



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL –  
PGBIOEXP**

**ROGER LAFONTAINE MESQUITA TABORDA**

**Análise dos polimorfismos genéticos dos genes *msp1* e *csp* em isolados de *P.*  
*vivax* em Porto Velho – Rondônia**

**PORTO VELHO – RO**

**2015**

**ROGER LAFONTAINE MESQUITA TABORDA**

**Análise dos polimorfismos genéticos dos genes *msp1* e *csp* em isolados de *P. vivax* em Porto Velho – Rondônia**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental, do Núcleo de Saúde, Departamento de Medicina da Universidade Federal de Rondônia – UNIR, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Experimental.

**Orientador:** Dr. Mauro Shugiro Tada;

**Co-orientadora:** Dra. Joana D’Arc Neves Costa

**Porto Velho – RO  
2015**

**FICHA CATALOGRÁFICA  
BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES**

Taborda, Roger Lafontaine Mesquita.

T114a

Análise dos polimorfismos genéticos dos genes msp1 e csp em isolados de *P. vivax* em Porto Velho – Rondônia. / Roger Lafontaine Mesquita Taborda, Porto Velho, 2015.

88f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Shugiro Tada

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2015.

1. Malária. 2. msp1. 3. Diversidade genética. I. Fundação Universidade Federal de Rondônia. II. Título.

CDU: 616.936

**Bibliotecário responsável: Luã Silva Mendonça- CRB11/905**

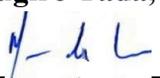
**Candidato:** ROGER LAFONTAINE MESQUITA TABORDA

**Título da Dissertação:** ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DOS GENES MSP1 E CSP EM ISOLADOS DE P. VIVAX EM PORTO VELHO – RONDÔNIA.

Defesa da Dissertação do curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biologia Experimental da Universidade Federal de Rondônia, nível Mestrado, em Sessão Pública realizada em 17 de abril de 2015.

**Banca Examinadora**

1) **Dr. Mauro Shugiro Tada**, Presidente, Orientador (Membro Interno, CEPEM);

Assinatura: \_\_\_\_\_  \_\_\_\_\_

2) **Dra. Josileide Duarte de Farias** 2º Titular (Membro Externo, UFAC);

Assinatura: \_\_\_\_\_

3) **Dra. Rubiane de Cássia Pagoto** 3º Titular (Membro Externo, UNIR);

Assinatura: \_\_\_\_\_

4) **Dra. Najla Benevides Mattos** 1º Suplente (Membro Interno, FIOCRUZ)

Assinatura: \_\_\_\_\_

5) **Dra. Deusilene Souza Vieira** 2º Suplente (Membro Interno, Fiocruz-RO)

Assinatura: \_\_\_\_\_

A Comissão julgadora do trabalho de defesa da tese de dissertação, considerou-o:

( **X** ) Aprovado

( ) Reprovado

## RESUMO

A malária vivax apresenta uma aparente evolução benigna. Embora esta evolução seja branda, sua morbidade é elevadíssima nas regiões endêmicas, de modo que, fora da África, a incidência de *P. vivax* é superior a de *P. falciparum*. Vários motivos podem explicar estes índices elevados, como a recaída, fluxo migratório, falha terapêutica e resistência de cepas. A menos que um plano de combate à doença considere estes fatores, seus objetivos malograrão, como em várias propostas de erradicação. Assim, novas estratégias foram baseadas em particularidades locais, de modo que, no Brasil, houve uma redução da prevalência da malária, contudo sua incidência continua alta. Por conseguinte, novas estratégias de combate à malária, principalmente a vivax, devem levar em conta conhecimentos mais específicos à cada localidade, como por exemplo, a dinâmica de sua transmissão. Com este intuito, vários estudos sobre polimorfismos gênicos foram realizados, para distinguir populações de parasitos, especialmente utilizando os genes da proteína de superfície do merozoíto (*mSP1*) proteína circunsporozoíta (*cSP*). Utilizamos esta estratégia para analisar a diversidade de cepas de *P. vivax* no município de Porto Velho oriundas de amostras de áreas urbanas e rurais. Para tal, foi analisada 224 amostras, aproximadamente 70% de áreas rurais, a partir das quais foram extraído DNA plasmodial. Utilizamos iniciadores de regiões polimórficas I, II e III no gene *mSP1* e um bloco polimórfico do gene *cSP*, as regiões de interesse foram amplificadas por PCR. Foram detectados, aproximadamente, 158 isolados, em média. A diversidade genética observada foi similar na área rural ( $He = 0,7919$ ) e urbana ( $He = 0,8112$ ) em média, contudo, não foi verificado diferenças estatisticamente significantes entre as amostras. Nas regiões I, II e III do gene *mSP1* foram detectadas 50, 10 e 12 infecções policlonais, respectivamente, ao passo que no sistema CPS foi detectado 43. Os resultados indicam que os parasitos analisados de regiões rurais são, estatisticamente, semelhantes àqueles de áreas urbanas. Portanto, estes resultados podem indicar a possibilidade de circulação de parasitos entre áreas urbanas e rurais, de tal sorte que aumenta a possibilidade de que cepas resistentes, ou com maior virulência, possam espalhar rapidamente dentro do município.

**Palavras-chaves:** Malária, MSP1, CSP, polimorfismos genéticos, *P. vivax*.

## ABSTRACT

The vivax malaria presents an apparent benign clinical outcome. In spite of this benign infection, its morbidity is very high in endemic regions, in such a way that, outside Africa, the incidence of *P. vivax* is more than *P. falciparum*. Several reasons can explain these high rates, such as relapse, migration, therapeutic failures and resistant strains. Unless a plan to combat the disease considers these factors, their goals will fail, as in several eradication proposals. Thus, new strategies were based on local conditions, so that, in Brazil, there was a reduction in the prevalence of malaria, nevertheless its incidence remains high. Therefore, new strategies to combat malaria, mainly vivax, should take into account more specific information from each location, such as the dynamics of its transmission. To determine this, several studies on gene polymorphisms, to distinguish populations of parasites were made, especially in the genes of the merozoite surface protein (*msp1*) and circumsporozoite protein (*csp*). We used this strategy to analyze the diversity of *P. vivax* strains in Porto Velho samples from urban and rural areas. Therefore, 224 samples were analyzed, ~ 70% from rural areas, from which DNA was extracted from plasmodial. We used primers to amplify polymorphic regions I, II and III of *msp1* gene and polymorphic block of CSP gene by PCR. Were detected, on average, approximately 158 isolates. The observed genetic diversity was similar in the rural ( $He = 0.7919$ ) and urban ( $He = 0.8112$ ) samples, on average, however, it was not found statistically significant differences between them. In the I, II and III region of *msp1* gene were detected 50, 10 and 12 polyclonal infections, respectively, while that CSP system has detected 43. These results indicate that the parasites analyzed in the rural and urban areas are statistically similar. Therefore, these results may indicate the possibility of movement of parasites between urban and rural areas, in such a way that increases the possibility that resistant strains, or more virulence, can spread quickly within the municipality.

**Key-word:** Malaria, genetic polymorphism, *P. vivax*.

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico este trabalho à minha família, que sempre soube confortar-me e incentivar-me a prosseguir nos estudos.**

*“Ele revela o profundo e o escondido; conhece o que está em trevas, e com ele mora a luz.*

*Daniel 2:22*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter-me permitido ter prosseguido até aqui, com saúde, emprego e com a presença de minha família. Contudo, este trabalho não teria sido possível sem a presença de outras pessoas, portanto agradeço a todos:

À minha mãe, Conceição Aparecida Mesquita Taborda, por todas as mensagens de ânimo durante as fases mais difíceis. Ao meu irmão, Aldrin Willy, por toda sobriedade, opiniões concretas, companheirismo e por todas as ajudas que dele recebi durante toda minha vida, essenciais para minha formação como ser humano. A minha irmã, Janine Mesquita, que sempre fora amiga durante parte de minha infância e adolescência. Ao meu pai, Gessi Taborda, que sempre me ensinou que o trabalho duro e o estudo sempre é o melhor caminho. A minha sogra, Márcia Santana, que tantas vezes me serviu almoço durante desgastantes jornadas de trabalho em sábados e domingos. E em especial minha esposa, Jamile Mariano Macedo Taborda, que sempre esteve presente, me fortalecendo, auxiliando, conquistando meu coração e ensinando que a presença de uma família unida é essencial para vivermos em um mundo tão caótico.

Ao meu orientador Dr. Mauro S. Tada pela oportunidade de ter realizado este mestrado.

Todos os docentes pelos ensinamentos e esforços para que este programa fosse possível. Em especial, deixo meus agradecimentos ao Prof. Dr. Fernando Zanchi, pois sem os conhecimentos de bioinformática este trabalho seria muito mais difícil.

À todos discentes da Pós-Graduação em Biologia Experimental da turma de 2013, que sempre apoiaram-nos, através de brincadeiras, conversas sérias, auxílios financeiros e técnicos. Que permitiram um excelente convívio até mesmo nos momentos mais difíceis. Em especial ao Doutorando Dionatas Meneguetti que muito me ensinou sobre a pesquisa acadêmica nos dias atuais, e muito receptivo deu abrigo durante minha estada na cidade de Rio Branco. Ao grande colega André Grecco pelas ajudas e discussões químicas. Cleópatra Caldeira, Tiago Bispo Marcela Silva, Thaís Santos, por todas as discussões em imunologia, pelos nossos encontros em que pudemos aliviar o estresse do mestrado.

Aos colegas do laboratório de Epidemiologia que tornaram parte deste estudo possível, seja pelas coletas, exames, conversas, apoios, em especial ao grande amigo Alcides Procópio Justiniano da Silva Júnior, Mara Nascimento, Josiane Mendes, Jeane Zefferino, Alzemar Lima, e ao Prof. Dr. Tony H. Katsuragawa.

Aos colegas do laboratório de Plataforma Técnicas que permitiram a execução laboral de parte dos experimentos em seus termocicladores. A ajuda de vocês, seja nos equipamentos, nas opiniões técnicas ou no convívio foi fundamental para este trabalho, obrigado a Vanessa Baffini, Fabianne Araújo, Luan Felipe, Ji Santos, e a Dra. Deusilene Souza.

Ao laboratório de Microbiologia nas pessoas da Dra. Najla Benevides, Núcia Cristina Lima, José Ribeiro, Rosimar Esquerdo pelo excelente convívio, apoio técnico e colaborações.

À secretaria do CEPEM, que sem o apoio de vocês este trabalho seria ainda mais difícil, senão impossível, obrigado, em especial aos amigos Ronelson Olepmac, Renata Santos e Ângela, por todas as conversas e desabafos.

À todos os funcionários do Centro de Diagnóstico da Malária, aos microscopistas, entrevistadores. Sem vocês este trabalho não seria possível.

À equipe do Dr. Dhélio Batista pelo auxílio técnico nas coletas, e pela parceria.

Aos colegas do ambulatório de Hepatites que muitas vezes coletaram material biológico em horários inconvenientes, pela amizade e pelo ambiente fraternal, em especial aos amigos Antônio Carlos, Maria Leide e Silvia Xavier.

À equipe da sala de lavagens e esterilização por todo apoio, além de suas funções.

Aos amigos que não estão mais no CEPEM, mas são pessoas positivas, que nos alegram, trocam informações úteis e que são aqui lembradas: Elci Freitag, Flávio Augusto, Fabileudes Gomes.

À Dona Cláudia da lanchonete do CEMETRON que tantas vezes me serviu lanches fiados, possibilitando o trabalho até mais tarde.

Aos Drs. do finado laboratório de Genética Humana Vera Engracia, Josileide Farias, Andonai Krauze, Jefferson Santos, Marlene Guimarães e Milena Jano, pois todos vocês foram amigos e orientadores. Obrigado, pois com vocês eu fiz meu ingresso na ciência.

Ao prof. Dr. Luiz Hildebrando por ter plantado uma semente de pesquisa neste estado, por toda sua dedicação (*in memoriam*).

Ao Governo do Estado de Rondônia por todo apoio (salarial) e logístico (CEPEM) que tornou este trabalho possível. Agradeço também ao apoio operacional da recém-criado FIOCRUZ-RO.

Em especial, agradeço ao Laboratório de Epidemiologia Molecular da Malária por ter sido minha casa durante quatro anos como funcionário público, e onde realizei meus experimentos. Agradeço ao grande amigo e aconselhador Francisco Lurdevanhe da Silva Rodrigues. Agradeço também o apoio das alunas de Iniciação Científica Carina Fabrícia e Rivânia Rodrigues que tanto me ajudaram na reta final deste trabalho. Agradeço especialmente a Dra. Joana D'Arc Neves Costa com quem aprendi inúmeras técnicas e tive o prazer ter uma amiga, e não um chefe imediato, que por meio de orientações e críticas tornou esse trabalho ainda melhor.

Agradeço especialmente a todos os pacientes que doaram seu sangue à esta pesquisa. Desejo imensamente que através desta e de outras pesquisas, a malária possa vir a ser apenas um pequeno problema neste estado.

