6- Fosfato Desidrogenase

IPA – Incidência Parasitária Anual

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação de Polimerase em Cadeia)

SNP – Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de Base Única)

DNA – Desoxirribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

HE – Heterozigozidade Esperada

MOI – Multiplicity of Infection (Multiplicidade de Infecção)

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

PB – Pares de Bases

GLURP – Glutamate Rich Protein (Proteína Rica em Glutamato)

## RESUMO

A malária é uma doença que acomete milhões de pessoas todos os anos no planeta. No Brasil, essa doença atingiu cerca de 267 mil pessoas somente em 2011, sendo que a maior parte dos casos ocorreu na região Amazônica. Causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, possui um amplo espectro clínico que vai desde infecções assintomáticas, malária não complicada, a malária grave ou complicada, podendo evoluir até o óbito. Estudos realizados em áreas holo e hiperendêmicas de malária, fundamentalmente no continente Africano e em Papua Nova Guiné, permitiram estabelecer que o conhecimento da população de parasitos que circulam em uma área. Este estudo se propôs a avaliar o perfil genético da infecção por *P. falciparum* em uma área de alto risco epidemiológico para malária e com presença de infecção assintomática no município de Barcelos, médio rio Negro, estado do Amazonas. Para isso, foi estudado o gene MSP1 que codifica a Proteína de Superfície de Merozoíto 1, com o intuito de verificar a diversidade genética dos parasitos da região de Barcelos, a multiplicidade da infecção e as relações dos diferentes genótipos com o *status* clínico em área endêmica para malária. Foi realizada reação de polimerase em cadeia (PCR) a partir de DNA extraído de 79 amostras de sangue coletadas em indivíduos desta região. No total, foram encontrados 10 diferentes genótipos do parasito sendo que a maior parte dos indivíduos (45 pessoas, 56,96%) portava apenas um genótipo do parasito. Entre os indivíduos assintomáticos, 70,37% apresentavam um genótipo e os demais (29,63%) apresentaram dois genótipos. Entre os pacientes com malária, 50% tinham apenas um genótipo, 25% tinham dois genótipos, 19,23% apresentaram três genótipos e 5,77% portavam quatro genótipos. Em média, portadores assintomáticos possuíam 1,3 genótipos diferentes enquanto pacientes com malária tiveram em média 1,8 genótipos. Concluiu-se que na região de Barcelos circulam populações de *P. falciparum* consideravelmente diversas e que as infecções múltiplas estão mais presentes em portadores de malária que em indivíduos assintomáticos.

Palavras-chave: Malária, *P. falciparum*, infecção assintomática, diversidade genética, multiplicidade da infecção, Amazonas.

## ABSTRACT

Malaria is a disease that attacks millions of people all of the years in the world. In Brazil, it reached about 267 thousand people only in 2011, and most of the cases was registered in the Amazonian area. Caused by protozoa of the gender *Plasmodium*, it possesses a wide clinical spectrum ranging from asymptomatic infections, no complicated malaria, serious or complicated malaria that could develop until death. Studies accomplished in holo- and hyperendemic areas, fundamentally in the African continent and in Papua New Guinea, allowed to establish that the knowledge of the population of parasites that circulate in a certain area. This study intended to evaluate the genetic profile of the infection for *P. falciparum* in an area of high epidemic risk for malaria and with the presence of asymptomatic infection in the city of Barcelos, medium Rio Negro, state of Amazonas. For that, the gene MSP-1, that codifies the Merozoite Surface Protein 1, was studied to verify the genetic diversity of the parasites of the area of Barcelos, the multiplicity of the infection and the relationships of the different genotypes with the clinical status in an endemic area for malaria. Polymerase Chain Reaction (PCR) was accomplished starting from extracted DNA from blood samples collected in individuals from this area. In total, 10 different genotypes of the parasite were found and most of the individuals (45 people, 56,96%) carried just a genotype of the parasite. Among the asymptomatic individuals, 70,37% introduced a genotype and the others (29,63%) presented two. Among the patients with malaria, 50% had only one genotype, 25% had two genotypes, 19,23% presented three genotypes and 5,77% carried four genotypes. On average, asymptomatic bearers possessed 1,3 genotypes while patients with malaria had 1,8 genotypes on average. It was concluded that in the area of Barcelos diverse populations of *P. falciparum* circulate and that multiple infections are more present in malaria bearers than in asymptomatic individuals.

Key-words: Malaria, *P. falciparum*, Asymptomatic infection, Genetic diversity, Multiplicity of the infection, Amazonas.

## 1) INTRODUÇÃO

A malária é uma doença que acomete milhões de pessoas todos os anos principalmente nas regiões intertropicais do planeta (WHO, 2010). No Brasil, foram reportados cerca de 267 mil casos somente em 2011, sendo que a maior parte dos casos ocorreu na Amazônia Legal (Ministério da Saúde, 2011).

A malária é uma doença causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e possui um amplo espectro clínico. Dentre os fatores determinantes para os desfechos clínicos da malária, podemos citar a espécie e a diversidade genética do parasito, a intensidade com que o hospedeiro é exposto ao vetor e a imunidade do hospedeiro contra a malária, entre outros. A infecção por *Plasmodium sp* pode ser: I) assintomática, quando o indivíduo está infectado, mas não apresenta sinais ou sintomas da doença; II) oligossintomática, quando o paciente apresenta sintomas fracos, muitas vezes com cura espontânea; III) malária não complicada, que ocorre quando aparecem os sintomas clássicos de febre intermitente, calafrios e diaforese e IV) malária grave ou complicada, levando o paciente a um quadro clínico com sintomas como anemia grave, insuficiência renal, hepatomegalia, esplenomegalia, convulsões, coma (malária cerebral), entre outros, podendo evoluir ao óbito (Coura et al., 2006).

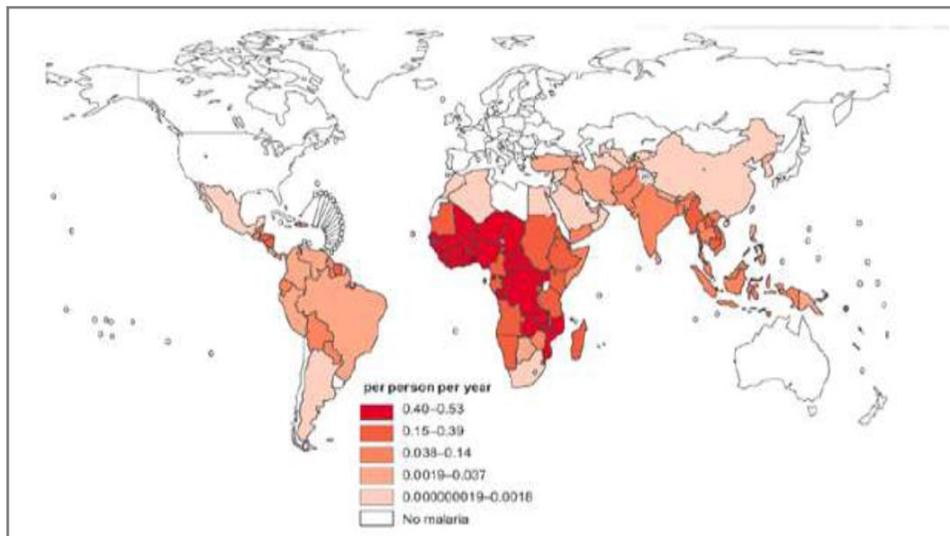
Este estudo se propõe a investigar a diversidade genética do *Plasmodium falciparum* um dos agentes etiológicos da malária em uma região altamente endêmica da região Amazônica. Para isso, serão estudados os diferentes genótipos do gene da Proteína de Superfície de Merozoíto 1 (MSP1), antígeno do *P. falciparum* encontrado na membrana do parasito, sendo expresso na fase de merozoíto (formas extracelulares sanguíneas). Esta proteína tem sido amplamente estudada como marcador molecular para detectar quais genótipos de *P. falciparum* são resistentes às drogas antimaláricas (ocorrências de reinfeção e/ou recrudescência), quais são responsáveis por casos graves da doença ou por infecções assintomáticas, além de ser antígeno candidato para uma vacina contra a malária. Foram estudados indivíduos do município de Barcelos, Amazonas, área altamente endêmica para malária, mas que apresenta indivíduos que relataram nunca ter tido a doença e alta frequência de infecções assintomáticas (Suárez-Mutis et al., 2007b). Também foram estudados polimorfismos no gene de MSP1, com a finalidade de: I) verificar quais as populações do parasito

circulam nesta região e II) quais as consequências desta diversidade genética para o desenvolvimento ou não de malária ou infecção plasmodial assintomática na população humana. O estudo genético foi feito através de comparação de tamanho de fragmentos do gene amplificados por reação de polimerase em cadeia (PCR).

## 2) MARCO TEÓRICO

### 2.1) A Malária no Brasil e no mundo

A malária é uma enfermidade que acomete milhões de pessoas todos os anos. Segundo dados do boletim de malária no mundo, publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), foram notificados mais de 207 milhões de casos de malária no planeta no ano de 2012 e, estimados um total 627 mil óbitos (WHO, 2012), sendo a maior parte dos casos no continente africano. A distribuição da doença é mundial e ocorre em 106 países principalmente situados na zona intertropical (Figura 2.1).

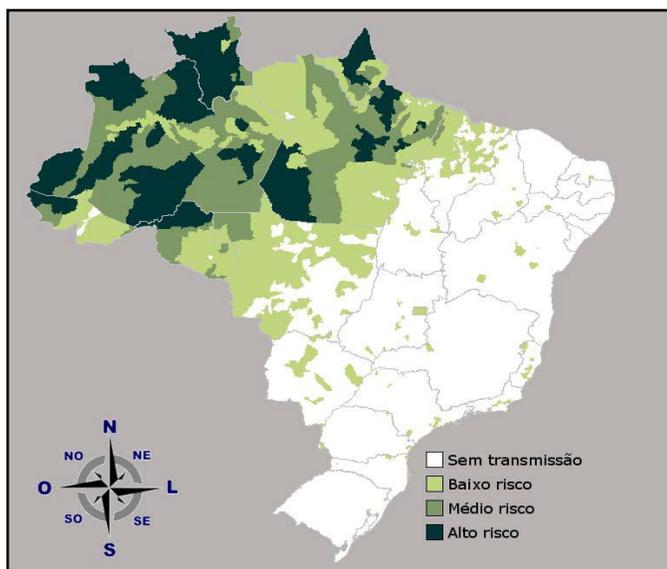


Figur

a. 2.1: Distribuição da malária no Mundo. Fonte: WHO, 2010.

Em 2011 foram notificados cerca de 267 mil casos de malária no Brasil, sendo mais de 99% registrados na Amazônia Legal, com aproximadamente 5.000 internações (Ministério da Saúde, 2011) (Figura 2.2). As condições climáticas da Amazônia favorecem a procriação do vetor e a transmissão da doença. Fora da região Amazônica, poucos são os casos de malária devido às campanhas de erradicação da doença na década de 1960 e, com o uso de fortes inseticidas de ação residual como o DDT. Nestas regiões os casos geralmente são importados de áreas endêmicas do

Brasil e de outros países. Embora a incidência da malária seja reduzida nestas áreas, não pode ser negligenciada diante do risco de reintrodução da doença, agravada pelo fluxo migratório em áreas ambientalmente receptivas, bem como o diagnóstico tardio, já que a malária possui sintomas parecidos com os de outras infecções como gripe e dengue fazendo, muitas vezes, vítimas fatais (Costa et al., 2010).



**Figura. 2.2: Classificação das áreas de risco para malária segundo incidência parasitária anual (IPA) Fonte: Serviço de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde (MS), 2011.**

## 2.2 Agentes etiológicos e vetores

Os agentes etiológicos da malária são protozoários apicomplexos do gênero *Plasmodium*. Já foram descritas aproximadamente 150 espécies de *Plasmodium*, das quais, cinco infectam naturalmente o homem: *P. falciparum* Welch 1897, responsável pelas formas mais severas de malária e acontece em maior proporção no mundo, sendo mais prevalente na África, existindo também em algumas regiões das Américas e da Ásia; *P. vivax* Grassi & Feletti, 1890, espécie mais amplamente distribuída no mundo, principalmente na Ásia, nas Américas e Oceania, sendo o principal causador de malária no Brasil; *P. malariae* Grassi & Feletti 1889, *P. ovale* Stephens 1922. Recentes estudos no Sudeste asiático relataram casos de infecção natural em

humanos por *P. knowlesi* Franchiti, 1927 (White, 2008; Ta et al., 2010). Os plasmódios são transmitidos através da picada de fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*.

As espécies plasmodiais humanas ocorrentes no Brasil são: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* (Ministério da Saúde, 2011); a maior parte dos casos de malária é causada por *P. vivax*, e ultimamente observaram-se complicações clínicas incomuns de malária severa, levando vários pacientes a óbito. *P. falciparum* foi o causador de 13,1% dos casos notificados na Amazônia em 2011, sendo responsável pelo maior número de internações (Ministério da Saúde, 2011). São poucos os casos de infecção por *P. malariae*, que, por ter um período de incubação intrínseca maior e por não ser tão virulento quanto às outras espécies, pode evoluir naturalmente para a cura. Muitas vezes, também é confundido com *P. vivax*, quando observado na gota espessa (Descheemaeker, 2009).

### **2.3) Ciclo de vida do *Plasmodium sp***

O ciclo biológico do *Plasmodium sp* caracteriza-se por um estágio no hospedeiro humano (ciclo assexuado) e por um estágio no mosquito vetor (ciclo sexuado), sendo que no ser humano, ocorre a fase exoeritrocítica ou esquizogonia tissular e a fase eritrocítica ou esquizogonia sanguínea (Figura 2.3).

A fase exo-eritrocítica inicia-se quando fêmeas de mosquitos *Anopheles* infectadas picam o indivíduo, inoculando os esporozoítos na corrente sanguínea do hospedeiro. Estudos recentes têm demonstrado que esporozoítos infectam a pele do hospedeiro, induzindo supressão imunológica, e explicando algumas reinfecções (Guilbride et al., 2012). Esporozoítos inoculados chegam até o fígado e infectam os hepatócitos, iniciando-se a reprodução assexuada ou esquizogonia exoeritrocítica. No interior dos hepatócitos, os esporozoítos se multiplicam em milhares de esquizontes teciduais, que se diferenciam em merozoítos. Os hepatócitos se rompem devido à enorme carga parasitária em seu interior, liberando os merozoítos na corrente sanguínea que infectam os eritrócitos, iniciando-se o ciclo assexuado eritrocítico. A esquizogonia exoeritrocítica dura, em média, de 7 a 10 dias para *P. falciparum*, de 10 a 17 dias para *P. vivax* e *P. ovale*, e de 18 a 40 dias para *P. malariae*.

Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, populações geneticamente distintas de esporozoítos possuem diferentes ritmos de desenvolvimento (Collins 2007, Imwong et al., 2007); algumas se desenvolvem rapidamente, enquanto outras ficam em estado de latência no hepatócito, sendo por isso denominadas hipnozoítos (do grego, *hypnos*, sono). Estes hipnozoítos são responsáveis pelas recaídas tardias da doença, que ocorrem após períodos variáveis de incubação, em geral dentro de seis meses para a maioria dos genótipos de *P. vivax*. As recaídas são, portanto, ciclos pré-eritrocíticos e eritrocíticos consequentes da esquizogonia tardia de parasitos dormentes no interior dos hepatócitos.

No ciclo assexuado eritrocítico, os merozoítos uma vez liberados na corrente sanguínea invadem os eritrócitos e, por esquizogonia se multiplicam e maturam, formando novos esquizontes que se rompem liberando mais merozoítos com nova invasão de eritrócitos. O ciclo eritrocítico se repete sucessivas vezes a cada 48h nas infecções por *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, e a cada 72h nas infecções por *P. malariae*. Após algumas gerações de merozoítos sanguíneos, alguns deles se diferenciam em estágios sexuais, formando, assim, os macrogametas (gametas femininos) e os microgametas (gametas masculinos).

O ciclo no vetor inicia-se quando o mosquito se alimenta de sangue infectado contendo os gametas plasmodiais livres na corrente sanguínea. No intestino do anofelino ocorre a diferenciação dos gametócitos em gametas e sua fusão com a formação do ovo ou zigoto. Este se transforma em uma forma móvel (ocineto) que migra até a parede do intestino do mosquito e se diferencia em oocistos. Posteriormente os oocistos se rompem, liberando os esporozoítos que migram para as glândulas salivares através da hemolinfa, de onde são transferidos para o sangue do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo.

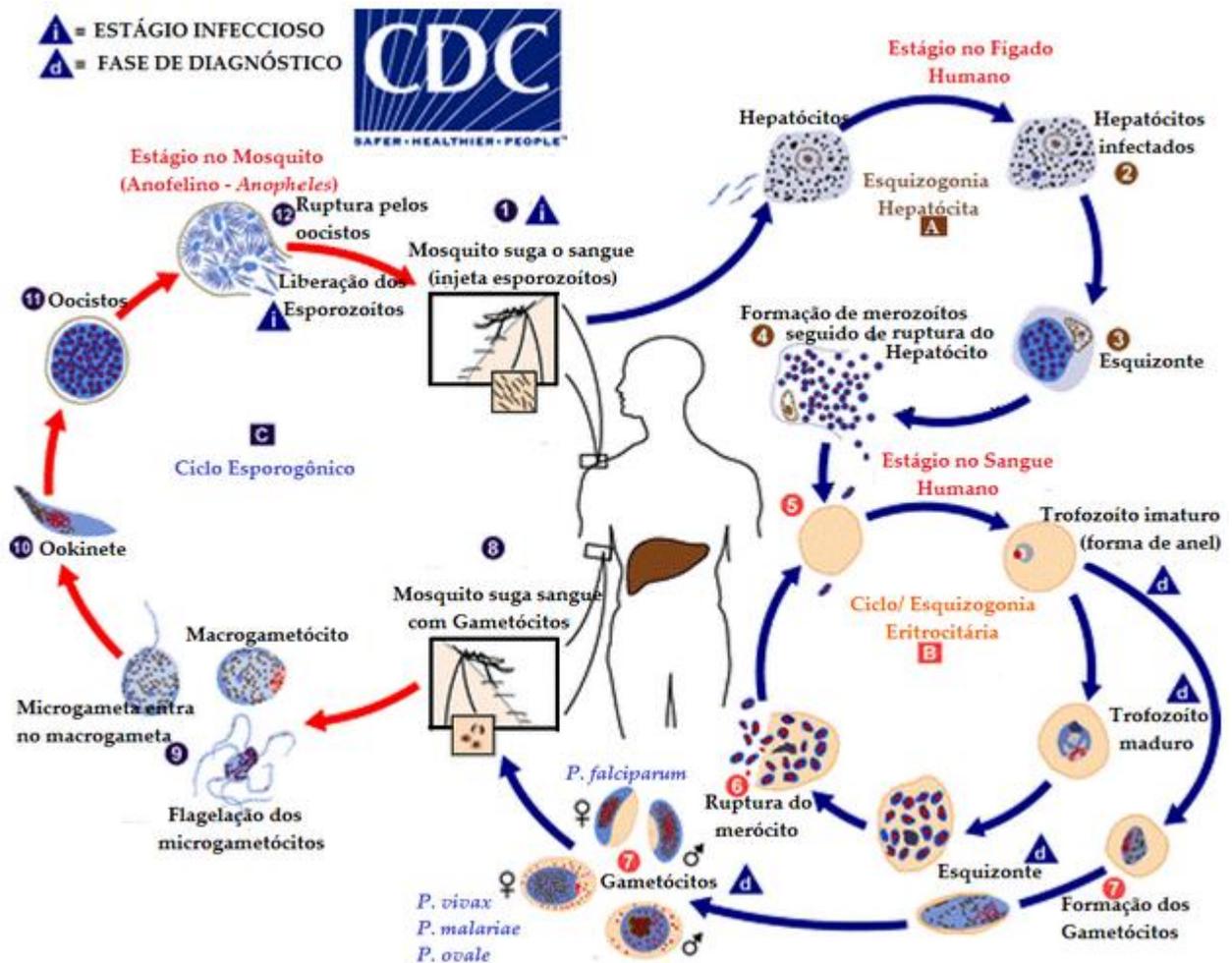


Figura 2.3: Ciclo de vida do *Plasmodium* sp. Fonte:(CDC)

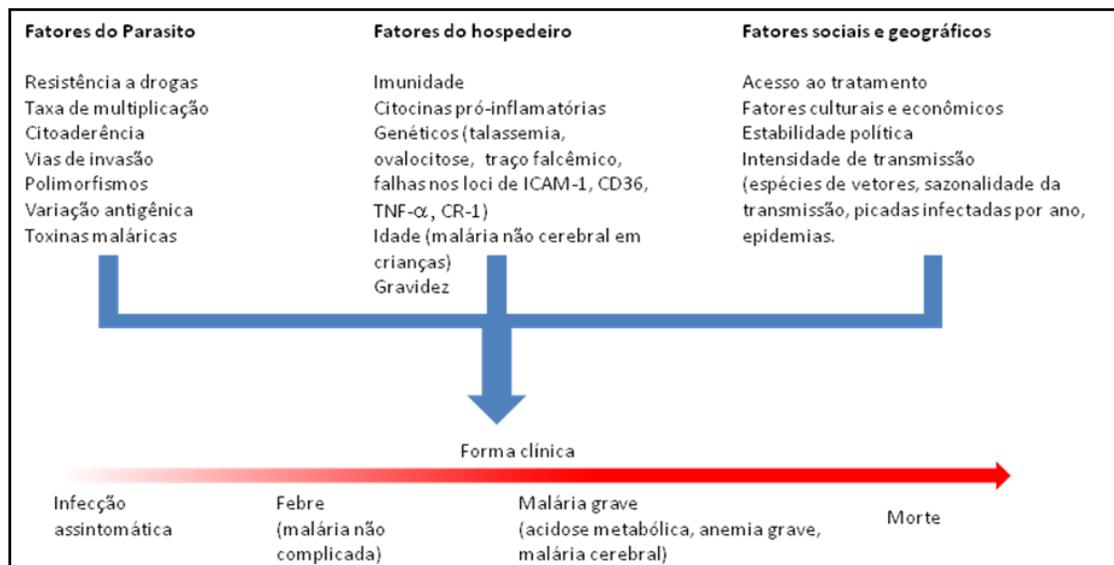
## 2.4) Sintomas da malária

Os principais sintomas associados à malária são: calafrios, febre alta (40° C ou superior) e sudorese nos casos não complicados, que podem ou não ser acompanhados por cefaleia, mialgia, náuseas, vômito e outros sintomas inespecíficos. Após os primeiros sintomas a febre pode passar a ser intermitente. Nos casos graves da doença, podem acontecer sinais de prostração, alternância de consciência, convulsões, dispneia, hipotensão arterial, edema pulmonar, hemorragias, icterícia, hemoglobinúria, hiperpirexia e oligúria. Outros sinais detectados em exames laboratoriais como, por exemplo, hipoglicemia, anemia grave, acidose metabólica,

insuficiência renal, hiperlactemia e hiperparasitemia são importantes no diagnóstico de malária grave (Ministério da Saúde, 2010).

A malária é uma doença que possui um amplo espectro clínico, e a infecção por *Plasmodium sp* pode levar o indivíduo a vários desfechos clínicos. O indivíduo infectado pode ser portador assintomático, apresentar os sintomas da tríade clássica (denominada malária não complicada) ou pode ter complicações sérias que podem levar à morte (Snow & March, 1998). A resposta imune do indivíduo à infecção depende de uma série de fatores tais como a intensidade da transmissão da doença, a imunidade clínica adquirida do indivíduo, idade do hospedeiro, virulência e a carga parasitária, entre outros, gerando níveis de gravidade da doença (Figura 2.4). Em áreas de alta endemicidade, indivíduos que sofreram picadas infectivas frequentemente, podem vir a apresentar infecção assintomática, com baixa parasitemia, contribuindo para a transmissão da malária, já que não apresentam manifestações clínicas e não sabem que estão infectados (Suárez-Mutis et al., 2007b). Também podem haver indivíduos oligossintomáticos que possuem sintomas fracos como febre baixa ou apenas indisposição ou dor de cabeça leve, com cura espontânea; a malária clássica não complicada e a malária complicada, podendo levar o paciente a óbito (Trager & Jensen, 1976).

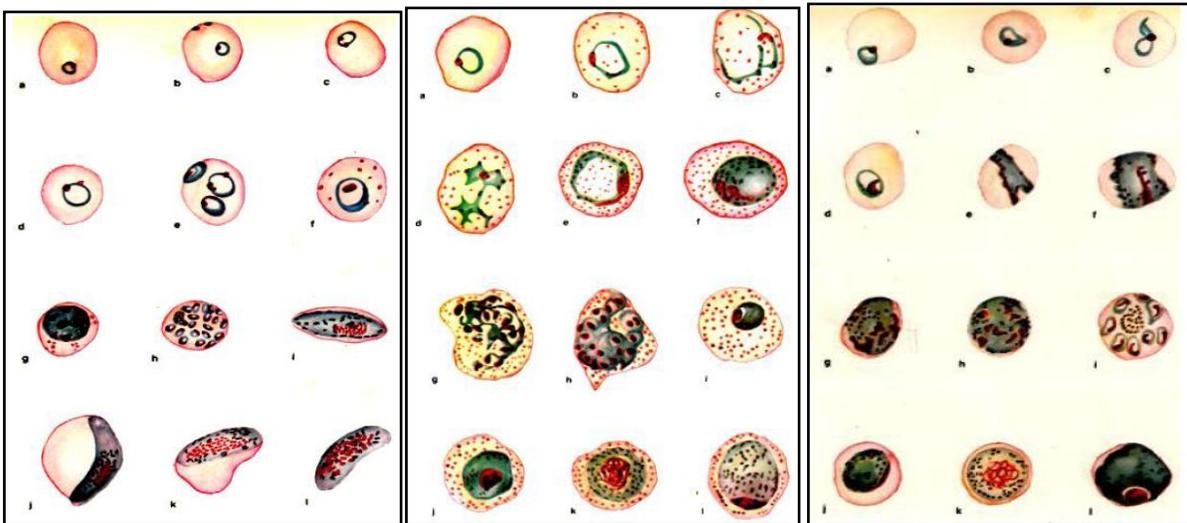
Em relação à infecção assintomática, os estudos são relativamente recentes nas Américas. No Brasil, Andrade et al. (1995) demonstraram uma prevalência de 70% de infecções assintomáticas entre garimpeiros em Mato Grosso e Suárez-Mutis et al. (2007b) detectaram 20,4% infecção assintomática entre a população envolvida em atividades extrativistas do rio Negro. No Peru, foi detectada uma prevalência de 17,6% de indivíduos assintomáticos (Roshanravan et al., 2003) e em comunidades indígenas da Amazônia Colombiana, esse percentual foi de 21,6% (Suárez-Mutis et al., 2000). Foi verificado que a prevalência de infecções assintomáticas era quatro a cinco vezes maior que infecções sintomáticas, variando de 6,4 a 31,7% (sensibilidade à gota espessa e PCR, respectivamente) (Roshanravan et al., 2003). Em três diferentes estudos seccionais cruzados realizados em Portochuelo e ao longo do rio Ji-Paraná, as taxas de infecções assintomáticas variaram de 16,9 a 64,8% (Alves et al. 2002, Coura et al. 2006).



**Figura 2.4: Determinantes para o desfecho clínico da malária.**

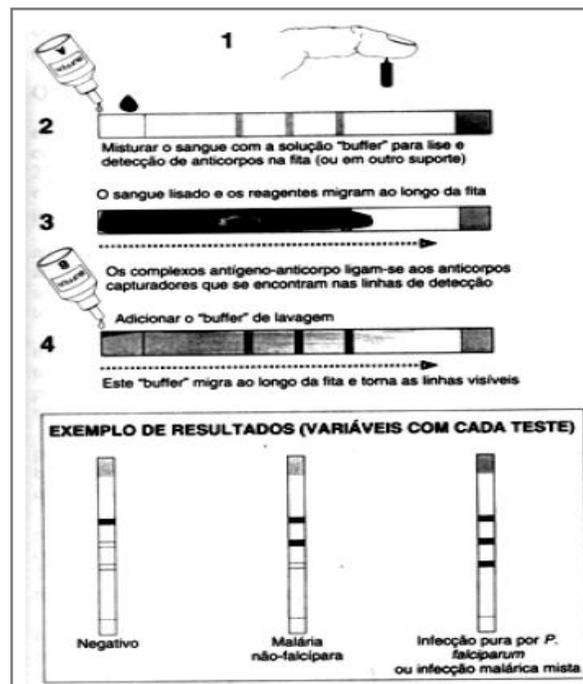
## 2.5) Diagnóstico

Para o diagnóstico da infecção pelo *Plasmodium sp*, além da suspeita clínica, é necessária a realização de exames laboratoriais pois a malária possui sintomas em comum com outras doenças febris como dengue, febre amarela, leptospirose, febre tifoide, entre outras. O exame da gota espessa é o método oficial para diagnóstico da malária, sendo considerado padrão-ouro (WHO, 2010; Ministério da Saúde 2010). Essa técnica baseia-se na coleta de uma gota de sangue do paciente por meio de punção digital em lâmina de microscopia, sendo posteriormente corado pelo método de Walker. Um profissional devidamente capacitado analisa a amostra em microscópio de campo claro, podendo encontrar as formas parasitárias, sendo possível identificar a espécie plasmodial presente na amostra. Mesmo após o avanço das técnicas de diagnóstico da malária, a gota espessa ainda é muito utilizada pois é eficaz, de baixo custo e de fácil realização (Ministério da Saúde, 2010) (Figura 2.5).



**Figura 2.5: Formas sanguíneas de *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*, respectivamente visualizadas em lâminas de gota espessa. Fonte: (Rey, 2008).**

Testes rápidos imunocromatográficos detectam antígenos parasitários através de anticorpos monoclonais. Esse tipo de teste é rápido e eficaz, dispensando uso de microscópio e profissionais treinados. Todavia, com o uso destes testes, não é possível dizer (com exceção do *P. falciparum*) qual espécie plasmodial está infectando o paciente, ou se há infecção mista. O uso desta técnica está em crescimento mas seu custo é ainda elevado e seu resultado pode perder qualidade quando armazenado por muito tempo, principalmente em condições de campo (Figura 2.6).



**Figura 2.6: Diagnóstico imunológico da malária através de teste imunocromatográfico. Fonte: (Rey, 2008).**

Outro método que é muito preciso é o diagnóstico molecular através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Essa metodologia não é utilizada na rotina laboratorial, pois necessita de profissionais treinados, equipamentos especiais e, por isso, seu custo é muito elevado. Geralmente é utilizado em diagnóstico da malária para efeitos de pesquisa científica.

## 2.6) Tratamento

O Ministério da Saúde, por meio do Sistema Único de Saúde (SUS), disponibiliza os medicamentos antimaláricos gratuitamente em todo o território nacional, através do Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM). O tratamento visa eliminar o parasito agindo-o em pontos cruciais de seu desenvolvimento, como a interrupção da

esquizogonia eritrocítica (fase em que ocorrem os sintomas), destruição dos hipnozoítos de *P. vivax* e *P. ovale*, (este último, nos raros casos importados de países africanos) e interrupção do desenvolvimento de formas sexuadas (gametócitos), para que a transmissão não ocorra. Para isso, vários medicamentos são utilizados, cada qual com um objetivo. A medicação depende da espécie plasmodial, da idade, da história de infecções anteriores, condições associadas como outras doenças ou gravidez e em casos graves onde é necessária a internação (Ministério da Saúde, 2010).

No Brasil, as principais drogas antimaláricas utilizadas são a cloroquina, primaquina, mefloquina, quinina, artemeter, lumenfantrina, tetraciclina, clindamicina, doxiciclina, atovaquona entre outras. Para infecções por *P. vivax* e nos raros casos importados de *P. ovale*, preconiza-se o uso da cloroquina durante três dias e da primaquina durante sete dias. A primaquina é hipnozoiticida (tem como alvo os hipnozoítos) e a cloroquina, elimina as formas sanguíneas assexuadas e os gametócitos. As gestantes, crianças com menos de seis meses e indivíduos com deficiência enzimática de Glicose 6- Fosfato Desidrogenase (6-GDP) não podem ser medicados com esta droga.

Nas infecções por *P. falciparum*, utiliza-se a combinação de artemeter + lumenfantrina durante três dias ou mefloquina + artesunato, porém estes medicamentos não podem ser administrados em gestantes com menos de três meses de gravidez. A segunda opção terapêutica é a associação quinina + doxiciclina, não sendo administrada em gestantes e crianças menores de seis meses. A doxiciclina não pode ser administrada em crianças menores de oito anos; nesse caso a doxiciclina é substituída pela clindamicina (Ministério da Saúde, 2010).

Em infecções mistas (*P. falciparum* + *P. vivax*), deve-se utilizar as combinações de artemeter + lumenfantrina ou de mefloquina + artesunato, ambas associadas à primaquina. Nas infecções mistas causadas por *P. vivax* + *P. malariae*, utiliza-se o mesmo esquema terapêutico de infecções simples por *P. vivax*. Nos casos de infecção de *P. falciparum* + *P. malariae*, utiliza-se somente a combinação adotada para o *P. falciparum*.

Em gestantes e bebês menores de seis meses utiliza-se a combinação de quinina + clindamicina em infecções não complicadas por *P. falciparum* ou somente a

quinina durante sete dias. Todos esses tratamentos são ministrados por via oral, e as doses de acordo com o peso do paciente.

Em casos de malária grave por *P. falciparum*, administra-se as combinações: artemeter + clindamicina (ambas endovenosas) ou artesunato (intramuscular) + clindamicina (endovenosa) (exceto para gestantes e bebês menores de seis meses). Em gestantes e crianças usa-se quinina + clindamicina (ambas endovenosas), em doses de acordo com o peso do paciente (Ministério da Saúde, 2010)

## **2.7) Classificação epidemiológica**

A malária é uma doença complexa do ponto de vista epidemiológico, podendo ser classificada de várias formas de acordo com a intensidade e estabilidade da transmissão e pela estratificação epidemiológica de risco.

### **2.7.1) Intensidade da Transmissão**

Desde a década de 1950, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a malária segundo a intensidade de transmissão, de acordo com o percentual de crianças entre dois e nove anos de idade que apresentem esplenomegalia (WHO, 1950):

- Malária holoendêmica: quando mais de 75% das crianças entre dois e nove anos apresentam esplenomegalia, contudo, poucos indivíduos adultos apresentam o baço palpável. Ocorre em regiões de intensa e contínua transmissão;
- Malária hiperendêmica: quando entre 50 e 75% das crianças entre dois e nove anos apresentam esplenomegalia, porém, este sinal também é muito encontrado em pacientes adultos. Esta situação ocorre em regiões com transmissão intensa e sazonal;
- Malária mesoendêmica: quando entre 10 e 50% das crianças entre dois e nove anos apresentam esplenomegalia. É característico de áreas com amplas variações de transmissão;

- Malária hipoendêmica: quando menos de 10% das crianças entre dois e nove anos apresentam esplenomegalia. Ocorre em regiões de transmissão baixa e irregular.

A classificação da OMS é aplicável em áreas como a África e o Sudeste Asiático, onde a transmissão ocorre em todas as épocas do ano e há dificuldade no diagnóstico e no tratamento. Entretanto, não é o que ocorre na América, principalmente no Brasil, onde a transmissão é sazonal e a maioria dos pacientes é diagnosticada e tratada. Por isso, essa classificação carece de sensibilidade nos países latino-americanos considerados de baixa endemicidade (Ladeia-Andrade 2005, Suárez-Mutis 2007a).

### **2.7.2) Estabilidade da Transmissão**

A malária pode ser classificada como estável e instável. O principal fator que determina a estabilidade da transmissão da malária em uma determinada população é o desenvolvimento da imunidade, independente da intensidade da transmissão:

- Malária estável: As áreas de malária estável são aquelas que possuem altas taxas de transmissão do parasito e onde a população está constantemente exposta ao vetor. As crianças menores de dois anos têm um maior risco de adoecer devido à baixa imunidade, podendo chegar a óbito mais facilmente; os indivíduos adultos geralmente são assintomáticos ou oligossintomáticos, com baixas parasitemias, pelo fato de sofrerem constantes picadas do inseto vetor, desenvolvendo, assim, imunidade clínica. Nestas áreas os vetores são bem adaptados e é raro encontrar mosquitos não infectados (Rey, 2001);
- Malária instável: Não ocorre transmissão intensa, sendo que a incidência varia de acordo com as condições climáticas do local, influenciando na ecologia do vetor e fazendo com que a população não seja constantemente seu alvo. Desta forma, as populações de áreas instáveis demoram a adquirir imunidade, e a maior incidência de malária ocorre em indivíduos adultos; dificilmente as crianças são infectadas. As epidemias de malária geralmente ocorrem nestas áreas.

### **2.7.3) Estratificação Epidemiológica de Risco**

Desde o ponto de vista do risco epidemiológico, de acordo com a OMS, uma área pode ser classificada em alto, médio, baixo e sem risco de adquirir malária, de acordo com a Incidência Parasitária Anual (IPA). Esta medida é calculada dividindo o número de casos de malária em um ano num determinado local, pela população em risco desta região, para o mesmo período de tempo por cada 1000 pessoas. No Brasil, as áreas são divididas em: Alto risco (IPA  $\geq 50$ ); Médio risco (IPA  $\geq 10$  e  $< 50$ ); Baixo risco (IPA  $> 1$  e  $< 10$ ); e sem risco: (IPA  $< 1$ ) (Ministério da Saúde, 2011) (Vide figura 2.2).

### **2.8) Infecção assintomática**

Robert Koch foi o primeiro a descrever a infecção assintomática por *Plasmodium*, em pacientes na Papua Nova Guiné em 1900 (Coura et al 2006). Desde então, este fenômeno vem desafiando os cientistas e, apesar de vários estudos realizados, muitas questões ainda não foram esclarecidas. A maior parte das pesquisas sobre as infecções assintomáticas foram realizadas na África e no sudeste asiático, sendo a infecção por *P. falciparum* a mais estudada, embora também haja um número crescente de relatos de casos assintomáticos devidos ao *P. vivax* (Suárez-Mutis et al., 2007b.).

Em áreas de malária hiper e holoendêmicas, onde as pessoas sofrem frequentes picadas, é observada a aquisição progressiva de imunidade, diminuindo o número de casos de sintomas clínicos, conforme o indivíduo vai ficando adulto (Rogier & Trape 1993). Desta forma, o maior número de casos de malária e os casos mais severos ocorrem entre crianças entre seis meses e dois anos de idade. A imunidade clínica começa a aparecer à medida que a criança vai crescendo e frequentemente é adquirida entre um e quatro anos ou entre cinco e nove anos, dependendo do nível de endemidade da área. Aos 14 anos, a parasitemia cai consideravelmente, podendo atingir níveis indetectáveis à gota espessa, entretanto a infecção persiste até a idade

adulta, podendo ser detectada através do diagnóstico molecular pela Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) (Roper et al., 1998). Em áreas meso ou hipoendêmicas há pouca informação de como é adquirida essa imunidade clínica.

O aparecimento ou não dos sintomas depende da imunidade do indivíduo. A imunidade é adquirida de acordo com a intensidade e regularidade com que o indivíduo é picado por anofelinos infectados ao longo da vida. Em áreas de malária estável (em que a transmissão é intensa e constante), não ocorrem epidemias. Já em regiões em que a malária não possui transmissão intensa e regular, ocorrem epidemias, devido à baixa imunidade da população ao parasito (Carter & Mendis 2002).

## **2.9) A malária no município de Barcelos**

Os primeiros registros de malária no município de Barcelos foram relatados por Oswaldo Cruz no início do século XX, em expedição realizada no “Vale do Amazonas”. Neste trabalho foi reportado que quase todas as crianças examinadas tinham esplenomegalia palpável, indicando uma área hiperendêmica para malária (Cruz, 1913).

Em média, a incidência parasitária anual em Barcelos, é alta. Na década de 2000 houve uma queda desse índice em relação à década anterior. Em 2001 o IPA foi de 15,2 para cada 1000 habitantes, um evento atípico para a região, mas voltou a subir, em 2004 esse valor foi de 136,7 por 1000 habitantes. Em 2009, o IPA foi de 123,6 para cada 1000 habitantes, em 2010 subiu ligeiramente (127,8 por 1000 habitantes) e em 2011 caiu consideravelmente (83,8 para cada 1000 habitantes (Ministério da Saúde, 2011).