A todos vocês meus mais sinceros agradecimentos

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição do número estimado de casos de malária em 2013. ....	19
Figura 2. Evolução dos casos de malária no Brasil entre 1960 a 2013 .....	21
Figura 3. Esquema descritivo do polimorfismo no gene <i>P. vivax csp</i> .....	25
Figura 4. Comparações do gene e da proteína de Superfície do Merozoíto 1 entre <i>P. vivax</i> , <i>P. falciparum</i> e outras espécies de <i>Plasmodium</i> . ....	27
Figura 5. Divisão do Município de Porto Velho .....	30
Figura 6. Posição dos iniciadores ao longo do gene <i>msp1</i> .....	38
Figura 7. Validação da qualidade de amostras de gDNA extraídas .....	46
Figura 8. Espectrofotogramas de 4 amostras de DNA .....	46
Figura 9. Perfil eletroforético do sistema RgMSP1 .....	48
Figura 10. Relação entre infecções mono e policlonais ao local de infecção e carga parasitária estimada, no sistema RgMSP1 .....	50
Figura 11. Padrão de restrição do sistema MSP1F2 pela enzima <i>Alu I</i> .....	51
Figura 12. Padrão de restrição do sistema MSP1F2 pela enzima <i>Bst NI</i> .....	52
Figura 13. Polimorfismos genéticos observados em MSP1F3 .....	54
Figura 14. Infecções mono e policlonais do sistema CSP.....	56
Figura 15. Modelo demonstrando estrutura em forma de grampo (hairpin) dos iniciadores ...	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de registros de casos de malária no Brasil, em Rondônia e em Porto Velho, no ano de 2013.....	23
Tabela 2. Método tradicional de avaliação semiquantitativa (em cruces).....	32
Tabela 3. Iniciadores utilizados .....	37
Tabela 4. Sequências utilizadas para confecção dos iniciadores. ....	39
Tabela 5. Amostras coletadas, distribuídas por projeto.....	45
Tabela 6. Perfil epidemiológico das amostras selecionadas para estudo .....	45
Tabela 7. Total de amostras e parasitos identificados em cada sistema .....	47
Tabela 8. Perfil epidemiológico molecular da RgMSP1 .....	48
Tabela 9. Relação entre formas polimórficas do sistema RgMSP1 com a parasitemia .....	49
Tabela 10. Diversidade gênica no marcador RgMSP1 .....	49
Tabela 11. Relação de infecções policlonais com local de infecção e grau parasitário, em RgMSP1 .....	50
Tabela 12. Perfil epidemiológico molecular da MSP1F2/ <i>Alu I</i> .....	52
Tabela 13. Perfil epidemiológico molecular da MSP1F2/ <i>Bst NI</i> .....	53
Tabela 14. Diversidade gênica no marcador MSP1F2 .....	53
Tabela 15. Perfil epidemiológico dos padrões polimórficos da MSP1F3 nas amostras.....	55
Tabela 16. Diversidade gênica no marcador MSP1F3 .....	55
Tabela 17. Perfil epidemiológico molecular do sistema CSP .....	56
Tabela 18. Diversidade gênica no marcador CSP .....	57

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 .....	44
Equação 2 .....	44
Equação 3 .....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
(n)	Número amostral
~	Aproximadamente
®	Marca Registrada
°C	Graus Celsius
ACT	Combinação de Terapias baseadas em Artemisinina
BRA	Brasil
CA	Califórnia
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
cds	Codante
CEPEM	Centro de Pesquisa em Medicina Tropical
cm	Centímetro
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
CSP	Proteína Circumsporozoíta
DDT	1,1,1-trichloro-2,2-di(4-chlorophenyl)ethane ou Diclorofenil-tricloro-etano
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
EFMM	Estrada de Ferro Madeira-Mamoré
EUA	Estados Unidos da América
g	grama
G	Gravidade
gDNA	DNA genômico
He	Heterozigosidade esperada
Ho	Hipótese nula
IA	Iowa
INCRA	Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária
K3EDTA	Anticoagulante Ácido etilendiamino tetra-acético
Kb	Quilo base
KDa	Quilo Dalton
LB	Tampão de corrida ( <i>Loading Buffer</i> )
IMC	Infecções monoclonais
ln	Logarítmo natural
IPC	Infecções policlonais
M	Molar
M/v	Massa/Volume
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
ml	mililitro
mm	milímetro
mm	milímetro
µl	microlitro
µM	Micromolar
mM	Milimolar
mm <sup>3</sup>	milímetro cúbico
MO	Missouri
MSP1	Proteína de Superfície do Merozoíto 1

MSP1-19	Fração de 19 Kda da MSP1
MSP1F1	Segmento 1 da MSP1
MSP1F2	Segmento 2 da MSP1
MSP1F3	Segmento 3 da MSP1
NA	Número de Alelos
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato disódico bibásico
NaCl	Cloreto de Sódio
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Fosfato de sódio monobásico hidratado
NC	Carolina do Norte
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Ne	Número Efetivo de Alelos
ng/μl	nanograma/microlitro
Nm	Nanômetro
nM	nano Molar
O	Oeste
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Padrão Analítico
pb	Par(es) de base(s)
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGEM	Programa Global de Erradicação da Malária
PIACM	Plano de Intensificações de Controle da Malária
PNCM	Programa Nacional de Controle da Malária
PV200	1ª descrição da proteína MSP1 em <i>P. vivax</i>
Pvcs	Gene da proteína circumsporozoíta de <i>P. vivax</i>
<i>Pvgam1</i>	Gene do Antígeno gametocítico 1 de <i>P. vivax</i>
Pvmsp1	Gene da proteína de superfície do merozoíta 1 de <i>P. vivax</i>
Pvmsp3 □	Gene da proteína de superfície do merozoíta 3 alfa de <i>P. vivax</i>
□	Correlação do tamanho alélico
qsp	Quantidade suficiente para obter volume final
RFLP	Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos de Restrição
RgMSP1	Sistema de PCR para amplificar segmento 1 da MSP1
RPM	Rotações por Minuto
S	Sul
SE	Erro padrão
SESAU	Secretaria do Estado da Saúde
SIVEP/Malária	Sistema de Vigilância Epidemiológica da Malária
SP	São Paulo
St Louis	Saint Louis
TAE 1X	Tampão Tris-Acetado-EDTA uma vez concentrado
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmico Pirúvica
TM	Temperatura de pareamento
™	Marca registrada (do inglês <i>Trade Mark</i> )
UK	Reino Unido

UV	Ultra violeta
V	Volts
v/v	Volume/volume
W	Watt
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	18
1.1. A MALÁRIA .....	18
1.2. EPIDEMIOLOGIA .....	18
<b>1.2.1. Estratégias de controle da malária no mundo</b> .....	19
<b>1.2.2. Controle da malária no Brasil</b> .....	20
<b>1.2.3. A malária em Rondônia e Porto Velho</b> .....	21
1.3. INFECÇÕES POR <i>P. vivax</i> .....	23
1.4. DIVERSIDADE GENÉTICA EM <i>P. vivax</i> .....	24
<b>1.4.1. Proteína do Circunsporozoíto (CSP)</b> .....	24
<b>1.4.2. Proteína de Superfície do Merozoíto 1 (MSP1)</b> .....	25
2. JUSTIFICATIVA .....	28
3. OBJETIVOS .....	29
3.1. GERAL .....	29
3.2. ESPECÍFICOS .....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	30
4.1. LOCAL DE ESTUDO .....	30
4.2. COMITÊ DE ÉTICA .....	31
4.3. AMOSTRAS .....	31
<b>4.3.1. Critérios de inclusão</b> .....	31
<b>4.3.2. Critérios de exclusão</b> .....	31
<b>4.3.3. Pesquisa de <i>Plasmodium</i></b> .....	32
<b>4.3.4. Coleta do material biológico</b> .....	33
4.4. EXTRAÇÃO DE DNA PLASMODIAL .....	34
<b>4.4.1. Extração genômica por kit comercial</b> .....	34
<b>4.4.2. Extração de DNA em papel filtro pelo método de Fenol-Clorofórmio</b> .....	35

4.5.	QUANTIFICAÇÃO DO gDNA POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	36
4.6.	QUALIDADE DE gDNA AVALIADA POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	36
4.7.	INICIADORES E ANÁLISE BIOINFORMÁTICA ( <i>IN SILICO</i> ).....	36
4.8.	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) .....	40
4.8.1.	<b>Condições utilizadas na PCR</b> .....	41
4.8.2.	<b>Eletroforese em gel de Agarose dos produtos de PCR</b> .....	41
4.9.	SENSIBILIDADE DOS ENSAIOS .....	42
4.10.	PCR/RFLP – POLIMORFISMOS DE COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO .....	42
4.11.	PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA PCR .....	42
4.12.	SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DA PCR .....	43
4.13.	ANÁLISE DOS DADOS .....	43
5.	<b>RESULTADO</b> .....	45
5.1.	AMOSTRAS .....	45
5.2.	GENOTIPAGEM .....	47
5.2.1.	<b>Sistema RgMSP1</b> .....	47
5.2.2.	<b>Sistema MSP1F2</b> .....	50
5.2.3.	<b>Sistema MSP1F3</b> .....	53
5.2.4.	<b>Sistema CSP</b> .....	55
6.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	58
7.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	64
8.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	65
	<b>ANEXOS</b> .....	76
	<b>APÊNDICE</b> .....	86

### 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1. A MALÁRIA

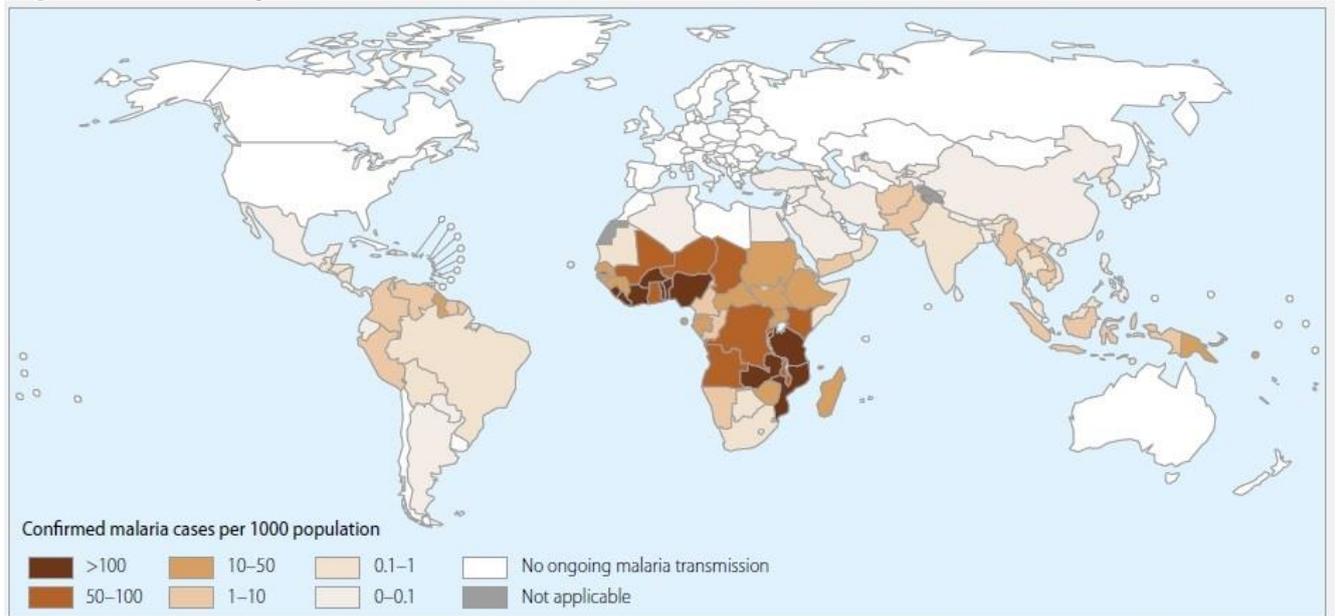
A malária é uma doença antiga, no entanto, sua descoberta só ocorreu em 1880, quando Alphonse Laveran observou os parasitos em sangue de pacientes argelinos sintomáticos (CDC, 2012a; HUSSEIN; MATIN; NERLICH, 2013). Dois padrões de sintomas eram observados, a febre terçã (febre a cada dois dias) e febre quartã (sinais clínicos a cada três dias), o que levou Camilo Golgi, em 1885, supor que deveria haver no mínimo duas formas da doença. Fato verificado em 1891 com o desenvolvimento de métodos para a coloração dos parasitos da malária (KAKKILAYA, 2011). Apesar de se conhecer o agente etiológico da malária, sua transmissão permanecia desconhecida, até 1897 quando Ronald Ross descobriu a presença de parasitos da malária em vetores do gênero *Anopheles*, após terem realizados o repasto sanguíneo em pacientes infectados pela doença (CDC, 2012b).

Sua infecção deve-se ao protozoário parasito do gênero *Plasmodium* (Filo Apicomplexa: Haemosporidia, Levine, 1970), que é transmitido de um hospedeiro a outro através de um vetor. Existe um grande número de espécies do gênero *Plasmodium* que infectam humanos, outros mamíferos, aves e répteis. Cinco espécies de *Plasmodium* podem infectar humanos, sendo descritos os *P. vivax* e *P. falciparum*, como os mais importantes do ponto de vista da morbidade, além de *P. malarie*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (CALDERARO et al., 2013).

#### 1.2.EPIDEMIOLOGIA

No mundo, de acordo com dados atuais, 97 países ou territórios continuam ser endêmicos para a malária (Figura 1), de forma que cerca de 3,4 bilhões de pessoas estão em áreas com risco de infecção. Foram estimadas 198 milhões de pessoas sintomáticas à doença, com letalidade conjecturada em 584 mil mortes, sendo que destas, 90% na África, e, aproximadamente, 78% destes, em crianças abaixo de 5 anos (WHO, 2014).

**Figura 1.** Distribuição do número estimado de casos de malária em 2013.



Fonte: (WHO, 2014)

### 1.2.1. Estratégias de controle da malária no mundo

As descobertas do agente etiológico da doença (1880), seu vetor e ciclo de vida (1897) deram subsídios para o desenvolvimento de estratégias de controle (NÁJERA; GONZÁLEZ-SILVA; ALONSO, 2011), de tal forma que na segunda metade do século XX houve uma regressão da abrangência da enfermidade no Norte da Europa e América (WILLIAMS, 1963; MENDIS et al., 2009).

Aliado à eficácia do DDT, um potente inseticida (METCALF, 1973) e da cloroquina (KRAFTS; HEMPELMANN; SKÓRSKA-STANIA, 2012) a Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou o Programa Global de Erradicação da Malária (PGEM) em 1955 (MENDIS et al., 2009), de tal modo que 37 dos 143 países endêmicos à malária em 1950 estavam livres da doença em 1978, incluindo 27 na Europa e nas Américas (MENDIS et al., 2009).

No entanto, o programa foi abandonado em virtude do surgimento de vetores resistentes ao DDT (LIVADAS; GEORGOPOULOS, 1953), vetores exofílicos, dificuldades na borrifação de inseticidas (CURTIS; LINES, 1985), dificuldade organizacional de muitos países endêmicos (MACCORMACK, 1984; CURTIS; LINES, 1985; TALISUNA; BLOLAND; D'ALESSANDRO, 2004), e a presença de parasitos resistentes à cloroquina (WHO, 1960; PAYNE, 1987).

Outras propostas de erradicação também resultaram em falhas (WHO, 1969), e, por conseguinte, foram abandonadas em favor de uma estratégia baseada no controle da doença, definido na Conferência Ministerial de 1992, em Amsterdã, pela OMS. Foram definidos os seguintes objetivos: a) diagnóstico precoce e pronto tratamento; b) implementação de medidas preventivas; c) prevenção e rápida contenção de surtos epidêmicos e avaliação regular da situação local da malária (WHO, 1992, 1993).

Mesmo após a adoção de novas orientações no controle da malária, a doença continua persistente em um grande número de países, com a manutenção de uma alta incidência nos últimos anos (WHO, 2008, 2013, 2014).