O município é considerado uma área hipoendêmica, com predominância de malária causada por *P. vivax*. Em estudo realizado por Cevallos (2001), a malária na cidade de Barcelos está presente ao longo de todo o ano, com o aumento do número de casos no início e no final da estação chuvosa. Foi observado que quando o Rio Negro atingiu seu nível mínimo, ocorreu aumento no número de casos devido ao surgimento de criadouros do anofelino. A prevalência de malária foi maior em crianças

menores de 10 anos e adolescentes, provenientes da periferia da cidade (Cevallos, 2001).

## **2.10) Estudo da diversidade genética de *Plasmodium sp***

No Brasil o *Plasmodium vivax* é o parasito mais prevalente que causa malária humana, sendo o responsável por mais de 86% dos casos da doença notificados no ano 2011 (Ministério da Saúde, 2012). No município de Barcelos, no médio rio Negro, local de nossos estudos, dos 2.169 casos de malária registrados em 2001, 22,4% foram devidos ao *P. falciparum* (Ministério da Saúde 2011).

Mesmo sendo menos prevalente, o *P. falciparum* é a espécie causadora da maior parte dos casos de malária grave no planeta e responsável pela maioria dos óbitos principalmente em crianças menores de cinco anos e mulheres grávidas (WHO, 2010). Os estudos sobre a biologia deste *Plasmodium* se concentram fundamentalmente em áreas holo e hiperendêmicas de malária na África subsaariana (Snow et al., 2005). Porém no Brasil, trabalhos realizados em áreas consideradas como de baixa endemicidade, como a região Amazônica ainda são escassos.

A publicação do sequenciamento completo do genoma do *P. falciparum* foi essencial para a compreensão da biologia deste protozoário, principalmente os mecanismos genéticos relacionados à invasão dos eritrócitos (Gardner et al., 2002). O conhecimento da diversidade genética do *P. falciparum* em uma determinada área é de extrema importância, pois nos permite o entendimento da biologia do parasito, da patogênese da doença, dos mecanismos de interação parasito-hospedeiro e o desenvolvimento de uma vacina efetiva para o melhoramento das medidas de controle usadas nas diferentes áreas (Amodu et al 2005; Kiwanuka, 2009).

Uma das tecnologias empregadas para o estudo da diversidade genética é a genotipagem de genes que codificam proteínas de membrana dos parasitos. A maior parte dos estudos de genotipagem tem se concentrado no mapeamento das regiões polimórficas dos genes que codificam para a Proteína 1 de Superfície do Merozoíto (MSP1), da Proteína 2 de Superfície do Merozoíto (MSP2), e da Proteína Rica em Glutamato (GLURP) (Kiwanuka, 2009). Estes marcadores genéticos têm sido utilizados para se avaliar a diversidade genética do *P. falciparum*, a multiplicidade da infecção,

assim como na determinação dos níveis de transmissão e sua associação com a aquisição natural da imunidade contra a malária (Kiwanuka, 2009).

Os plasmódios são protozoários que têm alta taxa de mutação genética, sendo mais diversos geneticamente que a maioria dos protozoários pelo fato de realizar reprodução sexuada. Este tipo de reprodução aumenta a variabilidade genética através do mecanismo de “crossing-over” durante a meiose dos oocistos no intestino do mosquito vetor. Desta forma, o parasito “modifica” seus genes que codificam para proteínas de superfície da membrana como meio de seleção natural e como mecanismo de escape do sistema imune do hospedeiro (Carter & Mendis, 2002). As recombinações genéticas têm maior abrangência à nível fenotípico, quando comparadas às mutações, pois as últimas são mudanças pontuais de nucleotídeos em uma determinada sequência, afetando apenas um códon; já as recombinações resultam em duplicações e deleções entre as fitas de DNA ou no interior de uma mesma fita, modificando vários códons e produzindo alterações não-sinônimas que estão sob pressão seletiva (Rich et al., 2000).

O gene MSP1 está sob forte seleção natural, porém a interpretação da estrutura populacional envolvendo este marcador é complexa, tendo em vista que há genótipos distintos em diferentes localidades, não sendo bem conhecidos os fatores de seleção natural que influem na gênese de novos alelos (Kiwanuka, 2009).

Em áreas endêmicas a quantidade de genótipos encontrados em um hospedeiro pode ser um indicador do nível de transmissão (Haddad et al., 1999; Raj et al., 2004). O aumento da transmissão da malária pode ser associado com o aumento do número de alelos do parasito num único hospedeiro. Entretanto, em áreas de baixa transmissão, há relatos de alta diversidade genética nos loci MSP1 e MSP2. Esses dados indicam que os fatores responsáveis pela diversidade genética de *P. falciparum* podem ser medidos não só pela intensidade da transmissão, mas também pelo número de genótipos circulantes na região e a multiplicidade das infecções (Kiwanuka, 2009).

A diversidade genética de *Plasmodium sp* tem sido amplamente estudada nos últimos anos. Tal variabilidade está relacionada às táticas de sobrevivência dos plasmódios às barreiras naturais (imunidade adquirida do hospedeiro vertebrado) e artificiais (tratamento da doença com medicamentos) (Faye et al., 2010).

Como meio de seleção natural, as populações que possuem polimorfismos nos genes que codificam proteínas de membrana, podem se tornar resistentes às drogas e/ou não são reconhecidas pelos anticorpos e células de memória do indivíduo infectado. A recombinação genética no gênero *Plasmodium* tem uma peculiaridade, se comparado aos demais protozoários: a fase sexuada, que ocorre no intestino do mosquito vetor, apresenta uma elevada taxa de *crossing-over* (Su et al., 1999). Essa fase é crucial para o surgimento de novas populações do parasito, pois a reprodução sexuada aumenta a variabilidade genética da espécie, tornando-a mais bem adaptada ao meio em que se encontra.

Em áreas onde a malária é estável, a diversidade das populações de parasitos é maior. Isto se deve à intensidade de transmissão e à capacidade vetorial do mosquito, enquanto em locais onde a malária é instável, a diversidade é menor, ocasionada pela menor expansão clonal dos genes devido à menor pressão imunológica (Hoffmann et al., 2003).

Estudos com *P. falciparum*, a espécie que causa maior incidência de morte e morbidade por malária no mundo, têm demonstrado que a maioria dos polimorfismos em genes que codificam proteínas de membrana é não-sinônimo, ou seja, os genes polimórficos traduzem proteínas com sequência de aminoácidos alterada (Rich et al., 1998).

A genotipagem é uma ferramenta utilizada para se determinar a variabilidade das populações de parasitos numa determinada área. Para isto, escolhem-se genes que são sabidamente polimórficos, que são denominados marcadores moleculares. Os principais marcadores utilizados na genotipagem de *P. falciparum* são genes que codificam para: a proteína circunsporozoíta, para a proteína adesiva relacionada à trombospondina, para a proteína da membrana apical, proteína rica em glutamato e proteínas de superfície de merozoíto 1 e 2 (MSP1 e MSP2) (Jafari-Guemouri et al., 2006).

Através dos estudos dos polimorfismos nestes genes, podemos determinar quais os genótipos de parasitos estão circulando em um determinado local, assim como identificar se estes são responsáveis por casos graves, não complicados ou infecções assintomáticas. Além disso, pode-se também verificar a resistência dessas populações de parasitos aos medicamentos antimaláricos (Peek et al., 2005).

Recentes estudos demonstraram que em populações de *P. falciparum* (e outras espécies de plasmódios) o surgimento de polimorfismos nos genes de proteínas de membrana seria uma estratégia de proteção contra o sistema imune do hospedeiro vertebrado, sendo uma forma de seleção natural do parasito. Plasmódios portadores desses polimorfismos poderiam agravar a doença, com a possibilidade de causar danos como o aumento da morbidade e da mortalidade pela malária. (Rich et al., 2000).

Este mecanismo de variabilidade genética do parasito com a finalidade de produzir diversidade antígenica na membrana para que o mesmo escape da imunidade do hospedeiro contribui para o fracasso de algumas medidas de controle da malária. (Takala et al., 2002).

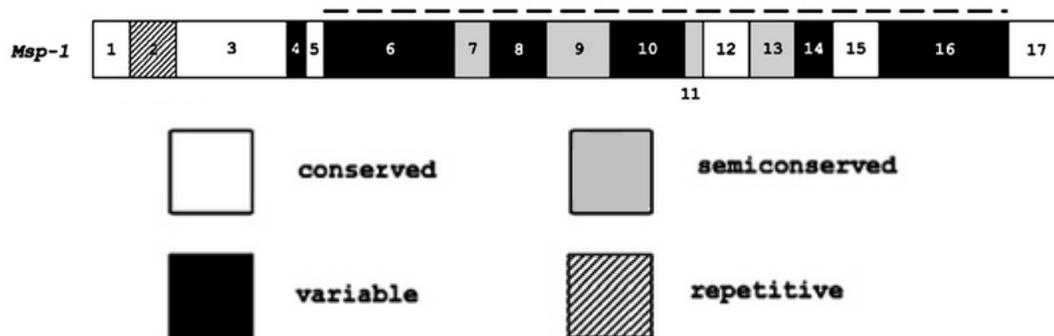
Acredita-se que parte da variação antigênica observada dentro de motivos repetitivos de uma proteína se origina de deleções e inserções resultantes de recombinação intra e entre fitas de DNA (Rich et al., 2000). Estes genes, como o da MSP-1, por exemplo, encontram-se em cópia única, cada genótipo expressa apenas uma das sequências tipo existentes para cada gene (no caso de genes dimórficos), apresentando grande variação genética entre as populações de parasitos e essas diferenças mudam de acordo com as variáveis epidemiológicas de cada região (Roper et al., 1998; Tami et al., 2002). Através de recombinação gênica meiótica, novas versões dessas sequências são geradas, no caso de zigotos resultantes da fusão de gametócitos portadores de diferentes alelos (Kemp, 1992).

### **2.10.1) Proteína de Superfície do Merozoíto 1 – MSP1**

A MSP1 (do inglês, Merozoite Surface Protein 1) é uma glicoproteína acoplada à membrana do merozoíto por âncoras de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) e sua função é pouco conhecida, mas acredita-se que seja responsável pelo reconhecimento dos eritrócitos (Darko et al., 2005). A MSP1 é um dos antígenos de membrana de merozoíto mais importantes quando se trata de desenvolvimento de vacinas. Há evidências de que a MSP1 esteja envolvida no processo em que o parasito invade os eritrócitos, já que é expressa em grande quantidade no merozoíto sanguíneo, sendo

uma das moléculas de membrana de maior peso molecular neste estágio de desenvolvimento (Kariuki et al., 2005).

Com base na análise das sequências de MSP1, o gene é dividido em 17 blocos, dos quais sete são altamente polimórficos inter-espaciados em cinco regiões conservadas e cinco regiões semi-conservadas (Holder, 1988). As variações no gene MSP1 são, na sua maioria, dimórficas apresentando duas formas básicas para cada bloco: as famílias MAD20 e K1. No bloco 2 da MSP1, (um bloco repetitivo, variando na sequência e no número de repetições), há outras duas famílias alélicas, a RO33 (Certa et al., 1987), e uma família recombinante entre a região 5' de MAD20 e a região 3' de RO33, denominada MR (Takala et al., 2002). Como o gene da MSP1 se encontra em cópia única (genoma haplóide), cada parasito só expressa uma das quatro famílias alélicas no bloco 2 (bloco repetitivo) e uma das duas famílias (MAD20 e K1) nos demais blocos. Um mecanismo importante na variabilidade alélica em MSP1 é a divisão meiótica do parasito, ocorrida no intestino do mosquito vetor, que se acredita seja dependente da intensidade de transmissão e que a recombinação frequente entre seus alelos de forma intermitente pode gerar novos alelos em regiões de alta transmissão (Tanabe et al., 2007).



**Figura 2.7: Esquema representativo do gene MSP1 . Fonte: (Roy et al., 2008).**

A relação entre a família alélica do gene MSP1 que um determinado parasito carrega e o quadro clínico do hospedeiro é bastante controversa. Segundo estudo de Anong et al., (2010) a co-infecção de diferentes genótipos de MSP1 (RO33 e K1) levou 57,7% dos pacientes pesquisados a desenvolver anemia grave, febre e alta

parasitemia. A família K1 foi associada a infecções assintomáticas em outros dois estudos (Babiker et al., 1998; Amodu et al., 2005). Em contrapartida, outros trabalhos mostraram que indivíduos infectados com parasitos expressando a família alélica RO33 eram assintomáticos e os que possuíam genótipos relacionados com a família K1 desenvolviam malária grave (Ntoumi et al., 1996, Al-Yaman et al., 1997; Kun et al., 1998). Estudos em pacientes com malária grave mostraram uma superexpressão dos genes MSP1 e MSP2, (Ofusu-Okyere et al., 2001; Ranjit et al., 2005;).

A resposta imune protetora contra os motivos das famílias alélicas do bloco 2 da MSP1 também tem sido observada. Evidências sugerem que as famílias alélicas são mantidas por seleção, mas não se sabe ao certo como esse processo é controlado (Polley et al., 2003).

### **3)OBJETIVO GERAL**

Avaliar o perfil genético da infecção por *P. falciparum*, no município de Barcelos, médio rio Negro, estado do Amazonas, uma área de alto risco epidemiológico para malária e com presença de infecção plasmodial assintomática, usando como alvo o gene da MSP1.

#### **3.1) Objetivos específicos**

1. Avaliar a presença de infecções múltiplas por *P. falciparum* em indivíduos do município de Barcelos.
2. Avaliar a diversidade genética de parasitas circulantes no município de Barcelos.
3. Determinar se existe associação entre a diversidade genética e a presença de infecções múltiplas do *P. falciparum* com o desfecho clínico dos indivíduos infectados.

#### 4) JUSTIFICATIVA

A malária é uma doença endêmica na Amazônia brasileira; a epidemiologia é altamente complexa apresentando grande heterogeneidade com a existência de várias áreas que são caracterizadas por apresentar alto risco epidemiológico e transmissão permanente ao longo do ano. Em áreas de transmissão estável na África têm sido observadas infecções múltiplas (MOI) por diferentes genótipos de *P. falciparum* entre crianças assintomáticas e assume-se que este quadro pode estar relacionado à aquisição de imunidade clínica ou premunição, o que influencia o risco de ataques subsequentes de malária nestas populações. Acredita-se que a presença de multiplicidade da infecção é um bom indicador tanto do estado imune do indivíduo como do nível de transmissão dessas áreas. Não obstante, em regiões de baixa endemicidade esses resultados não têm sido confirmados.

A malária no continente Americano é classificada como de baixa endemicidade, quando comparada a áreas holo e hiperendêmicas da África. Nos últimos anos, em algumas áreas da Amazônia, há evidências da existência de indivíduos infectados por alguma das espécies plasmodiais que não apresentam manifestações clínicas da doença. Sabe-se que nessas áreas, em média, até 20% dos indivíduos podem ser assintomáticos e que a infecção pode ocorrer tanto por *P. vivax* quanto por *P. falciparum*. Não se conhecem quais são os determinantes biológicos, imunológicos e genéticos relacionados à presença de infecção assintomática nessas regiões da Amazônia. Também não é conhecida a diversidade genética dos parasitos nesta área, nem a multiplicidade das infecções, e sua associação com o desfecho clínico e o desenvolvimento de imunidade.

Este trabalho se propôs a estudar a diversidade genética e a presença de infecções múltiplas de *P. falciparum* utilizando como marcador a Proteína de Superfície do Merozoito 1 (MSP1) para determinar se existe associação entre os diferentes genótipos e o desfecho clínico da malária nessas áreas consideradas como instáveis para a transmissão. O conhecimento da genética populacional destes parasitos é de fundamental importância para posteriores estudos epidemiológicos envolvendo resistência a drogas e desenvolvimento de vacinas, levando em conta os genótipos circulantes na região.

## **5) MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1) Área de estudo**

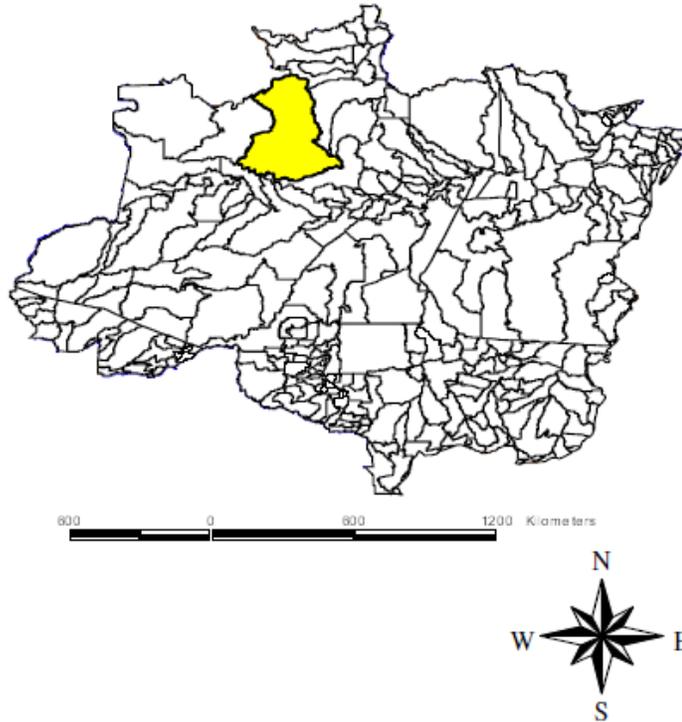
Este estudo foi realizado no município de Barcelos no médio rio Negro, estado do Amazonas, localizado a 390 km (em linha reta) e a 496 km (por via fluvial) da capital do estado, Manaus. Barcelos possui uma extensão territorial de 122.476 km<sup>2</sup> sendo considerado o segundo maior município do Brasil atrás apenas de Altamira no Pará. Faz fronteira ao norte com a Venezuela, ao sul com os municípios de Codajás e Maarã; ao leste com o estado de Roraima, ao oeste com o município de Santa Isabel do Rio Negro e ao sudeste com o município de Novo Airão (Figura 5.1).

O município possui uma população de 25.718 habitantes, sendo 43% urbana (10.058 pessoas) e 57% rural (15.660 pessoas). A densidade demográfica é de 0,21 hab/ km<sup>2</sup> (IBGE, 2010a).

A vegetação é composta por floresta equatorial úmida, com temperatura média anual de 28°C, e média pluviométrica anual superior a 2.800 milímetros. A sazonalidade das chuvas é uma característica marcante da região. A estação chuvosa tem seu início nos meses de março e abril, atingindo seu clímax nos meses de julho e agosto, quando vastas áreas são inundadas pelas águas dos rios. A estação seca inicia-se em outubro e vai até março. A umidade relativa do ar é alta, em média, de 89%, podendo chegar a quase 100% conforme as mudanças de temperaturas (Rojas & Toledo, 1998).

O solo da região é laterítico, e os principais componentes são os hidróxidos de alumínio e de ferro, sendo um solo inapropriado para a agricultura. Nas áreas de várzea, o solo é mais jovem e agricultável devido aos depósitos de matéria orgânica trazidos pelos rios durante as cheias.

Barcelos é banhada pelos rios Negro, Padauri, Unini, Jufaris, Jurubaxi, Aracá, Caurés e Demeni, em cujas margens encontram-se as principais localidades do município.



**Figura 5.1: Mapa do estado do Amazonas com destaque para o Município de Barcelos (amarelo). Fonte: Suárez-Mutis 2007.**

## **5.2. Desenho do estudo**

Os indivíduos foram recrutados usando duas abordagens diferentes:

- 1) Busca passiva: Indivíduos com sintomas de malária que foram atendidos nos postos da Secretaria de Saúde Municipal de Barcelos e com resultado positivo na gota espessa para *Plasmodium falciparum*;
- 2) Busca ativa com rastreamento domiciliar: Estudos seccionais foram realizados no município de Barcelos (entre novembro e dezembro de 2006 e setembro de 2007) usando um sistema aleatório entre os habitantes dos bairros peri-urbanos do município e da área rural. Esses estudos seccionais pretendiam detectar portadores de infecção assintomática para *P. falciparum*.

Todas as pessoas foram informadas devidamente sobre os objetivos do estudo e aquelas que concordaram em participar e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foram incluídas na pesquisa. Em caso de menores de 18 anos, a assinatura do TCLE foi solicitada ao responsável do menor. Em todos os casos foi aplicado um questionário individual que visava responder perguntas sobre informações demográficas, antecedentes de migração, história pregressa de malária, data da última malária, espécie parasitária, etc. Foi realizado exame de gota espessa pelos funcionários da Gerência de endemias do município usando os protocolos padronizados do Ministério de Saúde. Simultaneamente foram coletados cinco mililitros de sangue total em tubos vacutainer® com EDTA que foram guardados em freezer à -20°C para posterior extração de DNA e realização de provas moleculares. As amostras foram coletadas por Martha Cecilia Suárez-Mutis e Simone Santos da equipe de pesquisa.

Como critérios de inclusão foram considerados todas as pessoas maiores de um ano infectadas pelo *P. falciparum*. Foram usados como critérios de exclusão, não ser moradores da área de estudo, não desejar participar do estudo e ser portador de malária grave.

### **5.3) Definição de casos:**

#### **5.3.1) Caso de malária por *P. falciparum***

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

### **5.3.2) Caso de infecção assintomática**

Definido como todos os indivíduos positivos para infecção plasmodial na PCR, sem ter apresentado sintomas da doença 30 dias antes e 30 dias depois de coletadas as amostras biológicas e sem ter tomado medicamentos antimaláricos nem antibióticos no mesmo período. Essas são as definições usadas pelo Grupo Brasileiro de consenso em estudos de infecção plasmodial assintomática.

Devido à gravidade que envolve uma infecção patente com *P. falciparum*, todos os indivíduos diagnosticados com gota espessa positiva foram tratados e excluídos do estudo independentemente do status de portador assintomático ou caso de malária clínica.

Foram analisadas 79 amostras de sangue periférico de pacientes residentes em Barcelos, estado do Amazonas, todos positivos para *P. falciparum* (por gota espessa e/ou PCR diagnóstico); dos 79 indivíduos, 52 pacientes (65,82%) estavam com malária na ocasião da coleta de sangue e 27 (34,18%) eram portadores de infecção assintomática por *P. falciparum*.

### **5.4) Métodos de coleta de amostras**

Foram coletados cinco ml de sangue periférico de cada indivíduo utilizando tubos Vacutainer® com anticoagulante (EDTA) para posterior análise molecular.

### **5.5) Extração de DNA**

O DNA foi extraído a partir de 200 µl de sangue total, utilizando-se kit comercial DNA Purification Kit (Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit – GE Healthcare ®), seguindo instruções do fabricante: foram adicionados 20µl de proteinase K aos 200 µl de sangue e a mistura foi deixada por 10 minutos a temperatura ambiente para a lise celular. O lisado foi transferido para colunas de sílica e centrifugadas a 11.000 x g por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado; foram adicionados 500µl de tampão de lise e

os tubos foram novamente centrifugados a 11.000 x g por 1 minuto e o sobrenadante novamente descartado. Em seguida foram adicionados 500µl de tampão de lavagem sendo os tubos centrifugados a 11.000 x g por 1 minuto e o sobrenadante novamente descartado. Este procedimento foi repetido. Após lavagem, foram adicionados 200µl de tampão de eluição previamente aquecido a 70°C, incubados por 1 minuto a temperatura ambiente. Após esse período, as colunas foram transferidas para tubos limpos e devidamente identificados e foram centrifugadas a 11.000 x g por 1 minuto. As amostras de DNA extraídas foram estocadas a -20°C para posterior quantificação e realização dos experimentos de PCR diagnóstico e genotipagem. A extração de DNA foi executada em capela apropriada para este tipo de procedimento.

#### **5.6) PCR diagnóstico para *Plasmodium sp***

Trata-se de uma PCR aninhada (nested). Esta técnica é empregada para a detecção da presença ou não do *Plasmodium*, pois em infecções assintomáticas a parasitemia é muito baixa, e muitas vezes as formas plasmodiais não são detectadas no exame de gota espessa. O procedimento baseia-se no protocolo de Snounou e colaboradores (1993, 1996) com algumas modificações. Realiza-se uma primeira amplificação para a identificação de um fragmento gênero-específico seguido de uma segunda amplificação de um fragmento espécie-específico (Nested PCR). Não se realiza eletroforese entre a primeira e segunda PCR para evitar a contaminação. (Quadros 5.1 a 5.3).

**Quadro 5.1: Iniciadores da primeira PCR diagnóstica.**

Iniciadores PCR diagnóstico (primeira reação)		
nome	Sequência 5'-3'	Tm (°C)
Plu5	CTTGTTGTTGCCTTAAATTTC	43
Plu6	TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG	41

**Quadro 5.2: Iniciadores da segunda PCR diagnóstica.**

Iniciadores da segunda reação		
nome	Sequência 5'-3'	Tm (°C)
Fal1	TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT	48
Fal2	ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC	55
Viv1	CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC	54
Viv2	ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA	55
Mal1	ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC	51
Mal2	AAAATTCCTGCATAAAAAATTATACAAA	46

**Quadro 5.3: Mix de reagentes da primeira PCR diagnóstica.**

MIX PCR NESTED DIAGNÓSTICO – PRIMEIRA REAÇÃO		
Reagente	Concentração/25ul	Volume(ul)
H <sub>2</sub> O		16,9ul
Tampão10x(Invitrogen®)	1x	2,5ul
MgCl <sub>2</sub> 50 mM (Invitrogen®)	1,5 mM	1ul
dNTP 10 Mm	0,12 mM	0,3ul
Iniciador Plu5 10 mM	240 nM	0,6ul
Iniciador Plu6 10 mM	240 nM	0,6ul
Taq (Invitrogen®) 5U/ul	0,5 U	0,1ul
DNA	10-50ng	3ul

Todos os experimentos foram realizados em capelas exclusivas para o preparo de PCR e todos os reagentes foram mantidos no gelo durante a preparação dos experimentos.

O perfil térmico da primeira PCR diagnóstica foi:

**Quadro 5.4: Perfil térmico da primeira PCR diagnóstica.**

Perfil térmico- Primeira reação		
Temperatura	Tempo	Ciclos
95°C	5min	1
94°C	1min	
58°C	2min	25
72°C	2min	
72°C	5min	1
4°C	∞	

Os produtos da primeira PCR foram utilizados como molde para a realização da segunda reação. No quadro 5.5. são descritos os reagentes e suas concentrações usadas na segunda PCR.

**Quadro 5.5: Mix de reagentes da segunda PCR diagnóstica.**

MIX PCR NESTED DIAGNÓSTICO – SEGUNDA REAÇÃO		
Reagente	Concentração/25ul	Volume(ul)
H2O		18,9ul
Tampão10x (Invitrogen®)	1x	2,5ul
MgCl 250mM (Invitrogen®)	1,5 mM	1ul
dNTP mix 10mM	0,12 mM	0,3ul
Iniciador Fal1/Viv1/Mal1 10mM	240 nM	0,6ul
Iniciador Fal2/Viv2/Mal2 10mM	240 nM	0,6ul
Taq (Invitrogen®) 5U/ml	0,5 U	0,1ul
Produto da primeira PCR		1ul

Todos os experimentos foram realizados em capelas exclusivas para o preparo de PCR e todos os reagentes e as amostras de DNA foram mantidos no gelo. No quadro 5.6. são descritas as condições para a realização da reação espécie-específica.

**Quadro 5.6: Perfil térmico da segunda PCR diagnóstica.**

Perfil térmico PCR diagnóstico – Segunda Reação		
Temperatura	Tempo	Ciclos
95°C	5min	1
94°C	1min	
58°C	2min	30
72°C	2min	
72°C	5min	1
4°C	∞	

Os produtos da segunda PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% em tampão tris-borato-EDTA 0,5x, sob corrente de 90 Volts. A sensibilidade de detecção é de níveis de parasitemia entre 0,01 e 0,001%, sendo adequado para o diagnóstico de infecções assintomáticas e latentes.

### **5.7) Genotipagem do gene MSP1**

A genotipagem para o gene MSP1 foi realizada através de uma PCR aninhada (nested), amplificando fragmentos do bloco 2 da MSP1, conforme protocolo da Agência Internacional de Energia Atômica-IAEA, (2003). Os tamanhos dos fragmentos da primeira reação têm em torno de 800 pares de bases e os fragmentos da segunda reação podem variar entre 400 e 700 pares de bases. Foram utilizados os seguintes iniciadores:

**Quadro 5.7: Iniciadores da primeira reação MSP1.**

Iniciadores - MSP1 – PRIMEIRA REAÇÃO		
Nome	Sequência 5'-3'	T <sub>m</sub> (°C)
O1	CACATGAAAGTTATCAAGAACTTGTC	53
O2	GTACGTCTAATTCATTTGCACG	52

**Quadro 5.8: Iniciadores da segunda reação MSP1.**

Iniciadores - MSP1 – SEGUNDA REAÇÃO		
Nome	Sequência 5'-3'	T <sub>m</sub> (°C)
N1	GCAGTATTGACAGGTTATGG	52
N2	GATTGAAAGGTATTTGAC	51

A primeira PCR do gene MSP1 teve seu mix preparado da seguinte maneira:

**Quadro 5.9: Mix de reagentes da primeira PCR MSP1.**

PCR NESTED MSP1 – PRIMEIRA REAÇÃO		
Reagente	Concentração/20ul	Volume (ul)
H <sub>2</sub> O		13,5ul
Tampão 10x (Invitrogen®)	1x	2ul
MgCl <sub>2</sub> 50mM (Invitrogen®)	1,5mM	1,5ul
BSA	10ug/ml	0,2ul
dNTP mix 20uM	0,2uM	0,2ul
Iniciador O1 10uM	5pmol	0,2ul
Iniciador O2 10uM	5pmol	0,2ul
Taq (Invitrogen®) 5U/ul	1U	0,2ul
DNA	10-50ng	2ul

Todos os experimentos foram realizados em capelas exclusivas para o preparo de PCR e todos os reagentes e as amostras de DNA foram mantidos no gelo durante a preparação dos experimentos.

**Quadro 5.10: Perfil térmico da primeira reação MSP1.**

Perfil térmico - MSP1 – PRIMEIRA REAÇÃO		
Temperatura	Tempo	Ciclos
94°C	3min	1
94°C	25seg	
50°C	35seg	30
68°C	2min30seg	
72°C	3min	1
4°C	∞	

O segundo ciclo de amplificação foi realizado usando-se o mix de reação abaixo:

**Quadro 5.11: Mix de reagentes da segunda PCR MSP1.**

PCR NESTED MSP1 – SEGUNDA REAÇÃO		
Reagente	Concentração/20ul	Volume(ul)
H <sub>2</sub> O		13,5ul
Tampão 10x (Invitrogen®)	1x	2ul
MgCl <sub>2</sub> 50mM (Invitrogen®)	1,5mM	1,5ul
BSA	10mg/ml	0,2ul
dNTP mix 20uM	0,2uM	0,2ul
Iniciador N1 10uM	5pmol	0,2ul
Iniciador N2 10uM	5pmol	0,2ul
Taq (Invitrogen®)5U/ul	1U	0,2ul
DNA	10-50ng	2ul

Todos os experimentos foram realizados em capelas exclusivas para o preparo de PCR e todos os reagentes, assim como o mix e as amostras de DNA foram mantidos no gelo durante a preparação dos experimentos.

**Quadro 5.12: Perfil térmico - MSP1 – SEGUNDA REAÇÃO**

Temperatura	Tempo	Ciclos
<b>94°C</b>	25seg	
<b>50°C</b>	35seg	30
<b>68°C</b>	2min30seg	
72°C	3min	1
4°C	∞	

Cinco microlitros de cada produto da segunda PCR foram visualizados em géis de agarose 2% em tampão TBE 0,5x sob corrente de 90V. Os géis foram corados com Brometo de Etídio por 5 minutos, descorados em água por 20 minutos e visualizados através de transiluminador UV. As imagens dos géis foram obtidas através do programa QuantityOne®.

### **5.8) Análise estatística**

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

### **5.9) Aspectos éticos:**

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

## 6) RESULTADOS

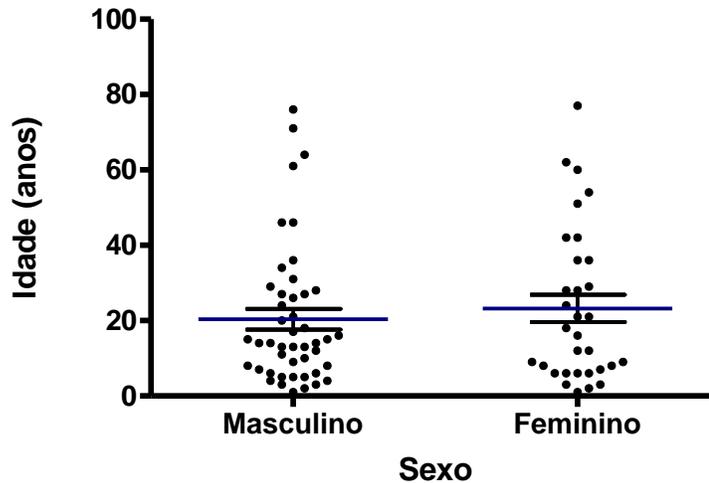
### 6.1) Aspectos demográficos

No total, foram avaliados 79 indivíduos moradores do município de Barcelos. Deles, 47 (59,49%) eram de sexo masculino e 32 (40,51%) do sexo feminino. A média de idade foi de 21,55 ±19,31 anos (IC95%: 17,20-25,91; mediana de 14,50 anos). A criança mais nova tinha um ano e o indivíduo com maior idade tinha 77 anos. Ao dividir os grupos por faixa etária foi observado que 40 (50,62%) eram crianças com 15 anos ou menos, sendo que 13 (16,45%) tinham cinco anos ou menos. Somente nove (11,39%) indivíduos tinham mais de 50 anos (Tabela 6.1).

**Tabela 6.1. Número de indivíduos segundo faixa etária.**

<b>Faixa etária</b>	<b>Número</b>	<b>Percentual</b>
≤ 5 anos	13	16,45
Entre 6 e 9 anos	15	18,98
Entre 10 e 15 anos	13	16,45
Entre 16 e 49 anos	29	36,71
≥ 50 anos	9	11,39
Total	79	100

Entre os homens, a média de idade foi de 20,39±18,60 anos (IC95%: 14,87-25,91, mediana de 14 anos) e entre as mulheres, a média de idade foi de 23,22±20,48 anos (IC95%: 15,84-30,60, mediana de 17 anos). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na média da idade quando comparados os sexos feminino e masculino ( $p=0,6694$ ). (Figura 6.1).



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

Ao avaliar a escolaridade foi observado que todas as crianças com idade entre seis e nove anos, frequentavam a escola; nas pessoas entre 10 e 15 anos, 12 (92,31%) estudavam, e apenas um (7,69%) já possuía o ensino fundamental completo. Entre os menores de cinco anos, seis (46,15%) frequentavam alguma creche.

Na população adulta (entre 16 e 49 anos) apenas dois indivíduos (6,66%) estudavam. Cinco pessoas (16,66%) possuíam o ensino médio completo, cinco (16,66%) concluíram o ensino fundamental e 12 indivíduos (40,02%) possuíam o ensino fundamental incompleto. Não consta a escolaridade de seis pessoas (20,00%) desta faixa etária. Entre os indivíduos maiores de 50 anos, uma paciente tinha o ensino médio completo (11,11%); um estava alfabetizado (11,11%), um paciente era analfabeto (11,11%). Os demais possuíam o ensino fundamental incompleto (66,67%).

Não havia pessoas cursando ou que haviam concluído os ensinos técnico e/ou superior em nenhuma faixa etária. O nível de escolaridade da população estudada é apresentado na tabela 6.2.

**Tabela 6.2. Classificação dos pacientes conforme nível de escolaridade**

Nível de escolaridade	Número de pessoas	%
Analfabetos/não estudam	8	10,12
Alfabetizados	1	1,26
Educação Infantil	11	13,92
Ensino Fundamental em curso	20	25,31
Ensino Fundamental incompleto	18	22,78
Ensino Fundamental completo	7	8,86
Ensino Médio em curso	1	1,26
Ensino Médio completo	6	7,59
Não consta	7	8,86
<b>TOTAL</b>	<b>79</b>	<b>100</b>

Para avaliar a ocupação dos indivíduos da população estudada, foram adotados critérios para inserção das profissões nos setores do mercado de trabalho segundo a classificação usada pelo IBGE. No setor denominado “Trabalhadores agropecuários, florestais, caça e pesca” (CBO – GG6) foram inseridas as seguintes profissões: agricultor, piaçabeiro, pescador, madeireiro e palmitero. No setor “Trabalhadores de produção de bens e serviços industriais” (CBO – GG7) foram inseridas as profissões: ajudante de pedreiro, artesão e marceneiro. No setor “trabalhadores dos serviços” (CBO – GG5) estão as ocupações: comerciante, turismo, barcos de viagem, barcos de turismo, ajudante de comércio, açougueiro e bilheteiro de parque de diversões (IBGE, 2010b). São considerados “menores”, crianças de até cinco anos que ainda não frequentam creches ou escolas. A classificação e o número de indivíduos encontrados neste estudo estão expostos na tabela 6.3.

**Tabela 6.3. Classificação dos indivíduos de acordo com a ocupação**

Setores do mercado de trabalho	Número de pessoas	%
Trabalhadores agropecuários, florestais, caça e pesca	13	16,45
Trabalhadores de produção de bens e serviços industriais	3	3,79
Trabalhadores dos serviços Domésticas	6	7,59
Estudantes	4	5,06
Aposentados	33	41,77
Funcionários públicos	3	3,79
Menores	2	2,53
Desocupados	7	8,86
Não consta	3	3,79
TOTAL	5	6,32
	79	100

Foi investigado também o local de nascimento e o local de moradia atual. Os indivíduos foram classificados de acordo com o local de nascimento da seguinte maneira: indivíduos nascidos em municípios no Estado do Amazonas, nascidos em outros Estados da Amazônia Legal e nascidos em Estados extra-amazônicos, conforme tabela 6.4. A maior parte dos indivíduos é natural do Estado do Amazonas (72/79, 91,14%).

**Tabela 6.4: Classificação dos indivíduos de acordo com o local de nascimento.**

<b>Local de nascimento</b>	<b>Número de pessoas</b>	<b>%</b>
<b>Estado do Amazonas</b>		
Barcelos	47	59,49
Santa Isabel do Rio Negro	11	13,92
São Gabriel da Cachoeira	4	5,06
Manaus	6	7,59
Lábrea	1	1,26
Manicoré	1	1,26
Novo Airão	2	2,53
<b>Total estado do Amazonas</b>	<b>72</b>	<b>91,14</b>
Outros estados Amazônia Legal	4	5,06
Estados extra-amazônicos	2	2,53
Não consta	1	1,26
<b>TOTAL</b>	<b>79</b>	<b>100</b>

A maior parte dos indivíduos havia nascido no município de Barcelos (47 pessoas, 59,49%) ou Santa Isabel do Rio Negro (11 pessoas, 13,92%). Os pacientes de outros estados da Amazônia Legal eram provenientes dos Estados de Roraima (2), Pará (1) e Maranhão (1) e as pessoas que nasceram nos estados extra-amazônicos eram provenientes de Minas Gerais (1) e Paraná (1).

A tabela 6.5 mostra o local de nascimento dos indivíduos nascidos em Barcelos, sendo que 23 pessoas (48,93%) nasceram na sede do município.

**Tabela 6.5: Classificação dos indivíduos nascidos em diferentes localidades de Barcelos.**

Localidade	Número de pessoas	%
Centro	23	48,93
Pedro II	2	4,25
Caburiz	1	2,12
Samaúma	1	2,12
Acuquaia	5	10,63
Ararã	1	2,12
Oculo	1	2,12
Mamuari	1	2,12
Floresta I	1	2,12
Jacitara	1	2,12
Jauari	1	2,12
Jurubaxi	1	2,12
Acu- Acu	1	2,12
Bacucuara	1	2,12
S. Sebastião	1	2,12
Mariuí	2	4,25
Maitá	1	2,12
Marará	1	2,12
S. Inês	1	2,12
<b>TOTAL</b>	<b>47</b>	<b>100</b>

Sobre a localidade da residência no momento do estudo pôde ser observado que a maior parte dos indivíduos morava na área urbana do município (69/79, 88,21%). (Tabela 6.6).