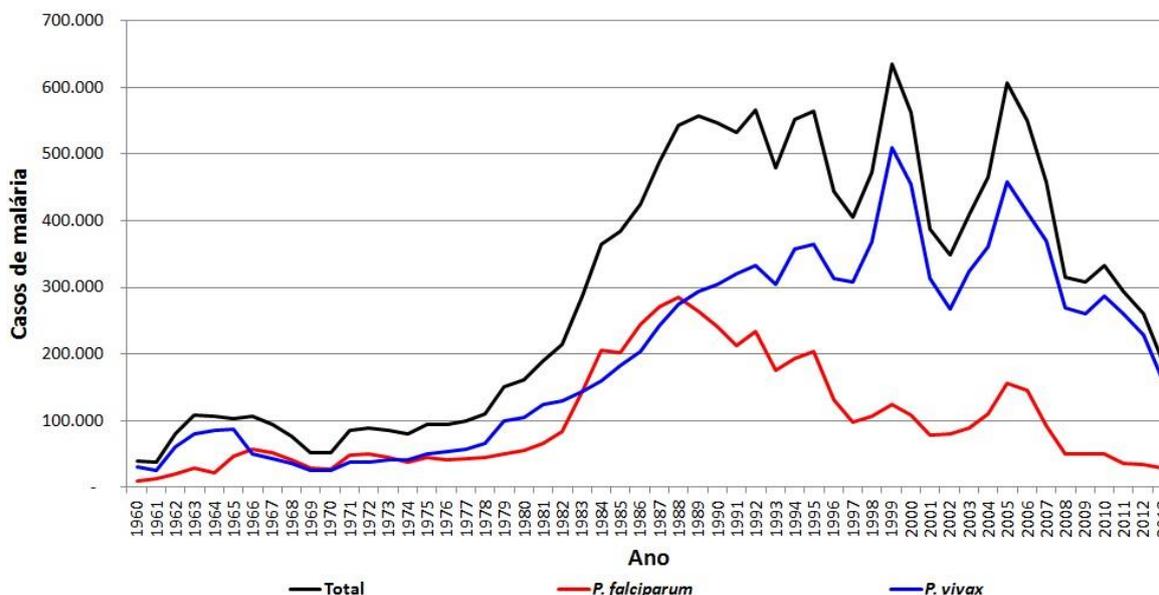
### **1.2.2. Controle da malária no Brasil**

A primeira grande estratégia de combate à malária no Brasil ocorreu na década de 30, no Rio Grande do Norte, quando o Nordeste brasileiro foi invadido pelo *Anopheles gambiae*, vetor altamente competente, oriundo de Dakar, provavelmente trazido por navios e hidroaviões franceses (PINTO, 1939). O surto foi controlado com o uso extensivo de larvicidas e inseticidas, bem como massivo tratamento de doentes e a quimioprofilaxia. (DEANE, 1988).

A estratégia usada no Nordeste foi adaptada aos moldes do PGEM, implantada no Brasil em 1965 (LOIOLA; SILVA; TAUIL, 2002), utilizando o DDT como inseticida (ANDRADE; HOCHMAN, 2007). Houve uma grande redução dos casos de malária, a 36,9 mil pessoas infectadas anualmente, em média. No entanto, a presença de vetores nativos bem como a dificuldade logística de seu combate na Amazônia não permitiu o mesmo sucesso obtido no Rio Grande do Norte (CAMARGO, 2003).

Com o processo migratório das décadas de 70-80 no Norte do Brasil, a malária apresentou aumentos expressivos em sua incidência. A região recebeu cerca de 900 mil pessoas, motivado por programas de assentamento, do Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA), e atividades de garimpo. Os casos de malária dobraram em cinco anos de 189.319 casos em 1981 para 384.603 em 1985 (MARQUES, 1986). Esses registros correspondem a 99,75% de todos os casos registrados da malária no Brasil (399.462 casos no Brasil) (Figura 2, Tabela 1) (BOTELHO et al., 1988; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

**Figura 2.** Evolução dos casos de malária no Brasil entre 1960 a 2013



Fonte: Gerência Técnica de Malária et al., 2014 adaptado de Loiola; Silva; Tauil, 2002; Oliveira-Ferreira et al., 2010.

Vários programas de erradicação e controle da doença na Amazônia foram propostos, malogrando em grande maioria em virtude de falhas operacionais (LOIOLA; SILVA; TAUIL, 2002). Os melhores resultados foram obtidos pelo Plano de Intensificações das Ações de Controle da Malária (PIACM) em 2000 (BRASIL, 2000), com redução de cerca 50% da incidência da doença 2002, em que foram registrados 238,5 mil registros (BRASIL, 2002), e o Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (PNCM), (2002) com a ampliação e melhoramento da rede de atendimento, bem como treinamento de recursos humanos (BRASIL, 2000, 2002; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

O PIACM e o PNCM surtiram em efeitos positivos, ainda assim, a prevalência da malária permanece alta na Amazônia Ocidental, embora que, apresente uma tendência de queda, mas próximas dos 200 mil casos anuais (Figura 2. Tabela 1) (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

### 1.2.3. A malária em Rondônia e Porto Velho

Em Rondônia, a malária esteve fortemente associada aos processos migratórios. O primeiro deles ocorreu com o aumento do valor da borracha, que motivou a migração de um grande contingente populacional proveniente de várias regiões brasileiras e de países

circunvizinhos, principalmente Bolívia, em direção ao Norte brasileiro, sobretudo as atuais regiões de Porto Velho e Acre (TOCANTINS, 1979 apud FREITAS, 2013).

Tal processo migratório gerou uma disputa entre Brasil e Bolívia pelo território do Estado do Acre. A disputa foi resolvida com o acordo de Petrópolis, que culminou com a construção da Estrada de Ferro Madeira-Mamoré (EFMM), iniciada em 1872 e finalizada em 1912. A obra iniciou outro grande movimento migratório, desta vez de operários. Estes foram duramente castigados pelo ambiente insalubre, malária, febre amarela, beribéri, animais peçonhentos e ataques de índios (BRITO, 2003; KATSURAGAWA et al., 2008). A epidemia da malária durante a construção obrigou as empreiteiras solicitarem auxílios de Oswaldo Cruz e Carlos Chagas para analisarem e proporem esquemas sanitários à melhoria e profilaxia da doença (SCHWEICKARDT; LIMA, 2007).

De modo semelhante, porém com menor fluxo migratório, a Comissão Rondon (1907-1915), igualmente sofreu com o paludismo, necessitando do apoio de vários médicos e sanitaristas durante a construção das linhas telegráficas entre Rondônia e Centro-Oeste (VITAL, 2012). Mas sem dúvida nenhuma, os processos que mais alavancaram a incidência da malária no Norte do Brasil, e, portanto, em Rondônia, foram os projetos de colonização durante as décadas de 70-80 (PINHEIRO, 1982; DEANE, 1988; KATSURAGAWA et al., 2008; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). O aumento da incidência da malária no Brasil foi associado, principalmente, à entrada de um grande contingente populacional, muitas vezes vindo de regiões não malarígenas, e, portanto, sem imunidade para a doença. “O incremento da malária na região é mais um problema de ecologia humana” (TAUIL et al., 1985).

Após as grandes migrações das décadas de 70-80, a malária, no Brasil, concentrou-se na Amazônia Legal, de tal modo que em 2008, dos 315 mil casos registrados, 99,9% destes ocorreram dentro da Amazônia Legal (DA SILVA-NUNES et al., 2013), sendo que mais de 80% destes registros devem-se às infecções por *P. vivax* (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; DA SILVA-NUNES et al., 2013).

Sua incidência, no entanto, vem reduzindo anualmente, sendo registrados, em 2013, 177.679 casos da doença no Brasil, e de modo semelhante a 2008, cerca de 80% destes registros devem-se a infecções por *P. vivax* (BRASIL, 2014). Rondônia corresponde por 8% dos casos no Brasil, e Porto Velho por 5%. A contribuição de *P. vivax* em relação ao total de

casos registrados é de, aproximadamente, 95%, nestas localidades (dados de 2013, Tabela 1) (BRASIL, 2014).

**Tabela 1.** Número de registros de casos de malária no Brasil, em Rondônia e em Porto Velho, no ano de 2013.

<b>Registros</b>	<b>Brasil</b>	<b>Rondônia</b>	<b>Porto Velho</b>
<b>Total</b>	177679	14497 (8,2)	9134 (5,1)
<b><i>P. vivax</i></b>	143324 (80,7)	13766 (95)	8719 (95,5)
<b><i>P. falciparum</i></b>	29228 (16,4)	605 (4,2)	391 (4,3)
<b><i>P. vivax</i>+<i>P. falciparum</i></b>	2474 (1,4)	49 (0,3)	24 (0,3)

Fonte: (BRASIL, 2014)

### 1.3. INFECÇÕES POR *P. vivax*

A malária vivax foi caracterizada com febre terçã benigna, por apresentar uma evolução clínica não complicada, ao contrário de *P. falciparum* que apresenta uma alta mortalidade. No entanto, muitos estudos têm reportado complicações clínicas em pacientes portadores de *P. vivax* (ANSTEY et al., 2007; KIM et al., 2007; PRICE et al., 2009; PRICE; DOUGLAS; ANSTEY, 2009; TANWAR et al., 2011; AGGARWAL et al., 2013; BHATTACHARJEE et al., 2013; CHALKIAS et al., 2013; MCGREADY et al., 2014).

Outra característica da malária decorrente da infecção por *P. vivax* é sua maior prevalência quando comparada com a de *P. falciparum* fora da África Subsaariana (WHO, 2013), com maior evidência em países asiáticos e sul americanos, de tal forma que nos países da Bacia Amazônica, 77% do total das infecções correspondam àquela espécie (DA SILVA-NUNES et al., 2013), e que, portanto, torna a população em risco de infecção por *P. vivax* maior que em *P. falciparum* (PRICE et al., 2009). Deste modo, faz-se necessário aumentar a atenção à malária vivax.

Portanto, a alta prevalência de *P. vivax*, em nossa região, bem como a possibilidade de evoluções graves da doença torna necessário medidas de controle mais intensas. Um ponto chave para seu controle é o entendimento sobre a estrutura populacional e a dinâmica de transmissão da doença, pois a pressão seletiva, natural ou não (aspectos imunológicos, alterações ambientais, entre outros fatores), sob os vetores e os parasitos podem determinam um padrão particular de transmissão (JOY et al., 2008; ARNOTT; BARRY; REEDER, 2012).

As análises epidemiológicas demonstram que a distribuição da malária não é homogênea na Amazônia, ocorrendo regiões de alta transmissão (LOIOLA; SILVA; TAUIL, 2002). Nestes locais, estudos sobre o vetor e o parasito, bem como as condições ambientais são necessárias para compreender como ocorre a dinâmica de transmissão, de tal maneira que os pontos de maior contágio da doença sejam controlados (GREENWOOD, 2008). Essas regiões podem ser a fonte da manutenção daquelas altas incidências (REID et al., 2010)

Assim, a avaliação da diversidade de cepas e como estas se distribuem em um determinado local geográfico é importante para entender como ocorre, portanto, a transmissão da doença (CUI et al., 2003a) e desta forma planejar seu controle.

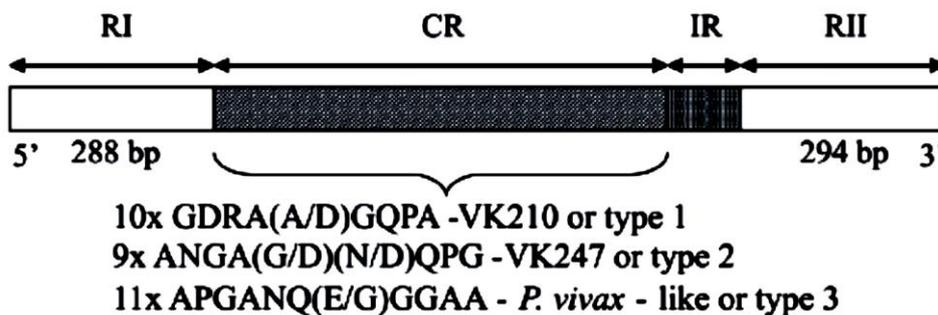
### 1.4. DIVERSIDADE GENÉTICA EM *P. vivax*

Os primeiros marcadores utilizados para determinar variação em *P. vivax* eram genes ortólogos já descritos em *P. falciparum*. Quatro genes polimórficos de cópia única em *P. vivax* têm sido utilizados em estudos de epidemiologia molecular. *Pvgam1*, antígenos de gametócitos; *Pvcs*, codificando a proteína do circunsporozoíta; *PvmSP1* e *PvmSP3 $\alpha$* , genes codantes das proteínas de superfície do merozoíta 1 e 3 alfa, respectivamente (KIMURA et al., 1990; KIRCHGATTER; DEL PORTILLO, 1998; IMWONG et al., 2005; HAVRYLIUK; FERREIRA, 2009)

#### 1.4.1. Proteína do Circunsporozoíta (CSP)

A proteína do circunsporozoíta (CSP) é uma proteína de revestimento exterior à membrana do esporozoíta com 37,875 KDa (NUSSENZWEIG; NUSSENZWEIG, 1985) A proteína é codificada por um único gene presente no cromossomo 8, sem a presença de íntrons, com uma sequência de 1134 pares de bases (pb) (Gene anotado no PlasmoDB: PVX\_119355) (AURRECOECHEA et al., 2009; PLASMODB, 2013a). O gene *csp* consiste de um domínio central imunodominante flanqueado por dois domínios não repetidos, sendo encontrados nestas regiões poucos polimorfismos (MANN et al., 1994) (Figura 3).

Figura 3. Esquema descritivo do polimorfismo no gene *P. vivax csp*



Fonte: de Souza-Neiras; De Melo; Machado, 2007, modificado.

O gene *csp* foi isolado e caracterizado em 1985, apresentando regiões com aminoácido hidrofóbicos nas posições –NH<sub>2</sub> e –COOH terminais, servindo como âncora e sinal, respectivamente (ARNOT et al., 1985; DE SOUZA-NEIRAS; DE MELO; MACHADO, 2007). O ponto mais importante deste gene é a repetição em série de uma sequência de 9 aminoácido (Figura 3), constituindo cerca de 49% de toda a proteína (ARNOT et al., 1985; CUI et al., 2003b; BONILLA et al., 2006).

As análises destas regiões de repetições demonstraram dois padrões polimórficos, denominados VK210 e VK247 (MANN et al., 1994). Em 1993, um novo polimorfismo foi descoberto, o qual foi denominado *P. vivax-like* (QARI et al., 1993). Ambos os padrões polimórficos são encontrados amplamente distribuídos no mundo (IMWONG et al., 2005; BONILLA et al., 2006; ZAKERI et al., 2006; CHENET et al., 2012). No Brasil, as formas VK210, VK247 e *P. vivax-like* foram encontradas em Amapá, Pará e Rondônia, de tal modo que somente a forma VK210 foi encontrada monoclonalmente em pacientes (MACHADO; PÓVOA, 2000). Foi relatado que há uma maior suscetibilidade à infecção pelas cepas VK210 e VK247 nas espécies neotropicais de *An. Albimanus* e *An. Pseudopunctipennis*, *An. Aquasalis* e *An. Darlingi* (MACHADO et al., 2003; DA SILVA et al., 2006).