**Tabela 6.6. Classificação dos pacientes de acordo com o local de residência.**

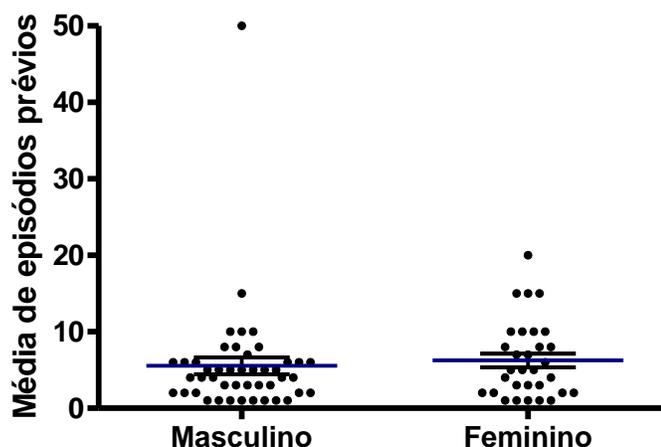
Local de residência	Número de pessoas	%
<b>Área urbana</b>		
São Sebastião	19	24,05
Nazaré	5	6,32
Aparecida	9	11,39
São Francisco	4	5,06
Bairro da Paz	3	3,79
São Lázaro	6	7,59
Mariué	23	29,11
<b>Total área urbana</b>	<b>69</b>	<b>88,21</b>
<b>Área rural</b>		
Marará	1	1,26
Padauri	6	7,59
<b>Total área rural</b>	<b>7</b>	<b>8,86</b>
<b>Outros</b>		
Mora no barco (viajante)	1	1,26
Não consta	2	2,53
<b>TOTAL</b>	<b>79</b>	<b>100,0</b>

## **6.2) Antecedentes de malária**

Dos 79 indivíduos estudados, 76 (96,20%) tiveram malária previamente, um paciente era primo-infectado (1,26%) e não foram encontradas informações sobre malária prévia em dois indivíduos (2,53%).

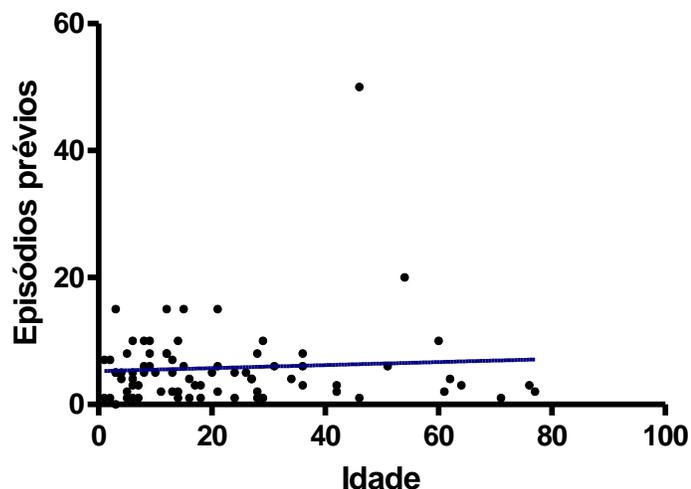
Entre os indivíduos com história de malária prévia, a média de episódios anteriores de malária foi de  $5,84 \pm 6,5$  (IC95%: 4,4–7,3, mediana de cinco episódios); o número mínimo de infecções anteriores foi de um, e máximo de aproximadamente 50 vezes.

No total, 45 (95,74%) homens reportaram malária previamente ao estudo. A média de episódios anteriores foi de  $5,6 \pm 7,4$  (IC95%: 3,3-7,8, mediana de quatro episódios), sendo que um indivíduo assegurou não ter tido episódios prévios. Entre as mulheres, 31 (91,17%) tiveram malária antes do estudo sendo que a média de episódios prévios foi de  $6,3 \pm 5$  (IC95%: 4,4-8,1, mediana de cinco episódios). Não foram encontradas diferenças significativas na média de episódios prévios segundo o gênero ( $p=0,6466$ ). Figura 6.2.



**Figura 6.2: Média de episódios prévios de malária em todos os indivíduos estudados segundo o gênero.**

Ao se relacionar a idade com o número de malárias prévias não foi observada nenhuma correlação estatística ( $r$  Spearman:  $-0,046$  IC95%:  $-0,27-0,18$ ,  $p=0,6900$ ). (Figura 6.3).



**Figura 6.3: Número de episódios prévios x idade dos indivíduos.**

### **6.3) Status clínico**

Dos 79 indivíduos estudados, 27 (34,17%) tinham infecção plasmodial assintomática e 52 (65,83%) apresentaram quadro de malária clínica. Entre os assintomáticos, seis pessoas (22,22%) eram portadores de infecção mista por *P. falciparum* e *P. vivax*. Dos 52 indivíduos sintomáticos, 48 (92,31%) tinham monoinfecção pelo *P. falciparum* e 4 (7,69%) tinham infecção mista (*P. falciparum* e *P. vivax*). A tabela 6.7 mostra as principais informações desses dois grupos:

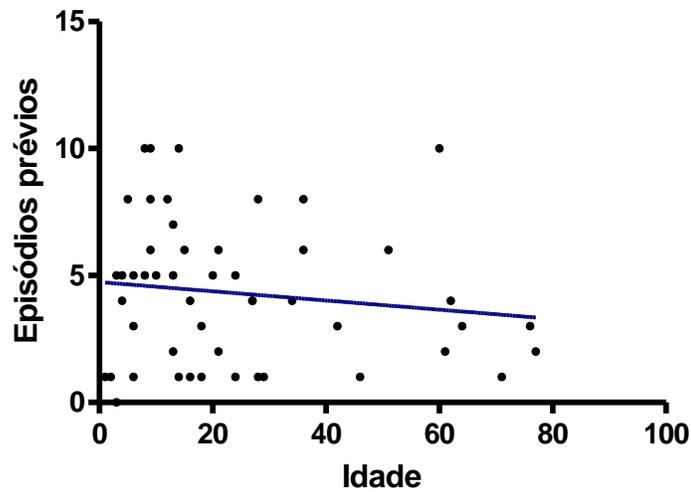
**Tabela 6.7: Distribuição dos indivíduos assintomáticos e com malária, comparando-os segundo número total, sexo, idade e número de episódios prévios da doença.**

	Assintomáticos		Malária		p-valor
	Número	Percentual	Número	Percentual	
	27	34,17	52	65,83%	
Sexo (%)					
Masculino	13	48,15	34	65,38	0,2463
Feminino	14	51,85	18	34,61	0,3409
Idade (média/DP)	M=16,85	DP=14,70	M=24,13	DP=20,87	0,1843
Episódios prévios (média/dp)	M=8,48	DP=9,81	M=4,15	DP=2,83	0,0996

Nota: DP= desvio padrão; M=Média

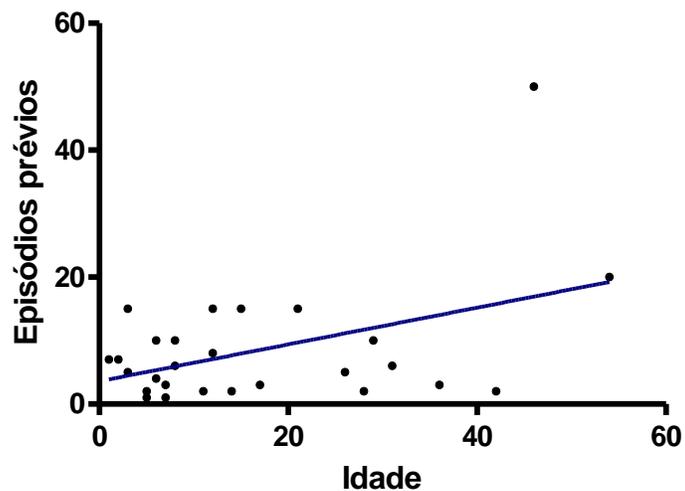
Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o gênero, média da idade e o número de episódios prévios da doença entre os indivíduos com malária e os infectados assintomáticos.

A figura 6.4 mostra que não houve correlação entre o número de episódios prévios da doença e a idade nos 52 pacientes com malária clínica (r de Spearman: 0,00005, IC95%: -0,28-0,28, p=0,9972).



**Figura 6.4: Número de episódios prévios x idade em portadores de malária clínica.**

Entre os indivíduos assintomáticos também não foram encontradas correlações na idade e o número de episódios prévios ( $r$  de Spearman: 0,1701, IC95%: -0,2358-0,5254,  $p=0,3964$ ). (Figura 6.5).



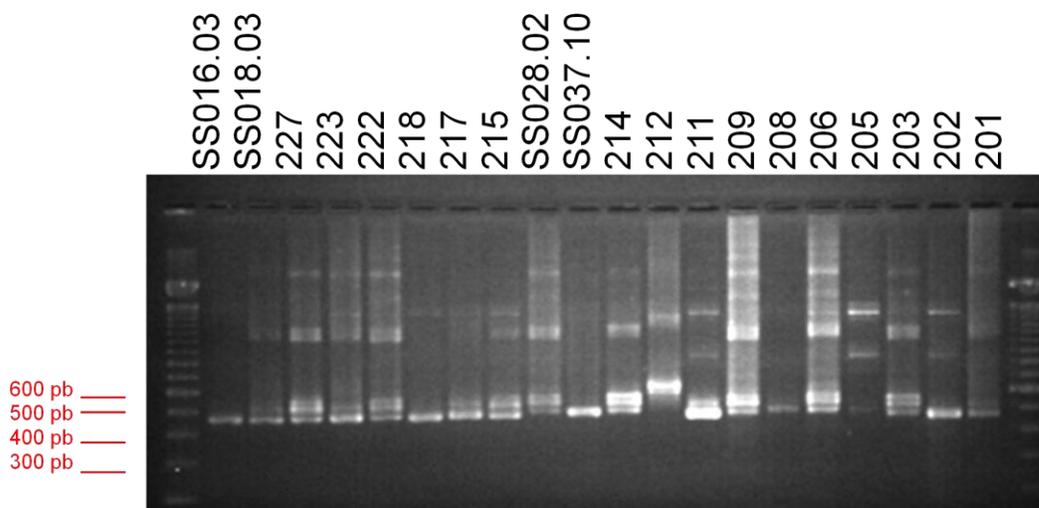
**Figura 6.5: Número de episódios prévios de malária x idade entre os indivíduos com infecção assintomática.**

## 6.4) Genotipagem do gene MSP1

### 6.4.1) Análise da diversidade genética

Os genótipos foram analisados de acordo com o tamanho das bandas dos produtos amplificados visualizados em gel de agarose. Foram encontradas bandas entre 400 e 700 pares de bases. Cada banda equivale a um genótipo diferente. Vários indivíduos apresentaram mais de um genótipo para o gene MSP1.

Na Figura 6.6 observam-se os tamanhos dos fragmentos amplificados dos 79 indivíduos. A tabela 6.8 mostra os resultados de diversidade genética para cada indivíduo.



**Figura 6.6a: Padrão de bandas referentes aos genótipos de MSP1 identificados nas amostras de indivíduos infectados com *P. falciparum* visualizados em gel de agarose 2%. Nas extremidades, observa-se o marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen®).**

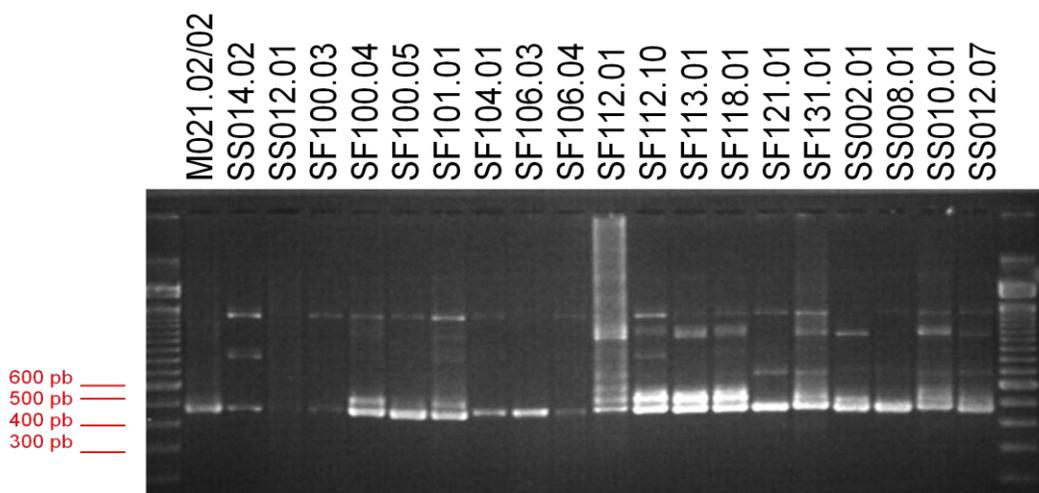


Figura 6.6b: Padrão de bandas referentes aos genótipos de MSP1 identificados nas amostras de indivíduos infectados com *P. falciparum* visualizados em gel de agarose 2%. Nas extremidades, observa-se o marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen®). (continuação)

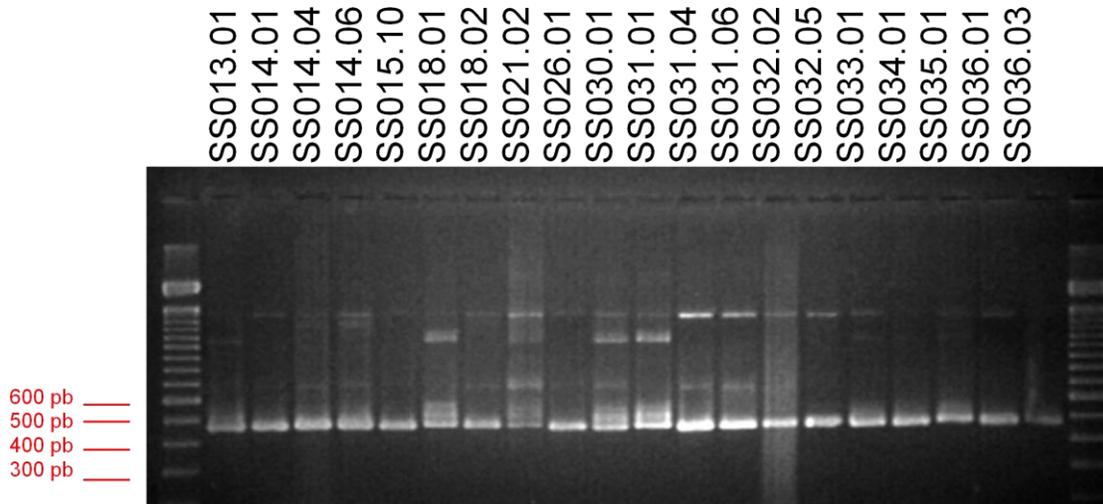
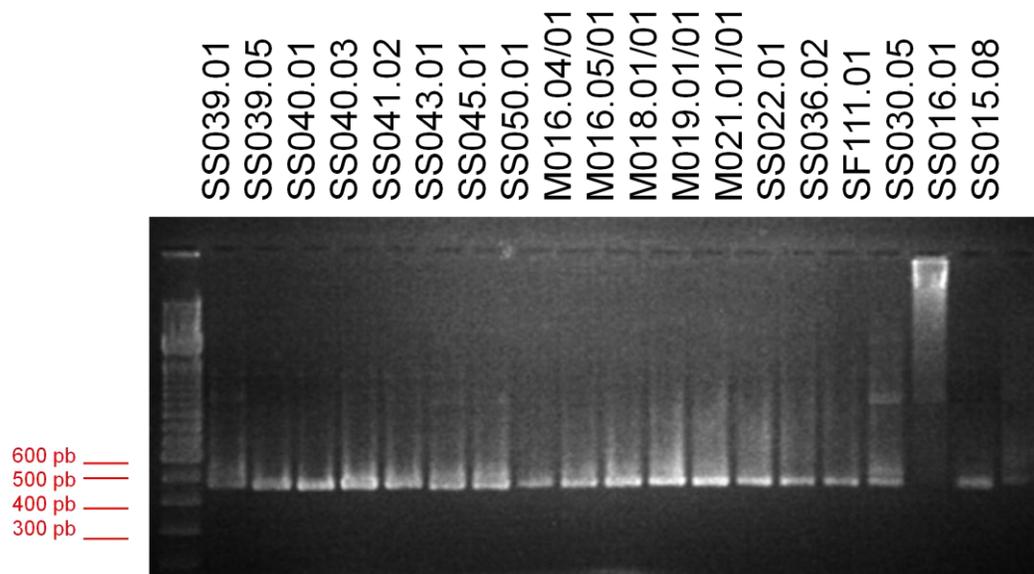


Figura 6.6c: Padrão de bandas referentes aos genótipos de MSP1 identificados nas amostras de indivíduos infectados com *P. falciparum* visualizados em gel de agarose 2%. Nas extremidades, observa-se o marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen®).(continuação)



**Figura 6.6d: Padrão de bandas referentes aos genótipos de MSP1 identificados nas amostras de indivíduos infectados com *P. falciparum* visualizados em gel de agarose 2%. Nas extremidades, observa-se o marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen®). (continuação)**

**Tabela 6.8: Distribuição dos genótipos identificados em cada indivíduo.**

Código do indivíduo	Status clínico*	Tamanho das bandas visualizadas em gel agarose										Total Genótipos
		400	470	480	490	500	520	580	600	650	700	
SF111.01	M			X		X						2
SS014.02	A			X								1
SS015.08	A					X						1
SS016.03	A		X									1
SS018.03	A		X			X						2
SS022.01	M			X								1
SS028.02	M					X	X					2
SS030.05	A		X									1
SS036.01	M					X						1
SS037.10	A					X						1
M016.04/01	A			X								1
M016.05/01	M			X								1
M018.01/01	A			X								1
M019.01/01	A			X								1
M021.01/01	M			X								1
M021.02/02	A			X								1
201	M		X									1
202	M		X									1
203	M		X			X	X					3
205	M			X								1
206	M			X		X	X					3
208	M		X									1
209	M		X			X	X		X			4
211	M		X			X						2
212	M								X			1
214	M					X	X	X				3
215	M			X		X						2
217	M			X		X						2
218	M		X									1
222	M			X		X	X					3
223	M		X			X						2
227	M		X			X	X					3
SF100.03	A			X								1
SF100.04	A			X								1
SF100.05	A	X	X									2
SF101.01	M	X	X		X							3
SF104.01	M				X							1
SF106.03	A				X							1
SF106.04	A				X							1

SF112.01	M		X		X			X	X			4
SF112.10	A	X			X							2
SF113.01	M	X			X							2
SF118.01	M	X			X							2
SF121.01	M		X							X		2
SF131.01	M			X	X					X		3
SS002.01	M		X		X							2
SS008.01	M		X									1
SS010.01	M			X	X					X		3
SS012.01	M		X									1
SS012.07	M		X							X		2
SS013.01	A	X			X							2
SS014.01	M		X									1
SS014.04	A			X						X		2
SS014.06	A			X						X		2
SS015.10	A			X								1
SS016.01	M		X									1
SS018.01	M				X	X		X				3
SS018.02	M				X					X		2
SS021.02	M				X					X		2
SS026.01	A				X							1
SS030.01	M				X	X		X		X		4
SS031.01	M				X	X		X				3
SS031.04	A	X								X		2
SS031.06	A				X					X		2
SS032.02	M				X							1
SS032.05	A				X							1
SS033.01	M				X							1
SS034.01	M				X							1
SS035.01	M				X							1
SS036.02	M		X									1
SS036.03	A		X									1
SS039.01	M		X									1
SS039.05	A	X										1
SS040.01	M	X										1
SS040.03	A	X										1
SS041.02	M	X										1
SS043.01	M	X										1
SS045.01	M	X										1
SS050.01	M		X									1
Total		2	25	28	9	36	10	1	6	1	11	129

\*M: Malária; A: Portador assintomático.

No total foram encontrados 10 genótipos diferentes (10 bandas de diferentes tamanhos), sendo que 36 indivíduos (45,57%) possuíam um genótipo referente à banda de 500 pb, 28 (35,44%) portavam um genótipo referente à banda de 480 pb e 25 (31,65%) tinham um genótipo referente à banda de 470 pb. (Tabela 6.9).

**Tabela 6.9: Diversidade da infecção por diferentes genótipos encontrados nos indivíduos infectados por *P. falciparum* no município de Barcelos, Amazonas.**

Genótipo	Tamanho da banda (pb)	Número de indivíduos (n=79)	Porcentagem
1	400	2	2,53
2	470	25	31,65
3	480	28	35,44
4	490	9	11,39
5	500	36	45,57
6	520	10	12,66
7	580	1	1,27
8	600	6	7,59
9	650	1	1,27
10	700	11	13,92

A tabela 6.10 mostra a distribuição dos genótipos de acordo com o gênero. Os genótipos 2 (470 pb) e 5(500pb) foram os mais frequentes entre as mulheres e os genótipos 3 (480pb) e 5 (500 pb) foram os mais frequentes entre os homens. Foi encontrada uma diferença significativa ao se comparar os percentuais de homens e mulheres portadores do genótipo 3 (480 pb,  $p=0,0375$ ).