#### 1.4.2. Proteína de Superfície do Merozoíto 1 (MSP1)

A proteína MSP1 foi descrita inicialmente como Antígeno de Superfície do Merozoíto 1 (MAS-1, em inglês) por Holder e Freeman em 1982, através da produção de anticorpos monoclonais contra esquizontes de *P. falciparum*. Posteriormente foi verificada a presença de múltiplas formas do antígeno (HOLDER; FREEMAN, 1982).

A MSP1 de *P. falciparum* é uma proteína ancorada com Glicosilfosfatidilinositol (GPI), na região C-terminal, a proteína tem massa entre 190-200 KDa. Inicialmente a proteína é clivada em 4 produtos proteolíticos denominados P83, P30, P38 e P42. Estes fragmentos formam um complexo não-covalente na superfície do merozoíto (MCBRIDE; HEIDRICH, 1987).

A porção P42 é então novamente clivada liberando o fator MSP1-19, que é internalizado em novos eritrócitos recém-invadidos. Tem sido demonstrado que anticorpos contra os epítomos da MSP1, bem como anticorpos monoclonais contra a porção MSP1-19 inibem a invasão de novos eritrócitos, por bloquearem processamento secundário da proteína (LIN et al., 2014).

Já em *vivax*, a proteína foi descrita inicialmente como Pv200 em 1987, também obtida por meio de anticorpos monoclonais. A MSP1 foi clonada em 1988 (DEL PORTILLO et al., 1988) e seu gene caracterizado em 1991 (DEL PORTILLO et al., 1991). A *msp1*, em *P. vivax*, está localizado no cromossomo 7, anotado no PlasmoDB: PVX\_099980. O gene tem 5256 pb e não apresenta íntrons, codificando uma proteína com 196,123 KDa (AURRECOECHEA et al., 2009; PLASMODB, 2013b)

Foi prevista certa homologia entre o gene *msp1* de *vivax* com o *msp1* de outras espécies, haja vista que as proteínas de *vivax* e *falciparum* apresentavam localizações semelhantes no parasito, através de imunofluorescência (DEL PORTILLO et al., 1988). Tal homologia foi demonstrada com o alinhamento de sequencias nucleotídicas, de modo que entre o gene de *P. vivax* e o gene de *P. falciparum* foi encontrado uma similaridade de 45-47%, e de 34,3% com o gene do *P. yoelli* (DEL PORTILLO et al., 1988, 1991; GIBSON et al., 1992).

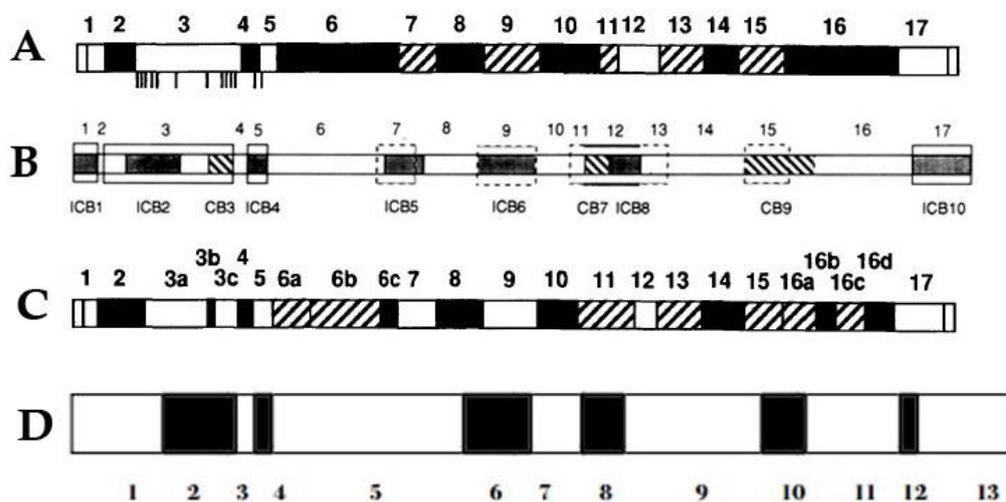
Todavia, uma diversidade intraespecífica do gene, e, portanto da proteína, era esperado, pois a análise da expressão da proteína precursora demonstrou a presença de glicoproteína de tamanhos variados (MCBRIDE; HEIDRICH, 1987). Portanto, Tanabe et al., (1987) propôs, a partir da análise de quatro sequências de aminoácidos da MSP1 de *P. falciparum*, a divisão da proteína em 17 blocos (Figura 4 A). De modo que em cinco destes (1, 3, 5, 12 e 17) a sequência é altamente conservada (mais de 87% de identidade), em outras 7 regiões (2, 4, 6, 8, 10, 14 e 16) há uma grande divergência entre as sequencias (homologia

de 10 a 13%), e finalmente nas 5 áreas restantes (7, 9, 11, 13 e 15) apresentam sequencias conservadas com regiões (4 a 14 resíduos) de aminoácidos não homólogos.

Devido àquela homologia entre os genes era esperado, por conseguinte, que houvesse também entre as proteínas regiões similares. Destarte, comparando a sequência de aminoácidos entre a MSP1 de *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. yoelli*, del Portillo et al., (1991) propôs a classificação 10 Blocos Conservados Interespecíficos (ICB, em inglês, Figura 4 B) baseados na homologia superior a 50% entre 50 ou mais aminoácido contíguos. Cooper (1993) propôs uma nova divisão da MSP1 em 17 ICB (Figura 4 C), de tal modo que, regiões com homologia superior a 30% foram classificados como alta homologia.

Com a melhoria das técnicas moleculares, e a disponibilidade de mais sequencias gênicas de *P. vivax*, Putaporntip et al., (2002) baseando-se, unicamente no alinhamento do gene *msp1* de *vivax*, classificou a sequencia nucleotídica em 6 blocos interalélicos variáveis e 7 blocos conservados (Figura 4 D).

**Figura 4.** Comparações do gene e da proteína de Superfície do Merozoíto 1 entre *P. vivax*, *P. falciparum* e outras espécies de *Plasmodium*.



(A) Divisão da proteína MSP1 de *P. falciparum* em blocos. Caixa aberta blocos com alta similaridade (65-77%); caixa hachurada, blocos com média similaridade (65-77%) e caixa escura com sequências de baixa homologia (10-38%) (COOPER, 1993); (B) Divisão da proteína MSP1 em ICB, baseado nas comparações entre *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. yoelli*. As caixas internas escuras representam regiões interespecíficas conservadas, com similaridades superiores a 47%; As caixas hachuradas representam regiões com similaridade superior a 50% entre *P. vivax* e *P. falciparum*. Caixas em branco representam regiões com identidade inferior a 47% (DEL PORTILLO et al., 1991); (C) Homologia interespecíficas entre *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. chabaudi*, *P. yoelli* e *P. berghei*. Caixa aberta = sequência com alta homologia (33-46%); caixa hachurada = média homologia (9-21%) e caixa escura com sequências de baixa homologia (0%) (COOPER, 1993); (D) Localização dos blocos interalélicos do gene *msp1* em *P. vivax*. Caixas abertas = blocos conservados; caixas preenchidas regiões variáveis (PUTAPORNTIP et al., 2002)

## **2. JUSTIFICATIVA**

Na região Norte do Brasil, bem como em outros países tropicais e subtropicais, a malária continua sendo um grande problema de saúde pública. Em muitas destas regiões, a malária *vivax* apresenta uma elevada taxa de morbidade, gerando graves consequências econômicas para a sociedade. Qualquer ação que aplaque, ou mesmo elimine a incidência deste agravo trará benefícios às áreas endêmicas.

A distribuição desigual da malária na Amazônia, e, por conseguinte em Porto Velho, torna necessário avaliar os fatores que assim a caracterize. A análise não só da situação epidemiológica da malária, como também os episódios de recaídas, resistência à quimioterapia, falhas terapêuticas e o perfil das cepas circulantes, são importantes ferramentas para planejar o controle da endemia.

Portanto, baseando-se nos fatos de que o parasito apresenta um genoma com vários polimorfismos, e, que, a diversidade e variedade destes polimorfismos podem divergir de acordo com a área geográfica, foi proposto à análise molecular dos polimorfismos nos genes *msp-1* e *csp* de *Plasmodium vivax* na região endêmica de Porto Velho.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. GERAL

Avaliar perfil de polimorfismo dos genes *csp* e *msh1* em amostras de pacientes com *Plasmodium vivax* da região de Porto Velho – Rondônia.

#### 3.2. ESPECÍFICOS

- Identificar e caracterizar de polimorfismos nos blocos 1, 2 e 3 do gene *msh1*, e região de repetição central do gene *csp*;
- Comparar perfil polimorfismos analisados nos genes *csp* e *msh1* entre as populações estudadas;
- Analisar o perfil das infecções policlonais entre as localidades das amostras selecionadas;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. LOCAL DE ESTUDO

O estudo foi conduzido no Centro de Pesquisa em Medicina Tropical, vinculado à Secretaria Estadual de Saúde (CEPEM/SESAU), no laboratório de Epidemiologia Molecular da Malária, no município de Porto Velho, Rondônia, onde foram realizados todos os procedimentos experimentais, excetuando os sequenciamentos.

O município de Porto Velho está localizado no extremo Norte do Estado de Rondônia, com coordenadas entre a latitude 8°45'39,12'' Sul (S) e longitude de 63°55'56'' Oeste (O), com altitude de 85m. Faz divisa com os municípios de Candeias (Leste), Buritis (Norte), Nova Mamoré (Oeste) de Rondônia, e com o Estado do Amazonas, ao Norte, à Bolívia a Oeste e Acre ao Sudoeste.

O último censo demográfico do IBGE (2010) estimou uma população de 428.527 habitantes (BRASIL, 2010). O município apresentou um intenso crescimento populacional motivado pela construção de duas usinas hidrelétricas no Rio Madeira, Santo Antônio e Jirau, que estimulou o intenso fluxo migratório. Devido ao extenso tamanho do município de Porto Velho, a prefeitura dividiu o município em 9 regiões operacionais para controle da malária (figura 5). O Sistema de Vigilância Epidemiológica (SIVEP/Malária) classifica o município em 612 localidades ativas de notificações, entre áreas urbanas, rurais, garimpos, projetos de colonização.

**Figura 5.** Divisão do Município de Porto Velho



**Fonte:** Figura gentilmente cedida pelo Dr. Tony H. Katsuragawa, Laboratório de Epidemiologia (FIOCRUZ/CEPEM, Porto Velho – Rondônia).

### 4.2. COMITÊ DE ÉTICA

Este projeto foi submetido ao crivo do Comitê de Ética em Pesquisa do CEPEM (CEP/CEPEM). O mesmo foi aprovado com registro CAAE: 19461513.3.0000.0011. O estudo também contemplou o uso de amostras de outros projetos armazenados em biorrepositório sob os cuidados dos pesquisadores responsáveis pelos estudos prévios. A saber: a) “Avaliação do impacto do tratamento de portadores de *Plasmodium vivax* na manutenção da endemia em pacientes atendidos nas unidades de saúde de Porto Velho – Rondônia”, aprovado pelo CEP/CEPEM com o CAAE 0009.0.046.000-10, sob responsabilidade do Dr. Mauro Shugiro Tada; b) “Estudo da sensibilidade do limiar de identificação de *Plasmodium sp.* da região de Porto Velho – Rondônia”, aprovado pelo CEP/CEPEM com CAAE 0002.0.046.000-10, sob responsabilidade da Dra. Joana D’Arc Neves Costa; c) “Avaliação do desempenho de um teste de diagnóstico rápido para a malária em unidade de atendimento à doença na cidade de Porto Velho”, aprovado pelo CEP com o CAAE: 07738212.4.0000.5541, sob responsabilidade do Pesquisador Luciano Teixeira Gomes.

### 4.3. AMOSTRAS

#### 4.3.1. Critérios de inclusão

Foram adotados os seguintes critérios de inclusão de amostras: idade acima de 18 e abaixo de 65 anos, hemoscopia positiva para *P. vivax*, residência fixa em Porto Velho, quadro clínico que permita a coleta e o tratamento oral da malária, peso corporal acima de 40Kg, concordância em participar da pesquisa através da assinatura no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, em Anexo), escrito e explicado oralmente.

#### 4.3.2. Critérios de exclusão

As seguintes condições foram estabelecidas como critérios de exclusão: gestantes e/ou nutrízes; pacientes que usarem medicamentos antimaláricos nos últimos 15 dias, pacientes com outras morbidades que impeçam de participar do protocolo estabelecido, idosos acima de 65 anos, índios, presença de complicações consequentes à malária, concomitância de

outras enfermidades agudas e/ou crônico-degenerativas ou condições que não atendem aos critérios de inclusão.

#### **4.3.3. Pesquisa de *Plasmodium***

O diagnóstico para a presença de *Plasmodium sp.* foi realizado através da gota espessa, a partir de punção digital com lanceta. As lâminas foram coradas com Giemsa, pelo método de Walker, segundo recomendações do Ministério da Saúde (BRASIL, 2009).

Após a punção digital, coletar a segunda e a terceira gota de sangue, em lâmina, e espalhá-los em formato retângulo de 1,2 cm<sup>2</sup>. Após a secagem do material, sob luz incandescente 40 watts (W), é realizado a Desemoglobinação pela solução hipotônica de azul de metileno (0,2 g de azul de metileno medicinal em pó; 0,2 g de Fosfato de Potássio Monobásico; 0,6 g de Fosfato de Sódio Bibásico, diluído em 250 ml de água destilada), por dois segundos, seguido pela lavagem da lâmina com água tamponada (0,4 g de Fosfato de Potássio Monobásico; 0,6 g Fosfato de Sódio Bibásico, diluídos em 1000 ml de água destilada); após a lavagem da lâmina, apenas as regiões da gota são mantidas imersas em solução de Giemsa PA, durante 10 minutos. Após esse período a lâmina é lavada com água tamponada, e seca em estufa com luz incandescente 40 W (BRASIL, 2009).

A quantificação da parasitemia utilizada neste estudo foi o método tradicional de avaliação semiquantitativa (em cruces) de acordo com o Ministério da Saúde (tabela 2) (Brasil 2009).

**Tabela 2.** Método tradicional de avaliação semiquantitativa (em cruces)

<b>Parasitas Contados</b>	<b>Número de Campos microscópicos</b>	<b>Cruzes</b>
40 a 60	100	+/2
1	1	+
2 - 20	1	++
21 - 200	1	+++
>201	1	++++

**Fonte:** Brasil (2009)

### **4.3.4. Coleta do material biológico**

Após o aceite do paciente em participar neste projeto, foram coletados 12 ml de sangue por punção venosa, precedido por assepsia local com álcool 70%, por seringa ou método a vácuo. Deste montante, 8 ml foram armazenados em tubos ao vácuo contendo K<sub>3</sub>EDTA como anticoagulante, e 4 ml armazenados em tubos de coleta com ativador de coágulo, para obter soro.

A partir do material coletado com anti-coagulante foi realizado um esfregaço sanguíneo com cerca de 3-5 µL de sangue total em lâminas para microscópio de 25,4x76,2 mm. Foi armazenado cerca de 800 µL de sangue total em papel filtro de 3mm Whatman (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) distribuídas em 4 *spots* (com circunferência de 2 cm).

O restante do material biológico foi centrifugado a 4000 RPM (rotações por minuto) durante 7 minutos em centrífuga de tubos Fanem Baby II®, para separação das fases sanguíneas (plasma, fração leucocitária, e hemácias, e soro). As fases sanguíneas foram armazenadas em tubos de 1,5 ml (do tipo *Eppendorf*®) à -20°C. A fração leucocitária, plasma, soro e papel filtro foram armazenados para estudos posteriores. Parte das hemácias foi utilizada para a extração de DNA plasmoidal.

No projeto: “Estudo da sensibilidade do limiar de identificação de *Plasmodium sp.* da região de Porto Velho – Rondônia”, o volume sanguíneo coletado, por punção venosa, foi de 12 ml em tubo contendo a heparina (8 ml) como anticoagulante e tubo seco (4 ml). O sangue coletado foi fracionado pelos mesmos procedimentos anteriormente descritos.

Foram coletados 20 ml de sangue por punção venosa das amostras obtidas no projeto “Avaliação do impacto do tratamento de portadores de *Plasmodium vivax* na manutenção da endemia em pacientes atendidos nas unidades de saúde de Porto Velho – Rondônia”, armazenados em tubos contendo K<sub>3</sub>EDTA, heparina, fluoreto do sódio e seco (ativador de coágulo). O volume e a forma pela qual o material biológico foi armazenado devem-se ao fato de que este, além do preparo de esfregaços, armazenamento de papel-filtro, plasma, soro e hemácias para extração genômica (pelos mesmos procedimentos descritos), o material foi utilizado à realização de exames bioquímicos e hematológicos (hemograma completo com contagem de plaquetas, glicemia, tipagem sanguínea, TGO/TGP, triglicérides, colesterol, albumina, bilirrubina, uréia, creatinina).

No projeto: “Avaliação do desempenho de um teste de diagnóstico rápido para a malária em unidade de atendimento à doença na cidade de Porto Velho”, a amostra biológica foi coletada por punção venosa periférica obtendo 5 ml, sendo armazenado em tubo contendo anticoagulante K<sub>3</sub>EDTA. O material colhido foi utilizado na execução do Teste Rápido SD Biloine Malaria Ag P.f/Pan POCT (~5 µl), gota espessa (10 µl), lâmina de distendido sanguíneo (10 µl), preenchimento de papel filtro (300 µl), e o restante do material foi armazenado em biorrepositório do Laboratório de Epidemiologia (CEPEM/FIOCRUZ/ Porto Velho - Rondônia).

Os dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos por meio de entrevista, pelo médico e pesquisador/técnico de laboratório/enfermeiro, respectivamente. A determinação do provável local de infecção foi a registrada no SIVEP/MALÁRIA, baseada no relato histórico do paciente, em que é descrito os locais em que esteve presente nos últimos 15 dias.

#### 4.4. EXTRAÇÃO DE DNA PLASMODIAL

##### **4.4.1. Extração genômica por kit comercial**

O material genético do parasito foi extraído através do kit comercial GE *Healthcare Illustra Blood Genomic Mini Spin* (Little Chalfont, Bucks, UK). Para o procedimento foi utilizado 200 - 300 µL de hemácia. Três etapas foram adicionadas às orientações do fabricante, uma etapa de pré-lisagem com tampão PBS 1x (0,14M NaCl; 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, Dinâmica, Diadema, SP, Bra) com 0,05% de saponina (v/v, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), adicionado em igual volume de material a ser processado, seguido por agitação em vórtex e centrifugação a 7500 G, por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e adicionado ao precipitado 1 ml de tampão PBS 1X, seguido por agitação ao vortex, até dissolução do precipitado, sendo o material centrifugado a 7500 G, por 5 minutos.

O sobrenadante foi desprezado. Um último procedimento de lavagem com PBS 1X sob o precipitado é repetido uma vez mais, com o descarte do sobrenadante. Após essa sequência de lavagens é adicionado um volume de PBS 1X sobre o precipitado gerado de tal modo que o volume final (PBS 1X + Precipitado) seja de 300 µL. O material gerado é submetido ao processo de extração do kit comercial segundo as normas do fabricante, em seguida criopreservadas a -20°C.

### **4.4.2. Extração de DNA em papel filtro pelo método de Fenol-Clorofórmio**

As amostras do projeto “Avaliação do desempenho de um teste de diagnóstico rápido para a malária em unidade de atendimento à doença na cidade de Porto Velho” foram extraídas pelo método de fenol clorofórmio, seguindo o protocolo de Snounou (1996), inicialmente foi cortado hum spot em tiras unidas e depois armazenados em frasco tipo *Eppendorf* de 1,5 mL. Posteriormente, foi utilizado 1 mL do tampão PBS 1X, com saponina a 0,05%. Após a adição desses componentes deixou-se a 37°C em estufa microbiológica durante o período de 16 horas. No dia seguinte, a amostra foi homogeneizada no vortex e centrifugada a 12.000 rotação por minuto (RPM) por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado. A amostra foi lavada com 1ml de PBS 1X; agitada no vortex, seguido por uma centrifugação de 12.000 RPM, com descarte do sobrenadante formado. Nova fase de lavagem foi realizada, e novamente o sobrenadante foi desprezado, permanecendo 100 µL no tubo de 1,5 ml. Foi adicionado, em seguida, 60 µL do tampão de lise (0,4mM Tris/HCl pH 8,0; 80mM EDTA pH 8,0; 0,2% v/v SDS, Dinâmica, Diadema, SP, Bra) e 150 µL de Proteinase K (2 mg/mL. Invitrogen®, Carlsbad, EUA), e incubado a 37°C em estufa bacteriológica, entre 12 e 16 horas. Após incubação, foram adicionados 300 µL de água estéril (milli-Q autoclavada) e 500 µL de fenol equilibrado (GE Healthcare, Little Chalfont, Bucks, UK), e então homogeneizado por inversão (10 vezes). Na sequência, a amostra foi centrifugada a 12.000 RPM e a parte aquosa foi removida para outro frasco de 1,5ml, sendo descartado o frasco que continha o papel de filtro. Ao tubo contendo a fase recuperada, foram adicionados 250 µL de fenol equilibrado e o mesmo volume de clorofórmio (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil). Novamente foi submetido à centrifugação 12.000 RPM por 10 minutos e uma nova etapa de remoção da fase aquosa para novo tubo de 1,5, contendo 45 µL de acetato de sódio na concentração (3M pH 5), e posteriormente adicionado 1 mL de etanol PA gelado (Dinâmica, Diadema, SP, Bra), e novamente, homogeneizado por inversão (10 vezes) e foi reservado a -20°C por no mínimo 4 e máximo 16 horas. Após esse período o tubo foi centrifugado a 14.000 RPM por 15 minutos a 4°C, após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado. Foi adicionado mais de 800µL de etanol 80% (v/v) resfriado a -20°C, e novamente centrifugado a 14.000 RPM por 15 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. O tubo de 1,5 ml foi seco por aproximadamente 2 horas, à temperatura ambiente.

O material foi suspenso em 100µL de água milli-Q autoclavada. Esperou-se por aproximadamente 1 hora à temperatura ambiente, e o DNA purificado foi armazenado a 20°C negativos até o momento da análise por PCR.

#### 4.5. QUANTIFICAÇÃO DO gDNA POR ESPECTROFOTOMETRIA

Após a extração, um volume de 2 µL do gDNA foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, NC, EUA) utilizando absorvância de 260 nm. Além da quantidade de material genético (fornecido em ng/µL) também foi registrado os índices 260/280nm. A razão entre os dois índices de absorção é utilizado para medir a pureza do DNA. Uma razão de aproximadamente 1,8 nm indica um material genético com um bom grau de pureza.

#### 4.6. QUALIDADE DE gDNA AVALIADA POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A qualidade do material genético extraído foi avaliada em gel de agarose LGC Biotecnologia (São Paulo, SP, BRA) 0,8% (M/v), corado com GelRed (Uniscience/Biotium Hayward, CA, EUA) e tampão de corrida 6% (LB, 0,02% M/v azul de bromofenol; 0,02% M/v azul de xilenocianol; 40% v/v glicerol; Tampão TAE 1X qsp), utilizando 80V por 40 minutos, com tampão TAE 1X (0,04M Tris; 1,14 ml de ácido acético Glacial; 0,2mM de EDTA pH 8,0, Dinâmica, Diadema, SP, Bra), visualizado e fotodocumentado em transiluminador UV LPIX EX (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil).

#### 4.7. INICIADORES E ANÁLISE BIOINFORMÁTICA (*IN SILICO*)

Foram utilizados os iniciadores propostos por (IMWONG et al., 2005). Por dificuldades técnicas foram desenhados novos iniciadores dentro da mesma região de interesse (tabela 3). Vale ressaltar que todos os sistemas baseiam-se em Semi-Nested – PCR, exceto o sistema CSP que baseia-se na técnica de Nested-PCR.

**Tabela 3.** Iniciadores utilizados

<b>Iniciador</b>	<b>Sequencia (S/AS*)</b>	<b>Nomenclatura do sistema</b>	<b>Reação</b>	<b>TM</b>	<b>Ciclos</b>
<b>PVCS-OF1</b>	ATGTAGATCTGTCCAAGGCCATAAA (S)	CSP	Nest I	58°C	25
<b>PVCS-OR1</b>	TAATTGAATAATGCTAGGACTAACAATATG (AS)				
<b>PVCSNF1</b>	GCAGAACCAAAAAATCCACGTGAAAATAAG (S)		Nest II	68°C	30
<b>PVCSNR1</b>	CCAACGGTAGCTCTAACTTTATCTAGGTAT (AS)				
<b>F1_OR1</b>	CCACTCCATGAAACTGAAGTGTTA (AS)	MSP1F1	Nest I	68°C	25
<b>F1_ONF1</b>	CGATATTGGAAAATTGGAGACCTTCATCAC (S)		Nest I/ II		
<b>F1_NR</b>	CTTTTGCGCCTCCTCCAGCTGGCTCGTGT (AS)		Nest II		
<b>F2_O2F</b>	GATGGAAAGCAACCGAAGAAGGGAAT (S)	MSP1F2	Nest I	50°C	25
<b>F2_O2R</b>	AGCTTGTACTTTCCATAGTGGTCCAG(AS)		Nest I/ II		
<b>F2_N2F</b>	AAAATCGAGAGCATGATCGCCACTGAGAAG (S)		Nest II		
<b>MS_3F</b>	CAAGCCTACCAAGAATTGATCCCCAA (S)	MSP1F3	-	58°C	40
<b>MS_3R</b>	ATTACTTTGTCGTAGTCCTCGGCGTAGTCC (AS)				
<b>RgONF1<sup>+</sup></b>	ACTTCCACTATGATTTGTTGAGG (S)	RgMSP1	Nest I	40°C	25
<b>RgOR1<sup>+</sup></b>	CTCCTTCAGCACTTTCACG (AS)		Nest I/ II		
<b>RgNR1<sup>+</sup></b>	CGTGTA AAAATATGCCGTTGTA (AS)		Nest II		

\*S = Sense; AS = Anti-sense. <sup>+</sup> Iniciadores construído neste estudo, todos os demais foram propostos por Imwong et al. (2005).

Como descrito, o gene *msp1* foi classificado em blocos conservados e variáveis conforme homologia com outras espécies de *Plasmodium* (ver item 1.4.2). Baseando-se no alinhamento múltiplo entre diversos clones de *P. vivax* podem ser observadas três grandes regiões polimórficas, denominada F1 a F3. Os iniciadores propostos por Imwong et al (2005) baseiam-se na amplificação destas regiões, portanto o nome dos sistemas. Os iniciadores propostos por este estudo (RgMSP1) amplifica a região F1 (figura 6).

Figura 6. Posição dos iniciadores ao longo do gene *msp1*



RgMSP1 E MSP1F1

MSP1F2

MSP1F3

As sequências em destaque (fundo amarelo com letra em vermelho) representam os iniciadores. As sequências em destaque (fundo preto, com letras em branco) representam os iniciadores do sistema MSP1F1. As sequências em vermelho representam a região amplificada.

Para confecção dos iniciadores foram utilizadas sequências genômicas depositadas no Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). Foram utilizados os seguintes termos de busca: *msp1 + Plasmodium vivax*. Foi dada preferência a sequências que continham toda o gene *msp1*, designadas pelos termos “complete cds”. Também foram utilizadas sequências

depositadas no Genebank a partir de estudos realizados no Brasil. Para isso foram utilizados os seguintes termos de busca: *msp1 + Plasmodium vivax + brazil* (tabela 4).

**Tabela 4.** Sequências utilizadas para confecção dos iniciadores.

GI*	Data	Sequência codante	País	Fragmento
AF435619.1	dez/02	Complete cds	Bangladesh	480
KC700014.1	jun/13	partial cds	Turquia	488
KC692074.1	mai/13	Complete cds	Turquia	488
AF435594.1	dez/02	Complete cds	Brasil	488
AB564583.1	dez/10	Complete cds	Turquia	488
M60807.1	mar/95	Complete cds	Brasil	488
AF435631.1	dez/02	Complete cds	Brasil	488
AF435627.1	dez/02	Complete cds	Brasil	488
AF435630.1	dez/02	Complete cds	Brasil	500
HQ171940.1	abr/12	Complete cds	Coréia do Sul	503
GQ912337.1	abr/10	Complete cds	Tailândia	503
AF435617.1	dez/02	Complete cds	Bangladesh	510
AB564587.1	dez/10	Complete cds	Turquia	515
AF435629.1	dez/02	Complete cds	Brasil	515
AF435593.1	dez/02	Complete cds	Brasil	530
AF435615.1	dez/02	Complete cds	Tailândia	540
AF435637.1	dez/02	Complete cds	Coréia do Sul	545
AF435636.1	dez/02	Complete cds	Coréia do Sul	545
AF435635.1	dez/02	Complete cds	Coréia do Sul	545

\*GeneBank Identification, código de acesso à sequência na base de dados *nucleotide*, no NCBI

Todas as sequências foram armazenadas no formato *fasta*. Estas foram então comparadas entre si, a partir do alinhamento múltiplo realizado pelo software on-line ClustalW Ômega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), utilizando os parâmetros para alinhamento de DNA, Clustal w/ number, e mantendo as demais configurações de acordo com o padrão do *software*.