**Tabela 6.10. Diversidade de genótipos de acordo com o gênero: números e percentuais de homens e mulheres portadores dos diversos genótipos de acordo com o tamanho das bandas.**

Genótipo	Tamanho da banda	Feminino (n=32)		Masculino (n=47)		Total		p-valor
		N	%	n	%	N	%	
1	400	2	6,25	0	0	2	2,53	-
2	470	14	43,75	11	23,4	25	31,64	0,0562
3	480	7	21,67	21	44,68	28	35,44	<b>0,0375</b>
4	490	4	12,5	5	10,63	9	11,39	0,9163
5	500	14	43,75	22	46,8	36	45,57	0,7887
6	520	2	6,25	8	17,02	10	12,66	0,2851
7	580	1	3,12	0	0	1	1,26	-
8	600	1	3,12	5	10,63	6	7,59	0,4208
9	650	1	3,12	0	0	1	1,26	-
10	700	4	12,5	7	14,89	11	13,92	-

Também foi analisada a distribuição dos genótipos de acordo com a faixa etária da população de estudo, como mostra a tabela 6.11.

**Tabela 6.11: Diversidade da infecção de acordo com a idade: números e percentuais de indivíduos portando diferentes números de genótipos.**

Genótipo	Idade Banda	≤ 5 (n=13)		6 - 9 (n=14)		10-15 (n=13)		16-49 (n=30)		≥50 (n=9)		Total		p-valor
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
1	400	1	7,69	0	0	0	0	1	3,33	0	0	2	2,52	-
2	470	2	15,38	3	21,42	5	38,46	13	43,33	2	22,22	25	31,6	0,3075
3	480	7	53,84	6	42,85	3	23,07	8	26,66	4	44,44	28	35,4	0,3475
4	490	7	53,84	2	14,28	0	0	0	0	0	0	9	11,4	-
5	500	5	38,46	6	42,85	7	53,84	12	40,00	6	66,66	36	45,6	0,6170
6	520	2	15,38	2	14,28	0	0	5	16,66	1	11,11	10	12,7	0,6517
7	580	1	7,69	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1,26	-
8	600	5	38,46	1	7,14	0	0	0	0	0	0	6	7,59	-
9	650	0	0	0	0	1	7,69	0	0	0	0	1	1,26	-
10	700	0	0	1	7,14	5	38,46	4	13,33	1	11,11	11	13,9	0,0553
Total		30		23		21		42		14		129 100		

Na tabela 6.12 foi verificada a diversidade de genótipos de acordo com o desfecho clínico. No total, 29,62% dos indivíduos assintomáticos e 53,85% dos pacientes com malária clínica estavam infectados com o genótipo 5 (500 pb). Essa diferença foi estatisticamente significativa ( $p=0,0403$ ). Da mesma forma, o genótipo 6 (520 pb) não foi encontrado em nenhum indivíduo assintomático, enquanto que 19,23% dos pacientes com malária clínica estavam infectados com esse genótipo. Essa diferença também foi estatisticamente significativa ( $p=0,0373$ ).

**Tabela 6.12: Diversidade de genótipos de acordo com o desfecho clínico.**

Genótipo	Tamanho da banda	Assintomáticos		Malária		Total		p-valor
		n (27)	%	n(52)	%	N	%	
1	400	1	3,7	1	1,92	2	2,53	-
2	470	9	33,33	16	30,77	25	31,64	0,8162
3	480	8	29,62	20	38,46	28	35,44	0,4363
4	490	5	18,51	4	7,69	9	11,39	0,2876
5	500	8	29,62	28	53,85	36	45,57	<b>0,0403</b>
6	520	0	0	10	19,23	10	12,66	<b>0,0373</b>
7	580	0	0	1	1,92	1	1,26	-
8	600	0	0	6	11,5	6	7,59	0,165
9	650	0	0	1	1,92	1	1,26	-
10	700	4	14,81	7	13,46	11	13,92	0,8588

Na tabela 6.13 observa-se que nas localidades do rio Padauri, 100% dos indivíduos foram portadores do genótipo 3 (480 bp); da mesma forma na localidade São Francisco, na área urbana do município 100% dos indivíduos portaram o genótipo 5 (500 bp).

**Tabela 6.13: Diversidade genotípica conforme o local de moradia: Frequências individuais dos genótipos/ bairro.**

Genótipo	Tamanho da banda	Localidade																						p valor
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		
		N	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
1	400	0	0	1	33,33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5,26	0	0	0	0	-
2	470	5	55,6	1	33,33	1	100	6	26,09	3	60	0	0	1	25	2	33,33	5	36,3	0	0	1	50	0,2129
3	480	4	44,4	2	66,7	0	0	7	30,4	0	0	6	100	1	25	2	33,33	6	31,6	0	0	0	0	<b>0,00262</b>
4	490	0	0	0	0	0	0	4	17,39	0	0	0	0	1	25	2	33,33	2	10,5	0	0	0	0	-
5	500	6	66,7	0	0	0	0	8	34,8	2	40	0	0	4	100	3	50	11	57,9	1	100	1	50	<b>0,0255</b>
6	520	4	44,4	0	0	0	0	1	4,4	2	40	0	0	0	0	0	0	3	15,8	0	0	0	0	-
7	580	0	0	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
8	600	1	11,1	0	0	0	0	1	4,35	1	20	0	0	0	0	1	16,7	2	10,5	0	0	0	0	-
9	650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	16,7	0	0	0	0	0	0	-
10	700	0	0	0	0	0	0	3	13	0	0	0	0	2	50	1	16,7	3	16	0	0	2	100	-

Nota: localidade: 1- Aparecida; 2- Bairro da Paz; 3- Marará; 4- Mariuá; 5- Nazaré; 6- Padauri; 7- São Francisco; 8- São Lázaro; 9- São Sebastião; 10- Mora no barco; 11- Não consta

Na tabela 6.14 foi feita uma análise da distribuição dos genótipos circulantes nas áreas rural ou urbana do município de Barcelos. Na área rural 75% dos indivíduos apresentaram o genótipo de número 3 (480 pb). Quando comparamos a porcentagem dos portadores do genótipo 3 da área rural e urbana (31%), foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,0377$ ). O genótipo número 5 (500 pb) foi o mais frequente na área urbana, mas não foram encontradas diferenças significativas quando comparados com os indivíduos da área rural que portavam esse genótipo.

**Tabela 6.14: Distribuição dos genótipos de MSP1 de *Plasmodium falciparum* circulantes nas áreas rural e urbana no município de Barcelos, Amazonas.**

Genótipo	Tamanho da banda	Rural		Urbano		Total		p-valor
		n (8)	%	n (71)	%	n	%	
1	400	0	0	2	2,81	2	2,53	-
2	470	1	12,5	24	33,8	25	31,64	0,4081
3	480	6	75	22	31	28	35,44	<b>0,0377</b>
4	490	0	0	9	12,67	9	11,39	-
5	500	1	12,5	35	49,29	36	45,57	0,1081
6	520	0	0	10	14,08	10	12,66	0,5652
7	580	0	0	1	1,4	1	1,26	-
8	600	0	0	6	8,45	6	7,59	-
9	650	0	0	1	1,4	1	1,26	-
10	700	0	0	11	15,49	11	13,92	0,5083

A distribuição dos genótipos conforme a estratificação epidemiológica de risco foi verificada comparando-se áreas de alta e média incidência de malária. O genótipo 5 (500 pb) foi o mais frequente tanto nas áreas de alto como nas de médio risco de transmissão. Não foram encontradas diferenças significativas ao comparar esses percentuais nas duas áreas (Tabela 6.15).

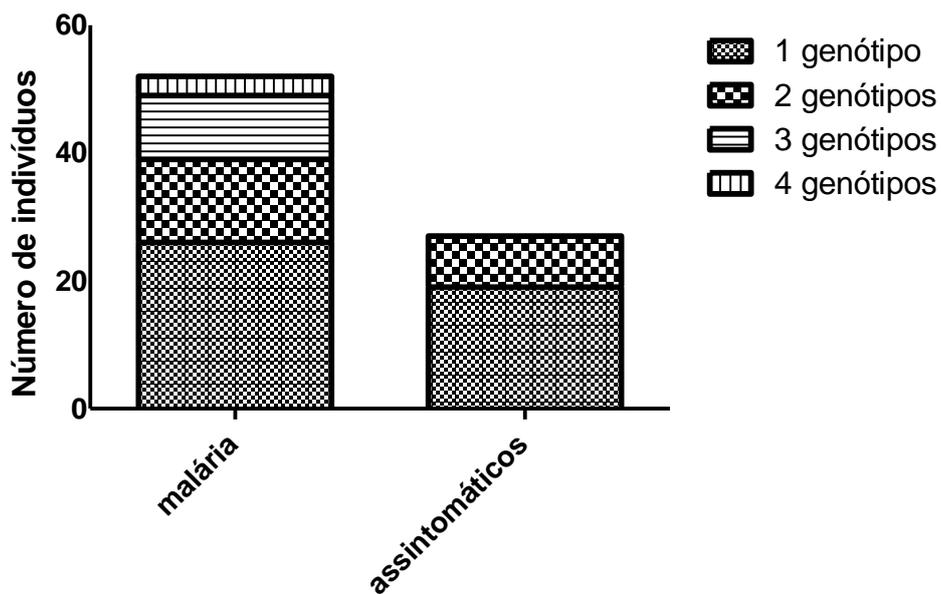
**Tabela 6.15: Distribuição de genótipos circulantes em áreas de alto e médio risco de transmissão de malária no município de Barcelos, Amazonas.**

Genótipo	Tamanho da banda	Alta incidência (n=61)		Média incidência (n=18)		Total		p-valor
		N	%	N	%	N	%	
1	400	1	1,64	1	5,55	2	2,53	-
2	470	17	27,87	8	44,44	25	31,64	0,1839
3	480	21	34,43	7	38,88	28	35,44	0,7279
4	490	8	13,11	1	5,55	9	11,39	0,642
5	500	25	40,98	11	61,11	36	45,57	0,1318
6	520	6	9,83	4	22,22	10	12,66	0,3244
7	580	1	1,64	0	0	1	1,26	-
8	600	5	8,19	1	5,55	6	7,59	0,8929
9	650	1	1,64	0	0	1	1,26	-
10	700	9	14,75	2	11,11	11	13,92	0,996

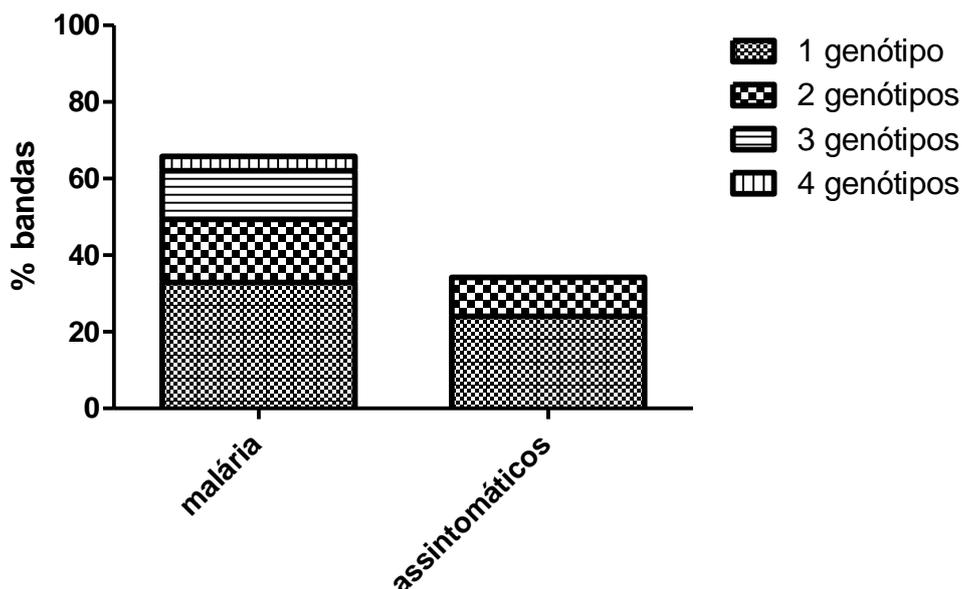
#### 6.4.2) Multiplicidade da infecção

No total, 45 indivíduos (56,96%) apresentam apenas um genótipo, 21 indivíduos (26,58%) dois genótipos, 10 indivíduos (12,65%) apresentaram três genótipos e três indivíduos (3,79%) tiveram quatro genótipos. A variabilidade dos genótipos variou de acordo com o desfecho clínico da malária. Dentre os pacientes com malária clínica, 26 (50%) apresentaram um genótipo; 13 (25%) dois genótipos, 10 (19,23%) três genótipos e outras três (5,77%) possuíam quatro genótipos. Nos indivíduos com infecção assintomática, 19 (70,37%)

possuíam um genótipo e 8 (29,63%) tinham dois genótipos do parasito. Não foram encontrados indivíduos assintomáticos com mais de dois genótipos simultaneamente. Em média, os indivíduos assintomáticos portavam 1,3 genótipos diferentes e os com malária clínica apresentaram 1,8 genótipos diferentes. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o percentual de pacientes com malária que apresentaram mais de dois genótipos (13/52, 25%) e os indivíduos assintomáticos que só foram encontrados infectados com dois genótipos no máximo ( $p=0,01$ , teste corrigido de Yates).



**Figura 6.7: Número total de indivíduos de acordo com a multiplicidade da infecção e desfecho clínico.**



**Figura 6.8. Percentual de indivíduos de acordo com a multiplicidade da infecção e desfecho clínico.**

As análises da multiplicidade da infecção foram feitas de acordo com a faixa etária, gênero, história progressa de malária e local de moradia dos indivíduos. De acordo com a faixa etária, foi observado que os indivíduos mais jovens estavam infectados com maior número de genótipos que os mais velhos ( $\geq 50$  anos) (tabela 6.16).

**Tabela 6.16: Multiplicidade da infecção: número de genótipos de acordo com a faixa etária**

Faixa etária	1 genótipo		2 genótipos		3 genótipos		4 genótipos		p-valor
	N	%	N	%	N	%	N	%	
$\leq 5$ anos (n=13)	8	61,64	4	30,77	1	7,69	0	0	0,0017
Entre 6 e 9 anos (n=15)	11	73,33	2	13,33	1	6,66	1	6,66	0,0000
Entre 10 e 15 anos (n=13)	5	38,46	6	46,15	1	7,69	1	7,69	0,1143
Entre 16 e 49 anos (n=29)	16	55,17	6	20,69	6	20,69	1	3,45	0,007
$\geq 50$ anos (n=9)	5	55,55	3	33,33	1	11,11	0	0	0,01
Total	45	56,96	21	26,58	10	12,65	3	3,79	0,0057

Foi observado que a maioria dos indivíduos tanto do sexo feminino quanto do sexo masculino possuía apenas um genótipo. Não houve diferença significativa quando foi feita a comparação do número de genótipos entre homens e mulheres, como apresenta a tabela 6.17.

**Tabela 6.17: Distribuição da multiplicidade da infecção de acordo com o gênero no município de Barcelos, Amazonas.**

Sexo	1 genótipo		2 genótipos		3 genótipos		4 genótipos	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Feminino (n=32)	20	62,5	8	25	3	9,37	1	3,12
Masculino (n=47)	25	53,19	13	27,66	7	14,89	2	4,25
Total	45		21		10		3	
p valor	0,412		0,7927		0,7042		0,7327	

De acordo com os antecedentes de infecção malárica progressa, foi observado que a maior parte dos indivíduos apresentou com maior frequência só um genótipo de *P. falciparum* independentemente do número de malária prévias, como mostra a tabela 6.18.

**Tabela 6.18: Multiplicidade da infecção de acordo com a história progressa de malária nos indivíduos de Barcelos, Amazonas.**

Nº de malárias prévias	Genótipo 1		Genótipo 2		Genótipo 3		Genótipo 4		Total		p valor
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
0	1	100	0	0	0	0	0	0	1	1,26	0,0000
1	7	50	4	28,6	1	7,14	2	14,28	14	17,72	0,0405
2	6	66,66	2	22,2	1	11,11	0	0	9	11,39	0,0001
3 – 5	14	56	5	20	5	20	1	4	25	31,65	0,0181
5 – 10	13	56,52	7	30,4	3	13,04	0	0	23	29,11	0,009
>10	3	50	3	50	0	0	0	0	6	7,59	0,014
não consta	1	100	0	0	0	0	0	0	1	1,26	0,000
Total	45	56,96	21	26,58	10	12,65	3	3,79	79	100	

Na análise da multiplicidade da infecção de acordo com o local de moradia não foram encontradas diferenças significativas no número de genótipos portados simultaneamente pelos indivíduos e o local de residência como pode ser observado na tabela 6.19.

**Tabela 6.19: Percentual e números de genótipos de acordo com o local de moradia**

Local de moradia	1 genótipo		2 genótipos		3 genótipos		4 genótipos	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Aparecida	3	33,33	2	22,22	3	33,33	1	11,11
Bairro da Paz	2	66,66	1	33,33	0	0	0	0
Marará	1	100	0	0	0	0	0	0
Mariué	17	73,91	5	21,74	1	4,34	0	0
Nazaré	3	60	0	0	2	40	0	0
Padauri	6	100	0	0	0	0	0	0
São Francisco	0	0	3	75	1	25	0	0
São Lázaro	2	33,33	3	50	0	0	1	16,66
São Sebastião	10	52,63	5	26,32	3	15,79	1	5,26
Mora no barco	1	100	0	0	0	0	0	0
Não consta	0	0	2	100	0	0	0	0

## 7) DISCUSSÃO

### 7.1) Diversidade genética do parasito

A história natural da transmissão da malária está melhor conhecida em áreas hiperendêmicas com predomínio de infecções por *P. falciparum*. Nesses locais, a imunidade clínica adquirida é geralmente observada entre indivíduos adultos, mas raramente entre crianças e jovens (Amodu et al., 2005). Deve-se considerar que em locais de transmissão elevada e estável, o fluxo intenso e a rápida circulação de parasitos geneticamente distintos são fatores que interferem na aquisição da imunidade (Daubersies et al., 1994; 1996). Porém, em locais com instabilidade de transmissão, a baixa prevalência da doença parece ser um fator limitante para o desenvolvimento de imunidade (Vinetz et al., 2002). Entretanto, a ocorrência de casos de infecções assintomáticas entre indivíduos residentes em áreas endêmicas brasileiras tem sido descrita (Fontes, 2001; Alves et al 2002, Scopel et al., 2004; Coura et al., 2006, Suárez-Mutis et al 2007b).

Tendo em vista o perfil epidemiológico da malária no Brasil e sabendo-se que o conhecimento da diversidade genética de populações de plasmódios tende a influenciar nos mecanismos de resposta imune do hospedeiro, uma hipótese provável para o desenvolvimento de imunidade em regiões de baixa transmissão seria a restrita variabilidade e/ou estabilidade no repertório de variantes genéticas em populações locais de parasitos (Scopel, 2007).

Ao contrário de outros protozoários e agentes patogênicos procaróticos, o *P.falciparum* não possui uma estrutura genética populacional "clonal" (Tibayrenk et al., 1990, Smith et al., 1993). A fecundação cruzada entre gametas de parasitos portadores de diferentes genótipos pode acontecer no intestino do vetor apenas quando há mais de um genótipo no sangue do qual o anofelino se alimentou. Além disso, a auto-fecundação entre gametas também pode ocorrer quando o sangue humano do qual o mosquito se alimentou conter apenas um genótipo do parasito (Conway et al., 1999). As recombinações genéticas são responsáveis pela maior variação observada em antígenos do *Plasmodium*, uma vez que ela ocorre mais frequentemente que a mutação (Conway et al., 1999). A prevalência de epítomos dimórficos de MSP1 foi

previamente relatada por Conway et al. (1999) na África Ocidental (Gâmbia e Nigéria) e no estado de Rondônia na Amazônia Brasileira (Conway et al, 1991).

A diversidade genética entre as populações de *P.falciparum* é um importante indicador da intensidade de transmissão da malária. Uma área altamente endêmica é caracterizada por uma grande diversidade genética do parasito, com a presença de indivíduos infectados por vários genótipos (Babiker et al., 1995; Paul et al., 1998; Mayengue et al., 2011).