Para minimizar dificuldades na padronização da técnica de PCR, os oligonucleotídeos desenhados foram testados ainda segundo a provável temperatura de pareamento (TM) entre o iniciador e a fita de DNA alvo, foi utilizado o *software* Tm Calculator (<https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/tm-calculator>) utilizando os parâmetros: “Product Group = Taq DNA Polymerase”; “Product = Taq DNA Polymerase with Standart Taq Buffer”; “Primer Conc. (nM) = 250”. Foram considerados

apenas iniciadores em que a diferença de TM entre as sequências sense e antisense fosse igual ou inferior à 2°C.

Para verificar se os oligonucleotídeos apresentavam pareamento inespecífico a outras regiões de *P. vivax*, ou se alinhavam a *P. falciparum*, DNA humano ou qualquer outra sequência genômica que não a de *P. vivax*, foi feita a análise comparativa através do software BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Foi utilizado o algoritmo blastn “*Somewhat similar sequences*” (para nucleotídeos). As análises foram realizadas utilizando como alvo somente organismos *P. vivax* (taxid:5855), *P. falciparum* (taxid:5833), *Homo sapiens* (taxid:9606), e sem especificar o organismo.

A validação final dos iniciadores, bem como o tamanho esperado de fragmentos gerados na PCR foi realizada através do programa on-line Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), mantendo os parâmetros padrões do *software*.

#### 4.8. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi padronizada no termociclador Veriti® 96-Well *Fast Thermal Cycler* da *Applied Biosystems*® (Foster City, CA, EUA). Foi utilizado um volume final de 20 µL contendo 0,125 mM de dNTP (Invitrogen/Life Technologies™, Foster City, CA, EUA), 0,4U/µL da enzima Recombinante Taq DNA Polimerase da Kappa Biosystem (Boston, MA, EUA), tampão 1x contendo 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, fornecido pelo fabricante da enzima, e 0,25 µM de cada iniciador sintetizados pela IDT Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, EUA). Foram utilizados entre 10 e 50 ng de gDNA.

Foram testadas várias TM para cada sistema através de gradiente térmico (VeriFlex™ Step) disponibilizado pelo termociclador. Foi estabelecido etapas com ciclos específicos para cada reação (tabela 3). Em todas as reações foram utilizados controles negativos para a presença de *Plasmodium* (gDNA humano) e positivos para a de presença de *P. falciparum* (Cepa 3D7), bem como controle negativo da PCR, contendo apenas água e demais reagentes da reação.

### **4.8.1. Condições utilizadas na PCR**

O sistema CSP foi padronizado em duas reações independentes (*Nested* PCR). Os sistemas MSP1F2 e RgMSP1 foram padronizadas em duas reações, sendo que na segunda reação é utilizado um iniciador da primeira (*semi-nested* PCR).

A primeira reação é iniciada por uma desnaturação da dupla fita do DNA por 94°C a 5 minutos, seguido pela temperatura de pareamento de 94°C (a) durante 1 minuto, seguido pela temperatura de pareamento (TM) (b), específico para cada sistema (Tabela 3), no período de 1,5 minutos, seguido pela temperatura de extensão enzimática de 72°C (c) durante 1,5 minutos. Os passos (a), (b) e (c) são repetidos por 25 ciclos. A primeira reação é finalizada por uma extensão de 72°C por 5 minutos e então permanece a 4°C. A segunda reação utilizou as mesmas condições utilizadas na primeira, no entanto, os ciclos (a), (b) e (c) foram repetidos por 30 ciclos.

O sistema MSP1F3 foi padronizado em uma única reação de PCR. Inicialmente o DNA foi desnaturado por 94°C durante 5 minutos, seguido por 3 etapas: a) desnaturação da dupla fita de DNA a 94°C por 1,5 minutos; b) temperatura de pareamento de 58°C durante 1,5 minutos; e então submetido a c) temperatura de extensão de 72°C durante 1,5 minutos. As etapas a), b) e c) foram repetidas por 40 ciclos. A reação foi finalizada com a temperatura de extensão durante 5 minutos e permanecido a 4°C até a retirada das amostras do equipamento.

### **4.8.2. Eletroforese em gel de Agarose dos produtos de PCR**

Os resultados das PCRs foram visualizados em géis de agarose a 2% (M/v) diluído em tampão TAE, com a aplicação de produto de PCR diluído em 1/8 (1 µL de produto de PCR; 3,5 µL de tampão de corrida (LB)+GelRed®; 4,5 µL de água destilada), para facilitar a leitura dos resultados. A eletroforese foi realizada em cubas horizontais com tampão TAE 1X. Os géis foram visualizados e fotodocumentados sob transiluminador UV LPIX EX.

### 4.9. SENSIBILIDADE DOS ENSAIOS

A sensibilidade de cada ensaio foi avaliada utilizando-se amostra de um paciente com *P. vivax* com parasitemia inicial de 1.802 parasitos/mm<sup>3</sup>, (estimada pelo método relativo à contagem de leucócito por campo, utilizando a leucometria do paciente, avaliada por meio do hemograma). A amostra foi diluídas de modo seriada em eritrócitos não infectados (compatíveis com a amostra) em escala de 10X até a obtenção de  $1,8 \cdot 10^{-5}$  parasitos/ $\mu$ L. Os ensaios foram sensíveis à detecção de 36 parasitos/ $\mu$ L, em seguida foram utilizadas em cada ensaio como controle.

### 4.10. PCR/RFLP – POLIMORFISMOS DE COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO

Os produtos de PCR do sistema MSP1F2 foram clivados pelas enzimas de restrição *Alu I* e *Bst NI*, ambas da New England Biolabs (Ipswich, MA, EUA), de acordo com instruções do fabricante, a saber: utilizado um volume de 5  $\mu$ L de produto de PCR, 2,5  $\mu$ L do tampão da enzima (na concentração final de 1X), 0,5  $\mu$ L da enzima (na concentração de 5 U/ $\mu$ L), e 17  $\mu$ L de água perfazendo o volume final de 25  $\mu$ L. A enzima *Alu I* foi incubada à 37°C, e a enzima *Bst NI* à 60°C, por um período de 20 minutos. A digestão enzimática pela *Alu I* requer ainda uma etapa de inativação térmica, através da incubação a 80°C durante 20 minutos. 10  $\mu$ L da reação foram imediatamente aplicados em géis de agarose 2%, com GelRed® e visualizadas e fotodocumentadas sob luz UV.

### 4.11. PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA PCR

Os produtos da PCR foram purificados através de kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Madison, WI, EUA) segundo orientações do fabricante. Foram purificados apenas amostras amplificadas sem presença de fragmentos inespecíficos, com uma boa resolução em gel de agarose.

Em geral, foi utilizado um volume de 15-18  $\mu$ L de produto de PCR. Este foi analisado em gel de agarose 2% (M/v), com aplicação de 2  $\mu$ L e visualização em transiluminador UV. Também foi realizada a espectrofotometria, de acordo com as

especificações descritas no item 4.4. Foram considerados satisfatórios os produtos de PCR purificados que apresentaram uma banda nítida no gel de agarose e tenha sido quantificado acima de 20 ng/ $\mu$ L, para adequarem-se aos padrões exigidos pela plataforma de sequenciamento.

#### 4.12. SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DA PCR

O padrão de polimorfismo de cada sistema gerado na PCR foi purificado e enviado para sequenciamento genômico. Esta etapa foi realizada através do método de Sanger por meio de sequenciador automatizado 3130xl da Applied Biosystems, utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit também da Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA), pela empresa Genomic Engenharia Molecular (São Paulo, SP, BRA) (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

#### 4.13. ANÁLISE DOS DADOS

Todos os dados obtidos foram tabulados no software Microsoft Excel® 2010, onde foram desenvolvidos gráficos e tabelas. As análises estatísticas foram realizadas em três programas conforme a necessidade, descritos a seguir.

No GraphPad Prism 5.0 foram realizadas as análises de associação entre a parasitemia e a forma infectante através do teste exato de Fisher.

No *software* Genepop 4.2 disponível na web (<http://kimura.univ-montp2.fr/~rousset/Genepop.htm>) foram realizados os testes exatos de diferenciação gênica e genotípica. O teste de diferenciação gênica refere-se à distribuição de alelos em várias populações, onde a hipótese nula ( $H_0$ ) assumida é a de que os alelos são extraídos em uma mesma distribuição em todas as populações. O teste é realizado ou através da razão de verossimilhança de G (G log likelihood ratio) (RAYMOND; ROUSSET, 1995).

As demais análises estatísticas foram realizadas no software GenAlEx 6.501 onde foram calculadas as frequências alélicas, o número de alelos efetivos, a diversidade genética, medida pela heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e através de sua correção. Também foi utilizado o índice de Shannon (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

A diversidade genética foi calculada através da equação:

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

Equação 1

onde  $p_i$  representa a frequência do alelo  $i^{\text{th}}$ .

A diversidade genética corrigida foi calculada através da equação:

$${}^uH_E = \frac{2n}{2n-1} \left( 1 - \sum p_i^2 \right)$$

Equação 2

onde  $n$  representa o tamanho amostral.

O índice de informação de Shannon foi obtido pela aplicação da fórmula:

$$I = \sum p_i \ln p_i$$

Equação 3

onde  $\ln$  representa o logaritmo natural

## 5. RESULTADO

### 5.1. AMOSTRAS

Durante o período de 2011 e 2013 foram coletadas 780 amostras. Somente aquelas com hemoscopia positiva para a presença de *P. vivax* (224 amostras) foram selecionadas para este estudo (Tabela 5)

**Tabela 5. Amostras coletadas, distribuídas por projeto**

Amostras	Gen <sup>1</sup>	PVR <sup>2</sup>	PQ <sup>3</sup>	SD <sup>4</sup>	Total
Total	15	40	77	648	780
<i>P. vivax</i>	15	40	64	105	224

1. Este estudo; 2. Avaliação do impacto do tratamento de portadores de *Plasmodium vivax* na manutenção da endemia em pacientes atendidos nas unidades de saúde de Porto Velho – Rondônia. 3. Estudo da sensibilidade do limiar de identificação de *Plasmodium sp.* da região de Porto Velho – Rondônia. 4. Avaliação do desempenho de um teste de diagnóstico rápido para a malária em unidade de atendimento à doença na cidade de Porto Velho

O gênero masculino perfaz a maior parte das amostras coletadas (~70%), seja na área urbana ou rural. A maior parte das amostras apresentou uma carga parasitária superior a uma cruz (tabela 6).

**Tabela 6. Perfil epidemiológico das amostras selecionadas para estudo**

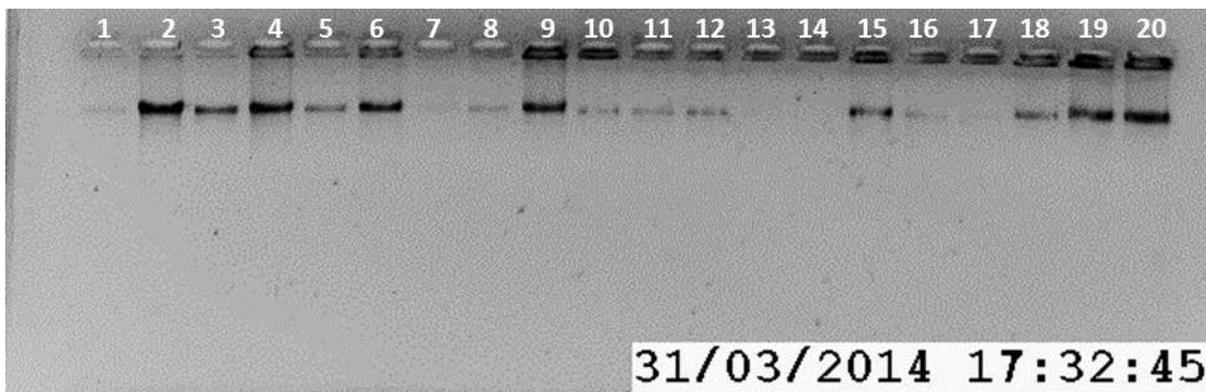
Amostras	Rural (%)	Urbano	Ign***	Total	
<b>Sexo</b>	Mas	110 (70,5)	46 (76,7)	3 (37,5)	159 (71)
	Fem	46 (29,5)	14 (23,3)	5 (62,5)	65 (29)
<b>Parasitemia</b>	≤ 1/2+*	41 (26,3)	16 (26,7)	2 (25)	59 (26,3)
	>+**	109 (69,9)	41 (68,3)	3 (37,5)	153 (68,3)
	Ign***	6 (3,8)	3 (5)	3 (37,5)	12 (5,4)
<b>Total (%)</b>	<b>156 (69,6)</b>	<b>60 (26,8)</b>	<b>8</b>	<b>224</b>	

\*igual ou abaixo de meia cruz; \*\* Igual ou acima de uma cruz; \*\*\* Dado não coletado

O material genético foi extraído das 224 amostras, e contudo, devido a diferenças na parasitemia, condições de armazenamento da amostra, bem como o tempo de armazenamento a quantidade de gDNA obtido não foi idêntico. Não foram utilizadas amostras que no gel de agarose apresentassem pouca quantidade de material ou que apresentassem características de degradação, ou apresentassem um perfil de espectrofotometria indicativo de altos níveis de contaminação por proteínas, sais, álcoois, hemoglobina (fragmentos celulares ou dos

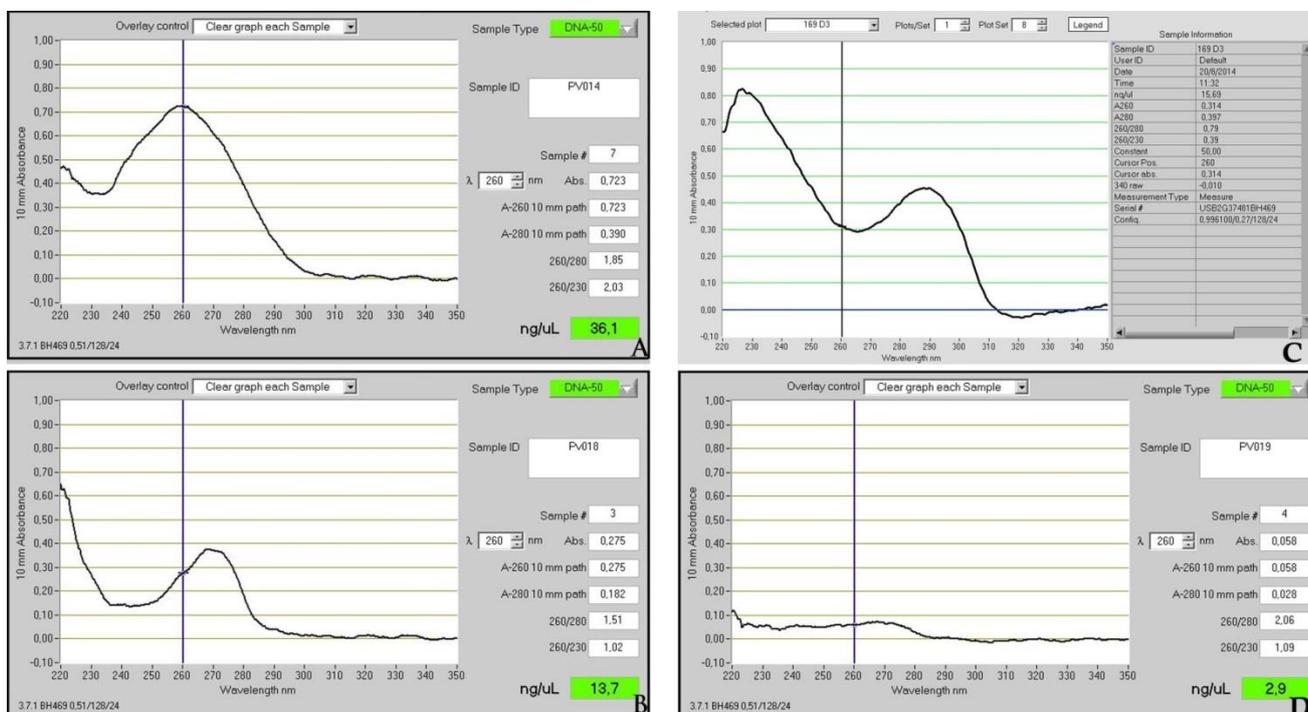
reagentes de extração) que pudessem comprometer as análises das amostras em PCR (figuras 7 e 8).