Em áreas de alta transmissão na Índia, foi observado que em *P. falciparum* isolados de indivíduos de diversas faixas etárias, ocorreu um aumento da diversidade genética nas diferentes famílias de MSP1 num intervalo de quatro anos (Joshi, 2003; Bharti et al., 2012)

A população de parasitos em uma área de baixa transmissão, como o município de Barcelos, apresenta uma diversidade genética limitada e a maioria das infecções é por um único genótipo. Laserson et al., (1999) através da genotipagem de MSP1 de *P. falciparum*, encontraram apenas um genótipo (580 pb) em isolados provenientes de indivíduos assintomáticos, indivíduos com malária não-complicada e de 3 pacientes com malária grave em comunidades Yanomami na Venezuela, área relativamente próxima do local do presente estudo. Estudos recentes verificaram a prevalência de 66,2% de infecções por um único genótipo em indivíduos da Malásia, uma área de baixa transmissão de malária (Atroosh et al., 2011). Em amostras de pacientes na Colômbia, outra área de baixa transmissão, foi encontrado apenas um genótipo por amostra utilizando a MSP1 como marcador (Jimenez et al., 2010).

Neste trabalho foram encontrados dez genótipos diferentes para um único marcador molecular o que é um número considerado alto para áreas hipoendêmicas (Färnet et al., 2001). Os genótipos mais frequentes foram os de 500 pb (45,57%), 480 pb (35,44%), 470 pb (31,65%), 700 pb (13,92%), 520 pb (12,66%) e 490 pb (11, 39%), conforme a Tabela 6.9. Segundo Laserson et al., (1999), o genótipo com uma banda de 580pb, frequentemente encontrado nas comunidades Yanomami da Venezuela, foi identificado em apenas um isolado neste estudo, não tendo frequência significativa (1,27%). Resultados semelhantes foram encontrados por Hoffmann et al., (2003) que identificaram 10 genótipos distintos no Estado de Rondônia, e 17 genótipos no Vietnã, utilizando marcadores microssatélites.

Estudos realizados em cinco países africanos (Burkina Faso, Malawi, São Tomé e Príncipe, Tanzânia e Uganda) observaram uma grande diversidade de genótipos no locus MSP1 de *P. falciparum*, sendo identificados oito alelos para as famílias K1 e MAD20 e um alelo para RO33. (Mwingira et al., 2011).

No município de Barcelos, foi observado que, existe uma maior da diversidade genética de *P. falciparum* nos portadores de malária clínica quando comparados aos portadores assintomáticos, sendo essas diferenças estatisticamente significativas (comparação entre os portadores dos genótipos 5 (500 pb) e 6 (520 pb), conforme Tabela 6.12. Os resultados encontrados neste estudo corroboram os estudos de Zwetyenga et al., (1998) que verificaram que indivíduos senegaleses com infecção assintomática possuíam menor número de genótipos quando comparados aos indivíduos com malária clínica.

Esses resultados corroboram com a hipótese de que a reduzida proporção de alelos por indivíduo pode contribuir para o desenvolvimento de imunidade em regiões de baixa transmissão por limitarem a geração de novas variantes antigênicas. Contudo, outros estudos tornam-se necessários, já que uma maior frequência de alelos geneticamente distintos tem sido descrita em indivíduos assintomáticos em outras regiões (Yuan et al., 2012).

## **7.2) Multiplicidade da infecção**

A maioria dos indivíduos (56,96%) estudados no município de Barcelos estava infectada apenas com um genótipo do parasito, sendo que quatro foi o máximo de genótipos encontrados num mesmo indivíduo. Essa multiplicidade de infecção encontrada é semelhante aos resultados descritos por Ghanchi et al., (2010), estudando indivíduos paquistaneses, onde foi observado indivíduos infectados com até três genótipos de MSP1 em uma área de baixa transmissão. Dos indivíduos estudados, 74% tinham malária e 75,76% portavam apenas um genótipo, resultado que difere do encontrado em Barcelos (56,96% dos indivíduos apresentavam um genótipo). No estudo do Ghanchi et al foram encontrados 25 genótipos, sendo que a média do número de

genótipos presentes em crianças menores de 10 anos foi maior quando comparados à indivíduos de maior idade (1,25 em menores de três anos, 1,31 em indivíduos entre três e cinco anos e 1,26 na faixa etária entre seis e 10 anos; enquanto que isolados de indivíduos entre 11 e 15 anos tiveram multiplicidade média de 1,13; entre 16 e 30 anos de 1,2 e maiores de 30 anos de 1,19)(Ghanchi et al., 2010). Segundo esses autores, a baixa multiplicidade de infecção deve-se à baixa transmissão de *P. falciparum*, já que muitos pacientes foram tratados tendo uma diminuição da densidade parasitária, assim como às limitações das técnicas de PCR em detectar alelos minoritários, sendo considerado este último um importante fator para subestimar a real multiplicidade de infecção encontrada na região.

Zakeri et al., (2005), investigaram a diversidade de plasmódios em uma região no Irã com alta taxa de migração e baixa transmissão de malária, e verificaram que 87% dos indivíduos com malária clínica portavam mais de um genótipo. De acordo com os autores, nessa região há 272 alelos distintos do gene MSP1 em circulação e a média da multiplicidade da infecção é de 2,51. Estes dados discordam dos resultados encontrados nos indivíduos de Barcelos, em que foram encontrados dez genótipos distintos e a média da multiplicidade da infecção foi de 1,63. Os autores sugerem que a área estudada ao sul do Irã estaria com aumento do nível transmissão, devido às imigrações de indivíduos provenientes de países vizinhos e da resistência dos parasitos aos antimaláricos. Em estudo realizado entre os índios Yanomami na Venezuela (área relativamente próxima à estudada neste trabalho), verificou-se apenas um alelo por indivíduo (Laserson et al., 1999), enquanto em Barcelos, identificamos entre um e quatro alelos por indivíduo.

Um estudo realizado em uma área de baixa transmissão na Malásia identificou que um terço dos indivíduos com malária, são portadores de infecção por mais de um genótipo de *P. falciparum* e dois terços dos indivíduos estão infectados por um único genótipo (Atroosh et al. 2011). A média da multiplicidade de infecção foi de 1,37. Neste trabalho, a diversidade da infecção é diferente da encontrada em Barcelos, (10 genótipos), porém a multiplicidade da infecção é próxima, corroborando os resultados do presente estudo, em que 56,96% dos indivíduos são portadores de um único genótipo do parasito.

Al-Yaman et al., (1997), observaram que múltiplas infecções diminuem o risco de se desenvolver sucessivas malárias em crianças em área de alto risco de transmissão na Papua Nova Guiné. De acordo com esses autores, o número de genótipos tende a aumentar conforme a idade do indivíduo. De acordo com nossos resultados, a maioria dos indivíduos com menos de 10 anos, é portadora de infecção por um único genótipo do parasito, discordando dos resultados encontrados por Al-Yaman et al.(1997). Entretanto, os indivíduos com quatro genótipos têm entre seis e 49 anos (vide Tabela 6.15). O número de pessoas portadoras de quatro genótipos simultaneamente é muito baixo e qualquer inferência pode ser devida à epidemiologia de pequenos números.

Um estudo feito por Amodu et al., (2005) constatou que em indivíduos assintomáticos, a multiplicidade da infecção aumentava de acordo com a idade e, em pacientes com malária clínica, a multiplicidade da infecção diminuía conforme a idade. Nossos dados mostraram que, entre os indivíduos assintomáticos, 19 (70,37%) apresentaram apenas um genótipo, e oito apresentaram dois genótipos, sendo que a média de idade entre os assintomáticos foi de 16,85 anos (DP=14,7) como mostra a Tabela 6.7. Entre os pacientes com malária clínica, 50% apresentaram apenas um genótipo do parasito, 25%, dois genótipos e 25% apresentaram três ou quatro genótipos, sendo que a média de idade entre os pacientes com malária foi de 24,13 anos (DP=20,87). Os dados apresentados por Amodu et al. 2005 diferem dos resultados encontrados neste trabalho, destacando-se o fato que o estudo de revisão foi realizado em áreas hiperendêmicas com transmissão perene. A transmissão de malária no município de Barcelos é sazonal e de baixa endemicidade, onde os indivíduos residentes desenvolvem imunidade de forma distinta dos indivíduos residentes em áreas de alta transmissão. Essa diferença epidemiológica poderia estar influenciando nas relações entre a multiplicidade da infecção e a idade dos indivíduos nas áreas com níveis de transmissão distintas.

Na Amazônia Peruana, numa área de baixa transmissão, foi feito um estudo envolvendo indivíduos apresentando diversos desfechos clínicos da malária (malária grave, não complicada e infecção assintomática). Foram sequenciados sete diferentes alelos das famílias K1 e MAD20, entretanto, não

foi encontrada correlação entre o desfecho clínico dos indivíduos com os alelos encontrados (Chen et al., 2008).

Em áreas holoendêmicas de Gana, foi reportado que crianças portadoras de infecções múltiplas possuíam maiores chances de contrair malária clínica e indivíduos com malária clínica possuíam mais genótipos que os indivíduos assintomáticos (Ofosu-Okyere, 2001), corroborando, desta forma, os resultados encontrados neste trabalho, em que a maioria dos indivíduos com infecções múltiplas era pacientes com malária clínica.

Estudos realizados na Amazônia brasileira encontraram 12 genótipos distintos de MSP1 (isolados provenientes dos Estados de Rondônia, Pará, Mato Grosso, Amapá e Tocantins), sendo que 68 isolados (38%) foram provenientes de infecções múltiplas (da Silveira et al., 1999). Na Guiana Francesa foi observado que infecções por um único genótipo foram relacionadas a casos de malária grave e infecções múltiplas (vários genótipos) foram associadas à malária não complicada (Legrand et al., 2005). Através da genotipagem dos microsatélites, foram identificados polimorfismos não sinônimos diretamente ligados aos casos de malária complicada. Apesar de nossos resultados mostrarem que os portadores de malária clínica possuíam mais genótipos, como mostrado por Legrand et al. 2005, o estudo na Guiana Francesa não analisou indivíduos assintomáticos, e em Barcelos, não foram recrutados pacientes com malária complicada. Outro estudo na mesma região identificou quatro genótipos distintos de MSP1 em portadores de malária não complicada com média de multiplicidade da infecção de 1,15 (Ariey et al., 1999). De acordo com os autores, somente 10,18% dos indivíduos portavam apenas dois genótipos e os demais pacientes portavam infecção com um genótipo. Estes dados diferem dos resultados encontrados em Barcelos, onde, 50% (26 indivíduos) dos indivíduos com malária, eram infectados com um genótipo, 25% (13 indivíduos) portavam dois genótipos, 19,53% (10 indivíduos) tinham três genótipos e 5,77% (3 indivíduos) possuíam quatro genótipos. Apesar das duas áreas de estudo serem hipoendêmicas e com transmissão sazonal, há mais genótipos de plasmódios em circulação na região de Barcelos, indicando que possa existir uma maior pressão seletiva atuando sobre o parasito. É importante salientar que na época do estudo não havia relatos de infecção assintomática na Guiana Francesa, e que na maioria das

vezes, os mosquitos também carregavam no máximo dois genótipos do parasito, diminuindo a diversidade genética (Ariey et al., 1999).

Barrera et al., 2010, em estudos realizados na Colômbia, encontrou uma baixa diversidade genética no locus MSP1, no qual foram encontrados apenas dois genótipos circulantes entre 81 isolados provenientes de indivíduos com malária, sendo todas as infecções por único genótipo. Guerra et al., (2006) observou baixa diversidade genética, também na Colômbia, tendo uma prevalência de 62% de infecção por um único genótipo. Em ambos os trabalhos, a família alélica MAD20 foi a mais prevalente. Em Barcelos, não foi realizada a análise das famílias alélicas do gene MSP1.

Outro estudo no Haiti, com indivíduos assintomáticos e com malária, foram encontrados nove genótipos distintos do gene MSP1, sendo que a média da multiplicidade da infecção foi igual a dois. Neste mesmo trabalho foi feito um estudo de associação clínica entre a multiplicidade da infecção e a idade dos indivíduos e a presença ou não de sintomas clínicos da doença. No primeiro ano do estudo foi encontrada uma maior multiplicidade de infecção nos indivíduos pertencentes à faixa etária entre 27 e 45 anos e no segundo ano da pesquisa, foi observada uma maior multiplicidade nas faixas etárias entre 15 e 45 anos. A maioria dos pacientes com malária clínica apresentava apenas um genótipo do parasito e entre os indivíduos com infecção assintomática, a maior parte portava dois genótipos. 27% dos indivíduos estudados eram assintomáticos, e entre eles foi observado que crianças possuíam maior multiplicidade de infecção que indivíduos idosos e pacientes com malária clínica, e também foi constatado que ocorria maior proporção de idosos portadores de infecção por um único genótipo quando comparados às crianças e aos adultos (Londono-Renteria et al., 2012). Nas análises deste estudo foi encontrada uma proporção de, 70,37% de indivíduos com infecção assintomática que portavam apenas um genótipo do parasito e os indivíduos com malária clínica apresentaram maior diversidade genotípica.

### 7.3) Limitações

Vários estudos observaram que *P. falciparum* isolados de pacientes com altas parasitemias e submetidas à PCR podem gerar a amplificação de fragmentos inespecíficos, levando muitas vezes ao erro de interpretação dos resultados, tais como, considerar um fragmento inespecífico como genótipo ou exclusão de novos alelos (Färnert et al., 2001). Outro problema comum ocorre na comparação dos genótipos, pois existem muitos protocolos laboratoriais para a execução do mesmo experimento e que estas diferentes metodologias podem gerar resultados divergentes. (Färnert et al., 2001).

As avaliações da diversidade genética dos parasitos deveriam ser realizadas longitudinalmente a fim de se estabelecer mudanças nos padrões dos parasitos circulantes especialmente em áreas com presença de infecção assintomática.

Embora fosse interessante estudar a diversidade genética de *P. falciparum* em pacientes com malária grave no Brasil, poucos são os indivíduos que evoluem para esta forma clínica da doença.

## 8) CONCLUSÕES

- 1- Este é o primeiro estudo de avaliação do perfil genético de isolados de *P. falciparum* circulantes na região do médio rio Negro. A região de Barcelos tem uma população de *P. falciparum* consideravelmente diversa do ponto de vista genético; 10 genótipos diferentes foram encontrados através da genotipagem do gene que codifica a Proteína da Membrana do Merozoito 1 (MSP1);
- 2- As infecções múltiplas são mais frequentes em indivíduos com malária clínica (média de genótipos diferentes de 1,8) do que nos portadores assintomáticos (média de genótipos de 1,3);
- 3- Os genótipo 5 (500pb) e 6 (520 pb) foram os mais prevalentes nos indivíduos com malária clínica (sendo os últimos exclusivos dos indivíduos portadores da doença) comparados com os portadores assintomáticos do *P. falciparum*

## 9) PERSPECTIVAS

1. Sequenciar os fragmentos de PCR equivalentes ao bloco 2 do gene MSP1 de *P. falciparum* a fim de se avaliar os polimorfismos existentes na população de parasitos na região de Barcelos;
2. Estudar a diversidade genética de *P. falciparum* utilizando outros antígenos candidatos a vacina, como por exemplo o gene MSP2 (Merozoite Surface Protein 2) e GLURP (Glutamate Rich Protein);
3. Estudar a diversidade genética em *P. vivax*.

## 10) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Pereira da Silva LH, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002; 66:641–648.
- Al-Yaman F, Genton B, Reeder JC, Anders RF, Smith T, Alpers MP. Reduced risk of clinical malaria in children infected with multiple clones of *Plasmodium falciparum* in a highly endemic area: a prospective community study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1997; 91: 602-605.
- Amodu OK, Gbadegesin RA, Ralph SA, Adeyemo AA, Brenchley PEC, Ayoola OO, Orimadegun AE, Akinsola AK, Olumese PE, Omotade OO. *Plasmodium falciparum* malaria in south-west Nigerian children: Is the polymorphism of ICAM-1 and E-selectin genes contributing to the clinical severity of malaria?. *Acta Tropica*. 2005; 95: 248–255.
- Andrade AL, Martelli CM, Oliveira RM, Arias J R, Zicker, F., Pang, L. High prevalence of asymptomatic malaria in gold mining areas in Brazil. *Clinical Infectious Diseases*, 1995; 20: 475.
- Anong DN, Nkuo-Akenji T, Fru-Cho J, Amambua-Ngwa A, Titanji VP. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in Bolifamba, on the slopes of mont Cameroon: influence of MSP1 allelic variants on symptomatic malaria and anaemia. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 2010 Jan; 104(1) 25-33.
- Ariey F, Hommel D, Le Scanf C. et al. Association of severe malaria with a specific *Plasmodium falciparum* genotype in French Guiana. *Journal of Infectious Diseases*. 2001; 184: 237–241.

- Atroosh WM, Al-MekhlafiHM, MahdyMAK, Saif-AliR, Al-MekhlafiAM, SurinJ. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates from Pahang, Malaysia based on MSP-1 and MSP-2 genes. *Parasites & Vectors* .2011; 4: 233.
- Babiker HA, Charlwood JD, Smith T, Walliker D. Gene flow and cross-mating in *Plasmodium falciparum* in households in a Tanzanian village. *Parasitology*. 1995; 111: 433-442.
- Babiker HA, Lines J, Hill WG, Walliker D. Population structure of *Plasmodium falciparum* in villages with different malaria endemicity in East Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1997; 56:141-147.
- Babiker HA. *Plasmodium falciparum* population in the unstable malaria area of eastern Sudan is stable and genetically complex. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998; 92:585-589.
- Barrera SN, Pérez MA, Kinudson A, Nicholls RS, Guerra AP. Genotipificación de *Plasmodium falciparum* por PCR múltiple por medio de los genes MSP1 MSP2 e GLURP en cuatro localidades de Colombia. *Biomédica*. 2010;30:530-538.
- Bharti PK, Shukla MM, Sharma YD, Singh N. Genetic diversity in the block 2 region of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium falciparum* in Central India. *Malaria Journal*. 2012;11:78.
- Carter R, MendisKN. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002; 15: 564–594.
- Centers for Disease Control and Prevention, *Safe Water Systems for the Developing World: A Handbook for Implementing Household-Based Water Treatment and Safe Storage Projects*, CDC, Atlanta, 2000.

- Certa U, Rotmann D, Matile H, Reber-Liske R. A naturally occurring gene encoding the major surface antigen precursor p190 of *Plasmodium falciparum* lacks tripeptide repeats. EMBO Journal. 1987; 6: 4137 - 4142.
- Cevallos TW. Estudo do processo de transmissão de malária humana na sede do município de Barcelos, Amazonas, Brasil. Dissertação de Mestrado – Fiocruz. 2001; 100p.
- Collins WJ, Greenhouse B, Rosenthal PJ, Dorsey G. The use of genotyping in antimalarial clinical trials: a systematic review of published studies from 1995-2007. Malaria Journal. 2007;5:122.
- Conway DJ, Greenwood BM, McBride JS. The epidemiology of multiple-clone *Plasmodium falciparum* infections in Gambian patients. Parasitology. 1991; 103:1-6.
- Conway DJ, Roper C, Oduola AM, Arnot DE., Kremsner PG, Grobusch MP, Curtis CF, Greenwood BM. High recombination rate in natural populations of *Plasmodium falciparum*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1999; 96: 4506-1411.
- Costa AP, Bressan CS, Pedro RS, Valls-de-Sousa R, Silva S, Sousa PR, Guaraldo L, Ferreira-da-Cruz MF, Daniel-Ribeiro CT, Brasil P. Diagnóstico tardio de malária em área endêmica de dengue na extra-Amazônia brasileira: experiência recente de uma unidade sentinela no Estado do Rio de Janeiro. Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2010;101: 229-237.
- Coura JR, Suárez-Mutis M; Ladeia-Andrade S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection - a review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2006; 101: 229-237.
- Cruz O. Relatório sobre as condições médico-sanitárias do Valle do Amazonas. Rio de Janeiro. 1913; p.111.

Darko CA, Angov E, Collins WE, Bergmann-Leitner ES, Girouard AS, Hitt SL, McBride JS, Diggs CL, Holder AA, Long CA, Barnwell JW, Lyon JA. The clinical Grade 42 Kilodalton fragment of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium falciparum* strain FVO Expressed in Escherichia coli Protects Aotus nancymai against challenge with homologous erythrocytic stage parasites. Infection and Immunity. 2005; 73: 287-297.

Da Silveira, LA, Dorta ML, Kimura EA, Katzin AM, Kawamoto F, Tanabe K, Ferreira MU. Allelic diversity and antibody recognition of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 during hypoendemic malaria transmission in the Brazilian amazon region. Infection Immunology, 1999 Nov; 67(11):5906-16.

Daubersie P, Sallenave-Sales S, Trape JF, Raharimalala L, Rogier C, Contamin H, Fandeur T, Daniel-Ribeiro CT, Mercereau Puijalon O, Druilhe P. PCR characterization of isolates from various endemic areas: diversity and turn over of *Plasmodium falciparum* populations are correlated with transmission. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1994; 89: 9-12.

Daubersies P, Sallenave-Sales S, Magne S, Trape JF, Contamin H, Fandeur T. et al. Rapid turnover of *Plasmodium falciparum* populations in asymptomatic individuals living in a high transmission area. American Journal Tropical of Medicine and Hygiene. 1996; 54:18-26.

Descheemaeker PN, Mira JP, Bruneel F, Houzé S. Tanguy M, Gangneux JP, Flecher E, Rousseau C, Le Bras J, Mallédant Y. Near-Fatal Multiple Organ Dysfunction Syndrome Induced by *Plasmodium malariae* Emerging Infectious Diseases, 2009; May 15 (5): 832-834.

Farnert A., Arez A, Babiker H, Beck H, Benito A, et al. Genotyping of *Plasmodium falciparum* infections by PCR: a comparative multicentre study. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2001; 95: 225-232.

Farnet A, Rooth I, Snounou G, Bjorkman A. Complexity of *Plasmodium falciparum* infections is consistent over time and protects against clinical disease in Tanzanian children. Journal of Infect. Disease. 1999; 179: 989-995.

Faye B, Ndiaye JL, Tine R et al. A randomized trial of artesunate mefloquine versus artemether lumefantrine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Senegalese children. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene . 2010; 82: 140–144.

Fontes CJF. Malária assintomática em áreas de garimpo no Brasil: estudos de fatores de risco. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Tese de Doutorado . 2001; 178p.

Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, Paulsen IT, James K, Eisen JA, Rutherford K, Salzberg SL, Craig A, Kyes S, Chan MS, Nene V, Shallom SJ, Suh B, Peterson J, Angiuoli S, Pertea M, Allen J, Selengut J, Haft D, Mather MW, Vaidya AB, Martin DM, Fairlamb AH, Fraunholz MJ, Roos DS, Ralph SA, McFadden GI, Cummings LM, Subramanian GM, Mungall C, Venter JC, Carucci DJ, Hoffman SL, Newbold C, Davis RW, Fraser C M, Barrell B. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Nature. 2002; 419: 498-511.

Ghanchi, N.K.; Martensson, A.; Ursing, J.; Jafri, S.; Bereczky, S.; Hussain, R.; Beg, M. A. Genetic diversity among *Plasmodium falciparum* field isolates in Pakistan measured with PCR genotyping of the merozoite surface protein 1 and 2. Malaria Journal, 2010, 9:1.

- Guerra A, Rubio JN, Royo JR Ortega JC, Auñón AS, Díaz PB. *Plasmodium* diversity in non malaria individuals from the Bioko Island in Equatorial Guinea (West Central Africa). 2006. International Journal Health Geograph. 2006; 5:27
- Guilbride DL, Guilbride PD, Gawlinski P. Malaria's deadly secret: a skin stage. Trends Parasitology. 2012; 28:142-150.
- Haddad D, Snounou G, Mattei D, Enamorado IG, Figueroa J, Ståhland S, Berzins K Limited genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in field isolates from Honduras. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1999; 60: 30-34.
- Hoffmann EHE, Ribolla PEM, Ferreira MU. Genetic relatedness of *Plasmodium falciparum* isolates and the origin of allelic diversity at the merozoite surface protein-1 (MSP-1) locus in Brazil and Vietnam. Malaria Journal. 2003; 2: 24.
- Holder A A. The precursor to major merozoite surface antigens: structure and role in immunity. Prog. Allergy. 1988;.41:72-97.
- Imwong M, Nair S, Pukrittayakamee S, et al. (14 co-authors). Contrasting genetic structure in *Plasmodium vivax* populations from Asia and South America. International Journal of Parasitology. 2007;37:1013-1022.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Censo Demográfico. 2010a.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Classificação de ocupações para pesquisas domiciliares. 2010b.

- IAEA-International Atomic Energy Agency. Technical manual standard operating procedures for regional project 6025 detection of drug-resistance malaria. 2003, 126p.
- Jafari-Guemouri S, Boudin C, Fievet N, Ndiaye P, Deloron P. *Plasmodium falciparum* genotype population dynamics in asymptomatic children from Senegal. *Microbes and Infection*. 2006; 8:1663-1670.
- Jiménez JN, Snounou G, Letourneur F, Rénia L, Vélez I D, Muskus CE. Near-fixation of a *Pfmsp1* block 2 allelic variant in genetically diverse *Plasmodium falciparum* populations across Western Colombia. *Acta Tropica*. 2010;114: 67-70.
- Joshi H. Markers for population genetic analysis of human Plasmodia species, *P. falciparum* and *P. vivax*. *Journal Vector Borne Diseases*. 2003;40:78-83.
- Kariuki MM, Li X, Yamodo I, Chishti AH, Oh SS. Two *Plasmodium falciparum* merozoite proteins binding to erythrocyte band 3 form a direct complex. *Biochemical and Biophysical Researches Communications*, 2005; 338 (4) 1690-95.
- Kemp D. Antigenic diversity and variation in blood stages of *Plasmodium falciparum*. *Immunol Cell Biol*, 1992; 70: 201-207.
- Kiwanuka GN. Genetic diversity in *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 and 2 coding genes and its implications in malaria epidemiology: a review of published studies from 1997–2007. *Journal of Vector Borne Disease*. 2009; 46: 1-12.
- Kun FJ, Schidt-Ott RJ., Lehman LG, Lell B, Luckner D, Greve B, Matousek P, Kremsner PG. Merozoite surface antigen 1 and 2 genotypes and resetting of *Plasmodium falciparum* in severe and mild malaria in Lambarene, Gabon. *Transactions and Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998; 92:110-114.

- Ladeia-Andrade S. Aspectos Epidemiológicos da Malária no Parque Nacional do Jaú, Amazonas, Brasil. Tese de Doutorado. Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, 2005;.287p.
- Laserson KF, Wypij D, Petralanda I, Spielman A, Maguire JH. Differential perpetuation of malaria species among Amazonian Yanomami Amerindians. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999; 60: 767-773.
- Legrand E, Volney B, Lavergne A, Tournegros C, et al. Molecular analyses of two local *falciparum* malaria outbreaks on the French Guiana Coast confirms the MSP1 B-K1/varD genotype association with severe malaria. *Malaria Journal* 2005;4:26.
- Londono-Renteria B, Eisele TP, Keating J, Bennett A, Krogstad DJ. Genetic diversity in the merozoites surface protein 1 and 2 genes of *Plasmodium falciparum* from the Artibonite valley of Haiti. *Acta Tropica*.2012;121: 6-12.
- Mayengue PI, Ndounga M, Malonga FV, Bitemo M, Ntouni F. Genetic polymorphism of merozoite surface protein-1 and merozoite surface protein-2 in *Plasmodium falciparum* isolates from Brazzaville, Republic of Congo. *Malaria Journal* .2011; 10: 276.
- Ministério da Saúde. Guia prático de tratamento da Malária no Brasil. Brasília, 2010: 35p.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da malária no Brasil. Brasília, 2011.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da malária no Brasil. Brasília, 2012.
- Ministério da Saúde. Serviço de informação de vigilância epidemiológica - SIVEP-Malária. Brasília, 2011.
- Mwingira F, Nkwengulila G, Schoepflin S, Sumari D, Beck HP, Snounou G, Felger I, Olliaro P, Mugittu K. *Plasmodium falciparum* msp1, msp2 and glurp allele frequency and diversity in sub-Saharan Africa. *Malaria Journal*. 2011;10: 79.

- Ntoumi F, Mercereau-Puijalon O, A Luty, Georges A, P Millet. High prevalence in the third way of merozoites surface protein 1 in asymptomatic children in Gabon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.1996; 90:701-702
- Ofosu-Okyere A, Mackinon MJ, Sowa MPK, Koram KA, Nkrumah F, Osei YD, Rill WG, Wilson MD, Arnot DE. Novel *Plasmodium falciparum* clones and rising clone multiplicities are associated with the increase in malaria morbidity in Ghanaian children during the transmission into the high transmission season. *Parasitology*.2001; 123: 113-123.
- Paul REL, Hackford I, Brockman C, Muller-Graf C, Price R, Luxemburger C, White N J., Nosten F, Day KP. Transmission intensity and *Plasmodium falciparum* diversity on the northwestern border of Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* .1998; 58:195-203.
- Peek R, Van Gool T, Panchoe D, Greve S, Bus E, Resida L. Drug resistance and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* parasites from Suriname. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 2005; Nov 73(5):833-8.
- Polley SD, Chokejindachai W, Conway DJ. Allele frequency-based analyses robustly map sequence sites under balancing selection in a malaria vaccine candidate antigen. *Genetics*. 2003;165:555-561.
- Raj DK, Das BR, Dash AP, Supakar PC. Identification of a rare point mutation at C-terminous of merozoite surface antigen 1 gene of *Plasmodium falciparum* in eastern Indian isolates. *Experimental Parasitology*. 2004,, 106: 45-49.
- RanjitMR, Das A, Das BP, Das BN, Dash BP, Chhotray GP. Distribution of *Plasmodium falciparum* genotypes in clinically mild and severe malaria cases in Orissa, India. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.2005; 99: 389-395.
- Rey L. *Parasitologia 3ª Ed.* Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2001.

- Rey L. Parasitologia e bases da parasitologia médica. Complemento multimídia. Guanabara Koogan. 2008.
- Rich SM, Ferreira MU, Ayala FL. The origin of antigenic diversity in *Plasmodium falciparum*. Parasitology Today. 2000; 16: 390-396.
- Rich SM, Licht MC, Hudson RR, Ayala FJ. Malarias Eve: Evidence of a recent population bottle neck throughout the world populations of *Plasmodium falciparum*. Proceedings of National Academy of Sciences EUA A. 1998; 95 :4425-4430
- Rogier C, Trape JF. Malaria attacks in children exposed to high transmission: who is protected? . Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1993; 87: 245-246.
- Rojas LI, Toledo L. 1. Espaço e Doença: um olhar sobre o Amazonas. Ed. Fiocruz. Rio de Janeiro, 1998, 175p.
- Roper C, Richardson W, Elhassan IM, Giha H, Hviid L, Satti GM, Theander TG, Arnot DE. Parasitology. Seasonal changes in the *Plasmodium falciparum* population in individuals and their relationship to clinical malaria: a longitudinal study in a Sudanese village. 1998; 116 :501-510.
- Roshanravan B, Kari E, Gilman RH, Cabrera L, Lee E, Metcalfe J, Calderon M, Lescano AG, Montenegro S H, Calampa C, Vinetz J M. Endemic Malaria in the peruvian amazon region of Iquitos. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene .2003; 69: 45–52.
- Roy SW, Ferreira MU, Hartl DL. Evolution of allelic dimorphism in malarial surface antigens. Heredity. 2008; 100 :103-10.
- Scopel KKG, Fontes CJF, Nunes AC, Horta MF, Braga EM. Low sensitivity of nested PCR using *Plasmodium* DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low

parasitaemia in an endemic area of the Brazilian Amazon region. *Malaria Journal*. 2004; 3: 8.

Scopel KKG, 2007. Diversidade genética e reconhecimento imune de proteínas de superfície de merozoítos de *Plasmodium falciparum* (MSP-1 e MSP-2) em indivíduos expostos à malária no Brasil. Universidade Federal de Minas Gerais. Tese de Doutorado. 91p.

Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1993; 61: 315–320.

Snounou G, Zhu X, Siripoon N, et al. Biased distribution of msp1 and msp2 allelic variants in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1996; 93: 369–374.

Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2005; 434: 214-217.

Snow RW, Marsh K. New insights into the epidemiology of malaria relevant for disease control. *British Medical Bulletin*. 1998; 54: 293-309.

Su XFM, Huang Y, Huynh CQ, Liu A, You J, Wooton J, Wellems TE. A genetic map and recombination parameters of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*. 1999; 286:1351-1353.

Suárez-Mutis MC, Bonilla MP, Blandón ME. Diagnosis of the health situation of the Yujup-Maku, a seminomadic indigenous group of the Colombian Amazonas. Abstracts 2 XVth International Congress for Tropical Medicine and Hygiene and Malaria, Cartagena. 2000; 192.

- Suárez-Mutis MC, 2007a. Epidemiologia da malária em comunidades do rio Padauri, médio rio Negro, área de extrativismo vegetal da piaçaba no Estado do Amazonas, Brasil. Instituto Oswaldo Cruz, Tese de doutorado, 138p.
- Suárez-Mutis MC, Coura JR. Changes in the epidemiological pattern of malaria in a rural area of the middle Rio Negro, Brazilian Amazon: a retrospective analysis. *Caderno de Saúde Pública* 2007b; 23: 795-804.
- Suárez-Mutis MC, Cuervo P, Leoratti FM, Moraes-SL Ávila, Ferreira AW, Fernandes O, Coura JR. Estudo transversal revela uma elevada percentagem de infecção assintomática por *Plasmodium vivax* na Amazônia Rio Negro, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo*.2007c; 49 :159-164.
- Ta TT, Salas A, Ali-Tammam M, Martínez M del C, Lanza M, Arroyo E, Rubio JM. First case of detection of *Plasmodium knowlesi* in Spain by Real Time PCR in a traveller from Southeast Asia. *Malaria Journal*.2010; 9:219.
- Takala S, Branch O, Escalante AA, Kariuki S, Wootton J, Lal AA. Evidence for intragenic recombination in *Plasmodium falciparum*: identification of a novel allele family in block 2 of merozoite surface protein-1: Asembo Bay Area Cohort Project XIV. *Molecular Biochemistry Parasitology*.2002; 125:163-71.
- Tami A, Grundmann H, Sutherland C, McBride JS, Cavanagh DR, Campos E, Snounou G., Barnabe C., Tibayrenc M., Warhurst C. Restricted genetic and antigenic diversity of *Plasmodium falciparum* under mesoendemic transmission in the Venezuelan Amazon. *Parasitology*. 2002;124: 569-581.

- Tanabe K, Sakihama N, Walliker D, Babiker H, Abdel-Muhsin AM, Bakote'e B, Ohmae H, Arisue N, Horii T, Rooth I, Farnert A, Bjorkman A, Ranford-Cartwright L. Allelic dimorphism-associated restriction of recombination in *Plasmodium falciparum* MSP-1. *Gene*. 2007; 397: 153-160.
- Vinetz JM, Gilman RH. Asymptomatic *Plasmodium* parasitemia and the ecology of malaria transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002; 66: 639-640.
- White NJ. The role of anti-malarial drugs in eliminating malaria..*Malaria Journal*.2008;7:8.
- World Health Organization. Expert Committee on Malaria, report on the Third Session. Technical Report Series no. 8, Geneva. 1950.
- World Health Organization. 2012. World Malaria Report 2012. Geneva, 2012, 195p.
- Yuan L, Wu L, Li X, Zhao H et al. *Plasmodium falciparum* populations from northeastern Myanmar display high levels of genetic diversity at multiple antigenic loci. *Acta Tropica*. 2012. No prelo.
- Zakeri S, Bereczky S, Naimi P, Pedro Gil J, Djadid ND, Farnet A, Snounou G, Bjorkman A. Multiple genotypes of the merozoite surface proteins 1 and 2 in *Plasmodium falciparum* infections in a hypoendemic region of Iran. *Tropical Medicine Int Health*. 2005;10:1060–1064.
- Zwetyenga J, Rogier C, Tall A, Fontenille D, Snounou G, Trape JF.*et al*.No influence of age on infection complexity and allelic distribution on *Plasmodium falciparum* infections in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. *American Journal Tropical of Medicine and Hygiene*. 1998; 59: 726-35.

11) ANEXOS  
Anexo 1) Questionário domiciliar

Anexo N. 5

FICHA INDIVIDUAL

ESTUDO DA MALÁRIA EM COMUNIDADES DO RIO PADAURI, AFLUENTE DO RIO NEGRO NO ESTADO DO AMAZONAS E NOVAS ESTRATEGIAS DE CONTROLE.  
2002-2005

Identificação

Ficha # \_\_\_\_\_ registro familiar # \_\_\_\_\_  
Nome: \_\_\_\_\_  
Idade \_\_\_\_\_ anos \_\_\_\_\_ meses  
Data de nascimento \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Sexo: 1. F ( ) 2. M ( ) Raça \_\_\_\_\_  
Ocupação atual \_\_\_\_\_  
Lugar de trabalho \_\_\_\_\_  
Urbano \_\_\_\_\_ rural \_\_\_\_\_  
Horário de trabalho: \_\_\_\_\_

Teve malária no domicílio atual?  
não ( ) sim ( ) data \_\_\_\_\_

# de vezes de malária no domicílio atual \_\_\_\_\_

Foi feita gota espessa? Sim ( ) não ( )  
desconhece ( )

Recebeu tratamento? Sim ( ) não ( )  
outra \_\_\_\_\_

Tipo de malária v \_\_\_\_\_ f \_\_\_\_\_ mista \_\_\_\_\_  
ma \_\_\_\_\_ d \_\_\_\_\_

Migrações e mobilidade espacial

Local de nascimento \_\_\_\_\_  
Mun \_\_\_\_\_ estado \_\_\_\_\_  
Moradia anterior \_\_\_\_\_  
Mun \_\_\_\_\_ estado \_\_\_\_\_ tempo \_\_\_\_\_  
Moradia anterior \_\_\_\_\_  
Mun \_\_\_\_\_ estado \_\_\_\_\_ tempo \_\_\_\_\_  
Moradia anterior \_\_\_\_\_  
Mun \_\_\_\_\_ estado \_\_\_\_\_ tempo \_\_\_\_\_  
Moradia anterior \_\_\_\_\_  
Mun \_\_\_\_\_ estado \_\_\_\_\_ tempo \_\_\_\_\_  
Mobilidade: motivo \_\_\_\_\_

Conhecimento e capacidade para tomada de medidas preventivas

# de anos de escolaridade \_\_\_\_\_  
Estuda atualmente? Sim ( ) não ( )  
Como a malária é transmitida?  
\_\_\_\_\_

Como evita pegar malária?  
\_\_\_\_\_

Lugar \_\_\_\_\_  
Frequência \_\_\_\_\_  
Motivo \_\_\_\_\_  
Lugar \_\_\_\_\_  
Frequência \_\_\_\_\_

Usa mosquito para dormir? sim ( ) não ( )  
Impregnado? Sim ( ) não ( )

Exame físico

Sinais vitais

Data	Temperatura	Pulso	Ta

Antecedentes

Teve outras doenças? Sim \_\_\_\_\_ não \_\_\_\_\_  
Sim: quais? \_\_\_\_\_

Teve hepatite? Sim \_\_\_\_\_ não \_\_\_\_\_  
Quando e onde? \_\_\_\_\_

É ou foi alcoolista? Sim \_\_\_\_\_ não \_\_\_\_\_  
Ocasional \_\_\_\_\_ intenso \_\_\_\_\_ muito intenso \_\_\_\_\_

Microrganismos

Data	Coradas	Descoloradas	Muito descoloradas

Exposição

Data de chegada ao domicílio atual \_\_\_\_\_  
Alguma vez teve malária? 1. Sim ( ) 2. Não ( )

# de vezes que teve malária) \_\_\_\_\_

Quando teve malária?  
Ano \_\_\_\_\_ mes \_\_\_\_\_ lugar \_\_\_\_\_ estado \_\_\_\_\_  
Ano \_\_\_\_\_ mes \_\_\_\_\_ lugar \_\_\_\_\_

Epihematória

Data	Tipo	Consistência

Malária nos últimos 12 meses? S( ) N( )  
Lugar onde pegou malária \_\_\_\_\_  
data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Hepatomegalia

Data	Tipo	Tratamento

2  
2

## Anexo 2) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### Informação ao paciente sujeito da pesquisa

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

### Consentimento após a informação

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

Rio Negro, Amazonas, / /

Assinatura do Paciente  
Sujeito da Pesquisa

Assinatura do Pesquisador

### Anexo 3) Parecer do Comitê de Ética



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

Rio de Janeiro, 21 de junho de 2004.

#### PARECER

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

**Protocolo CEP:** 157/02

**Pesquisador Responsável:** José Rodrigues Coura

**Instituição:** IOC

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

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