**Figura 7.** Validação da qualidade de amostras de gDNA extraídas



As amostras aplicadas nos poços 2, 3, 5, 6 foram consideradas boas; amostras presentes nos poços 4, 9, 19 e 20 apresentam um padrão aceitável, no entanto, com a presença de DNA degradado, identificado pelos *smears*; amostras contidas nos poços 8, 10, 11, 12 e 16 são utilizadas na PCR, porém em maior volume, devido à baixa quantidade de material genômico; amostras 1, 7, 13, 14 e 17 foram consideradas inadequadas para uso em PCR.

**Figura 8.** Espectrofotogramas de 4 amostras de DNA



A amostra PV14 (A) apresenta um bom padrão de qualidade (260/280) e uma quantidade razoável de material genético (ng/μL); ao passo que a amostras Pv018 (B) apresenta pouca quantidade de material genético com a presença de contaminantes (absorbância elevada entre 270-280nm), mesma interpretação à amostra 169D3 (C), porém com um espectro indicativo de contaminação ainda mais acentuado em 280nm; por fim a amostra PV19 (D) apresenta pouco material genômico.

## 5.2. GENOTIPAGEM

Não foi possível padronizar a amplificação de fragmentos pelos iniciadores MSP1F1. Portanto, foram desenhados novos oligonucleotídeos em forma de semi-nested PCR, denominados RgMSP1 (tabela 3, figura 6).

Embora todos os sistemas apresentassem níveis de detecções semelhantes (ver item 4.9) o conjunto de amostras amplificadas em cada um dos sistemas não foi o mesmo, e assim, o n amostral não é constante. Todas as 224 amostras foram testadas em cada um dos sistemas. Cabe salientar também, que os parasitos foram identificados por meio do padrão visual formado no gel de agarose. Por exemplo, uma amostra que apresentou dois padrões de banda no gel de agarose, aquela amostra foi identificada com tendo dois parasitos. Esse padrão ocorre devido a infecções policlonais (tabela 7)

**Tabela 7.** Total de amostras e parasitos identificados em cada sistema

Amostras	RgMSP1	MSP1F2		MSP1F3	CSP
		<i>Alu I</i>	<i>BstNI</i>		
<b>Amplificadas (%)<sup>c</sup></b>	149 (66,5)	126 (56,3)	145 (64,7)	152 (67,9)	100 (44,6)
<b>IMC<sup>a</sup> (%)<sup>d</sup></b>	99 (66,4)	126 (100)	135 (93,1)	140 (92,1)	57 (57)
<b>IPC<sup>b</sup> (%)<sup>d</sup></b>	50 (33,6)	-	10 (6,9)	12 (7,9)	43 (43)
<b>Total de Parasitos</b>	<b>201<sup>e</sup></b>	<b>126</b>	<b>155</b>	<b>164</b>	<b>143</b>

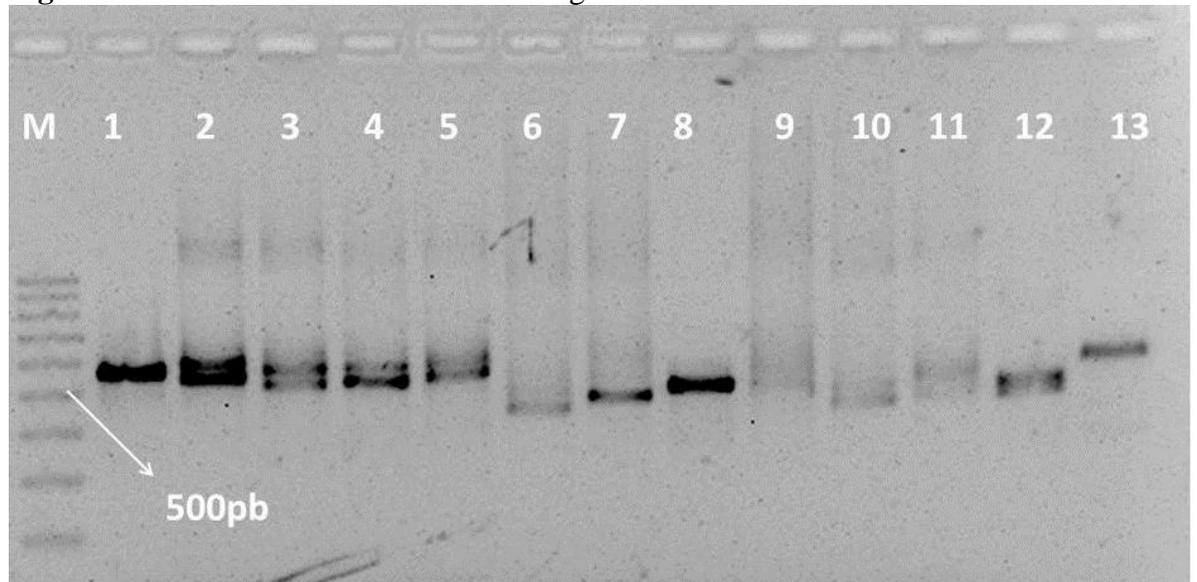
<sup>a</sup>. Infecções Monoclonais; <sup>b</sup>. Infecções policlonais; <sup>c</sup>. porcentagem em relação ao total de amostras (224); <sup>d</sup>. Porcentagem relacionada ao total de amostras amplificadas por sistema; <sup>e</sup>. 2 amostras apresentaram infecções policlonais com 3 parasitos visualizado. Assim, 201 parasitos correspondem à 99 provenientes de infecções monoclonais, 96 provenientes de infecções policlonais (com a presença de 2 parasitos, 48 ao total) e finalmente 6 provenientes de infecções policlonais com a identificação de 3 parasitos (2 amostras ao total)

### 5.2.1. Sistema RgMSP1

Foram observados 6 fragmentos gerados na PCR, semelhantes àqueles esperados nas análises de bioinformática (Tabela 4), nomeados respectivamente de A, B, C, D, E e F (Figura 9). Foram analisadas 149 amostras, tendo detectado um total de 201 parasitos. Todos os alelos foram amplamente frequentes, acima de 10%, sendo as formas C e D as mais prevalentes. Tal fato não é observado quando os dados são analisados segundo o possível local de infecção, de modo que os alelos E e F foram menos frequentes entre possíveis infecções urbanas, e na rural, a forma B foi a menos frequente. As infecções no sexo masculino, em todas as formas alélicas, ficaram acima de 61%, quando comparado com as mulheres. Considerando a amostragem, em que há um maior percentual, não somente de infecções oriundas de regiões rurais, como também no gênero masculino (Tabela 6), os resultados aqui expressos devem ser

vistos com cautela. Os alelos A e E tiveram maior prevalência em infecções com parasitemias acima de uma cruz (Tabela 8 e Tabela 9).

**Figura 9.** Perfil eletroforético do sistema RgMSP1



M = Marcador de peso molecular (100pb). Pode-se observar alguns perfis polimórficos correspondentes aos padrões A, B, C, D, E e F nos poços 6, 7, 8, 4, 5, 13, respectivamente. É possível observar algumas infecções policlonais (nos poços 3 e 4, por exemplo).

**Tabela 8.** Perfil epidemiológico molecular da RgMSP1

RgMSP1	Sexo		Possível local de infecção			Parasitemia em cruzes						Total*
	M	F	Urbana*	Rural*	Ign* <sup>1</sup>	<1/2+	1/2+	+	++	+++	Ign <sup>1</sup>	
A	25	10	10 (0,213)	23 (0,154)	2 (0,400)	3	0	10	18	2	2	35 (0,174)
B	13	8	11 (0,234)	8 (0,054)	2 (0,400)	4	1	3	10	2	1	21 (0,104)
C	30	15	9 (0,191)	36 (0,242)	0	8	4	10	18	1	4	45 (0,224)
D	37	13	13 (0,277)	37 (0,248)	0	12	6	16	9	5	2	50 (0,249)
E	17	6	1 (0,021)	22 (0,148)	0	4	0	8	10	1	0	23 (0,114)
F	22	5	3 (0,064)	23 (0,154)	1 (0,200)	10	1	9	4	2	1	27 (0,134)
<b>Total</b>	<b>144</b>	<b>57</b>	<b>47</b>	<b>149</b>	<b>5</b>	<b>41</b>	<b>12</b>	<b>56</b>	<b>69</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>201</b>

\* O valor dentro do parêntese refere-se à frequência do padrão polimórfico. <sup>1</sup>Ign = dado não coletado (ignorado)

**Tabela 9.** Relação entre formas polimórficas do sistema RgMSP1 com a parasitemia

Comparações*	<1/2 <sup>A</sup>	>+ <sup>B</sup>	p <sup>C</sup>	OR <sup>D</sup>	IC 95% <sup>E</sup>
A	3 50	30 108	0,0093	0,2160	0.06291 to 0.7416
B	5 48	15 123	1	0,8542	0.2942 to 2.480
C	12 41	29 109	0,8449	1,100	0.5131 to 2.359
D	18 35	30 108	0,0947	1,851	0.9213 to 3.720
E	4 49	19 119	0,3228	0,5113	0.1654 to 1.581
F	11 42	15 123	0,0979	2,148	0.9148 to 5.042

\* As análises foram realizadas comparando-se o somatório de cada alelo, contra o somatório de todos os demais alelos; <sup>A</sup> Infecções classificadas como meia cruz ou inferior (formas); <sup>B</sup> infecções tachadas como superiores a uma cruz; <sup>C</sup> valor de p, obtido pelo teste exato de Fisher; <sup>D</sup> Razões das Chances (do inglês *Odds Ratio*); <sup>E</sup> Intervalo de confiança 95%.

O sistema RgMSP1 apresentou uma grande variabilidade genética, tanto o índice informativo de Shannon como a heterozigosidade ( $He = 0,816$ , em média), visto que o sistema apresentou mais alelos igualmente frequentes em todas as amostras analisadas (Tabela 10). A distribuição dos padrões polimórficos entre a amostra urbana e rural apresentou diferenças consideráveis (teste G:  $p = 0.00139$ ,  $SE = 0,00018$ ).

**Tabela 10.** Diversidade gênica no marcador RgMSP1

RgMSP1	n*	NA <sup>a</sup>	Ne <sup>b</sup>	I <sup>c</sup>	He <sup>d</sup>	uh <sup>e</sup>
Total	201	6	5,424	1,739	0,816	0,820
Urb <sup>f</sup>	47	6	4,593	1,599	0,782	0,799
Rural	149	6	5,198	1,705	0,808	0,813
Ign <sup>g</sup>	5	3	2,778	1,055	0,640	0,800

\*n, tamanho amostral; NA<sup>a</sup> Número de alelos identificados; Ne<sup>b</sup> Número efetivo de alelos; I<sup>c</sup> Índice de informação de Shannon; He<sup>d</sup> Diversidade gênica; uh<sup>e</sup> diversidade genética corrigida; <sup>f</sup>Urbano; <sup>g</sup>Local desconhecido (Ignorado)

Em 50 amostras (34%) foram detectadas infecções policlonais, a maior parte dos casos (48 registros) com a presença de duas formas apenas, e, em dois pacientes, infecções por 3 cepas distintas (C+E+F e D+E+F). A maioria destas infecções ocorreu na região rural, e em infecções diagnosticadas com parasitemias superiores a uma cruz. No entanto, não houve

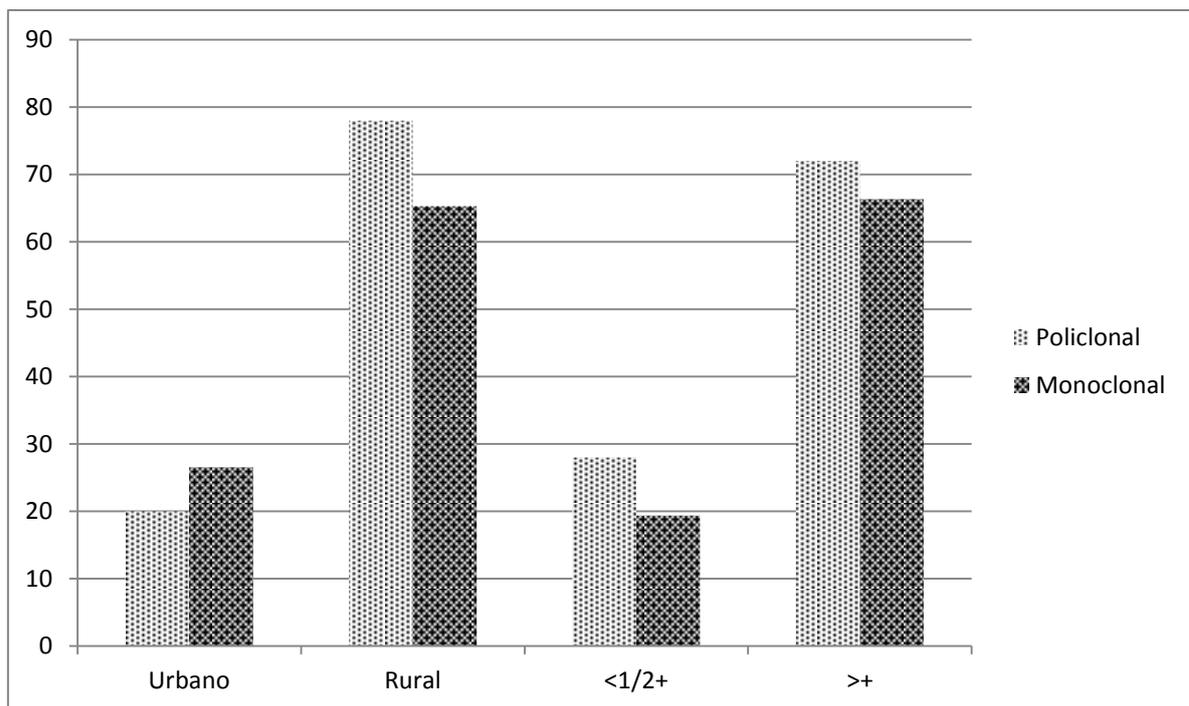
uma relação estatisticamente significativa, quando comparadas infecções mono com as policlonais (Tabela 11 e Figura 10).

**Tabela 11.** Relação de infecções policlonais com local de infecção e grau parasitário, em RgMSP1

<b>RgMSP1</b>	<b>N(%)</b>	<b>Urbano(%)</b>	<b>Rural(%)</b>	<b>&lt;1/2+(%)</b>	<b>&gt;+(%)</b>
A+	17 (34)	5 (50)	11 (28,2)	3 (21,4)	14 (38,9)
B+	5 (10)	1 (10)	4 (10,3)	2 (14,3)	3 (8,3)
C+	6 (12)	2 (20)	4 (10,3)	0	6 (16,7)
D+	16 (32)	2 (20)	14 (35,9)	6 (42,9)	10 (27,8)
E+	6 (12)	0	6 (15,4)	3 (21,4)	3 (8,3)
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>10 (20)</b>	<b>39 (78)</b>	<b>14 (28)</b>	<b>36 (72)</b>

A+: Associação entre formas A+B, A+C, A+D, A+E, B+: união das formas B+C, B+D;  
C+: C+D, C+E; C+E+F; D+: D+E+F, D+F; E+: E+F

**Figura 10.** Relação entre infecções mono e policlonais ao local de infecção e carga parasitária estimada, no sistema RgMSP1



Todas as infecções policlonais foram agrupadas

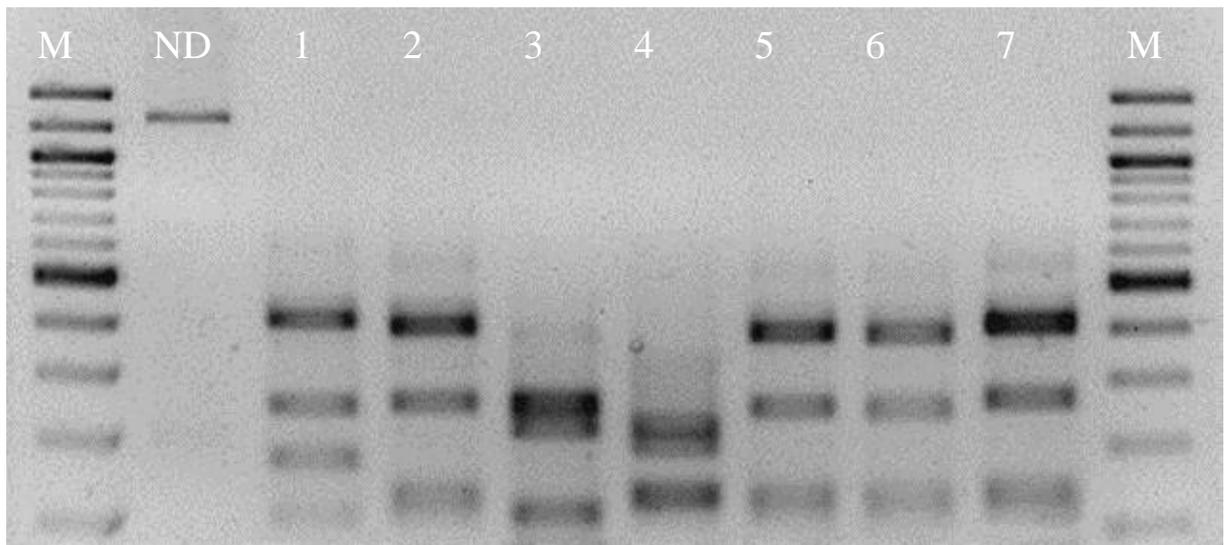
### 5.2.2. Sistema MSP1F2

Devido ao grande tamanho do fragmento gerado na PCR (>1Kb), a diferenciação do tamanhos deste foi dificultada, de tal forma que, ao contrário do proposto por Imwong et al.

(2005) que classificou os polimorfismos com base na PCR, neste trabalho preferiu-se classifica-los unicamente com base nos padrões obtidos pela clivagem enzimática na RFLP, pela *Alu I* e *Bst NI*.

O padrão de restrição obtido pela enzima *Alu I* apresentou difícil interpretação, devido ao grande número de sítios de restrição pela enzima no fragmento de DNA (Figura 11). Foram identificados 7 padrões distintos em 126 amostras, nomeados de 1 a 7, respectivamente. Não foi detectada nenhuma infecção múltipla. Os padrões 1, 4 e 5 foram os mais frequentes na amostra, correspondente a 81% de toda a amostra. Assim como nos outros sistemas, os pacientes masculinos corresponderam por mais de 60% das infecções, bem como os registros em áreas rurais, também acima de 60% (Tabela 12), e como explicado anteriormente, a amostra apresenta uma composição majoritária de homens.

**Figura 11.** Padrão de restrição do sistema MSP1F2 pela enzima *Alu I*



M Marcador de peso molecular (100 pb) ND, não digerido; poços 1-7 amostras “digeridas” pela enzima de restrição.

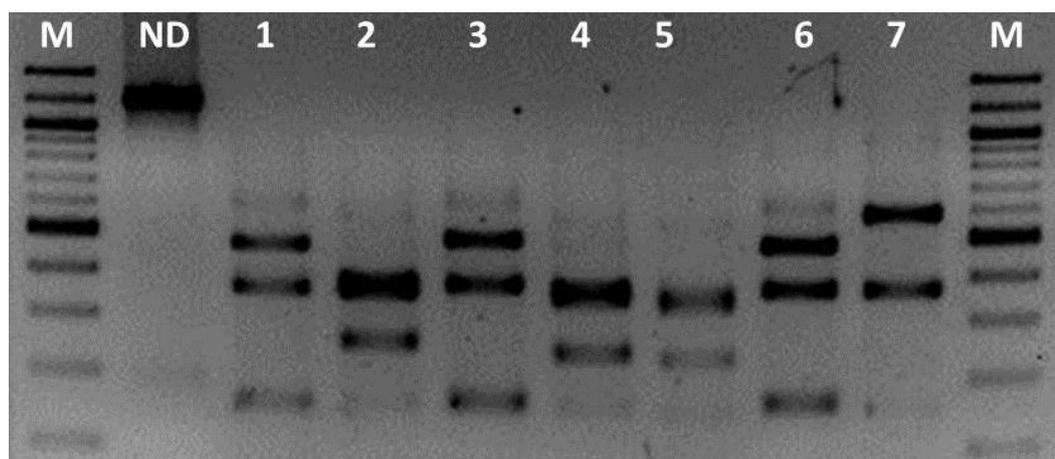
Tabela 12. Perfil epidemiológico molecular da MSP1F2/*Alu I*

MSP1F2 <i>ALU I</i>	Sexo		Possível local de infecção			Parasitemia em cruces						Total*
	M	F	Urbana*	Rural*	Ign <sup>1</sup> *	<1/2+	1/2+	+	++	+++	Ign <sup>1</sup>	
1	18	10	7 (0,200)	21 (0,236)	0	7	1	7	10	2	1	28 (0,222)
2	3	1	0	4 (0,045)	0	0	0	4	0	0	0	4 (0,032)
3	6	2	3 (0,086)	5 (0,056)	0	1	0	2	5	0	0	8 (0,063)
4	17	10	10 (0,286)	16 (0,180)	1 (0,500)	5	2	4	12	1	3	27 (0,214)
5	34	13	12 (0,343)	35 (0,393)	0	8	3	13	17	3	3	47 (0,373)
6	3	1	1 (0,029)	3 (0,034)	0	0	0	2	1	0	1	4 (0,032)
7	6	2	2 (0,057)	5 (0,056)	1 (0,500)	4	2	1	1	0	0	8 (0,063)
<b>Total</b>	87	39	35	89	2	25	8	33	46	6	8	126

\* O valor dentro do parêntese refere-se à frequência do padrão polimórfico. <sup>1</sup>Ign = dado não coletado (ignorado)

Utilizando a enzima *Bst NI* foi possível identificar 5 padrões de restrições diferentes (Figura 12), nomeados 1 a 5, respectivamente, em 145 amostras, detectando um total de 155 parasitos. O perfil da amostra assemelha-se aos demais marcadores utilizados (acima de 60% do sexo masculino, indicando a zona rural, como possível local de infecção). Todos os alelos foram igualmente frequentes, exceto o padrão 4. A forma 2 foi o mais prevalente. O mesmo padrão foi obtido entre as áreas urbanas e rurais. Em mais de 60%, as infecções apresentavam parasitemias superiores a uma cruz, não sendo observada nenhuma relação estatisticamente significativa entre a parasitemia e o alelo analisado (Tabela 13).

Figura 12. Padrão de restrição do sistema MSP1F2 pela enzima *Bst NI*



M Marcador de peso molecular (100 pb) ND, não digerido; poços 1-7 amostras “digeridas” pela enzima de restrição.

**Tabela 13.** Perfil epidemiológico molecular da MSP1F2/*Bst NI*

MSP1F2 <i>Bst NI</i>	Sexo		Possível local de infecção			Parasitemia em cruces						Total*
	M	F	Urbana*	Rural*	Ign <sup>1</sup>	<1/2+	1/2+	+	++	+++	Ign <sup>1</sup>	
1	23	13	11 (0,268)	24 (0,218)	1 (0,250)	10	1	9	12	1	3	36 (0,232)
2	51	19	17 (0,415)	53 (0,482)	0	13	5	20	23	5	4	70 (0,452)
3	12	4	3 (0,073)	11 (0,100)	2 (0,500)	1	1	6	7	1	0	16 (0,103)
4	2	4	2 (0,049)	3 (0,027)	1 (0,250)	1	1	1	3	0	0	6 (0,039)
5	22	5	8 (0,195)	19 (0,173)	0	3	4	3	11	5	1	27 (0,174)
<b>Total</b>	<b>110</b>	<b>45</b>	<b>41</b>	<b>110</b>	<b>4</b>	<b>28</b>	<b>12</b>	<b>39</b>	<b>56</b>	<b>12</b>	<b>8</b>	<b>155</b>

\* O valor dentro do parêntese refere-se à frequência do padrão polimórfico. <sup>1</sup>Ign = dado não coletado (ignorado)

Os fragmentos obtidos pela clivagem enzimática *Alu I* apresentaram uma diversidade genética semelhante aos obtidos em outros sistemas (MSP1F3 e RgMSP1)  $He = 0,755$ . No entanto, o mesmo resultado não foi encontrado na PCR/RFLP pela enzima *Bst NI* ( $He = 0,700$ , Tabela 14).

Não foram observadas diferenças significativas entre amostras provenientes de áreas urbanas e rurais, no sistema MSP1F2 clivado pela *Alu I* ( $\rho = -0,0184$ ; Teste G:  $p = 0,70077$ ,  $SE = 0,00262$ ) ou quando clivado pela enzima *Bst NI* ( $\rho = -0,0167$ ; Teste G:  $p = 0,86301$ ,  $SE = 0,00154$ ).

**Tabela 14.** Diversidade gênica no marcador MSP1F2

Localidade	Locus	n*	NA <sup>a</sup>	Ne <sup>b</sup>	I <sup>c</sup>	He <sup>d</sup>	uh <sup>e</sup>
Total	AluI MSP	126	7	4,090	1,601	0,755	0,762
	BsaNI MS	155	5	3,329	1,363	0,700	0,704
Urbano	AluI MSP	35	6	3,990	1,523	0,749	0,771
	BsaNI MS	41	5	3,452	1,376	0,710	0,728
Rural	AluI MSP	89	7	3,966	1,593	0,748	0,756
	BsaNI MS	110	5	3,122	1,316	0,680	0,686
Ignorado	AluI MSP	2	2	2,000	0,693	0,500	1,000
	BsaNI MS	4	3	2,667	1,040	0,625	0,833

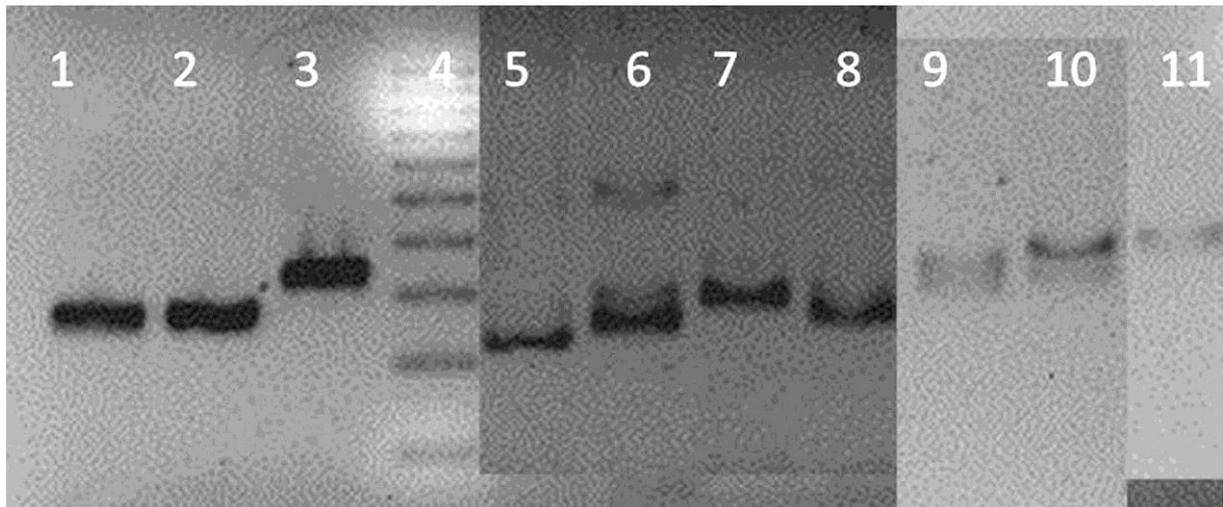
\*n, tamanho amostral; NA<sup>a</sup> Número de alelos identificados; Ne<sup>b</sup> Número efetivo de alelos; I<sup>c</sup> Índice de informação de Shannon; He<sup>d</sup> Diversidade gênica; uh<sup>e</sup> diversidade genética corrigida.

### 5.2.3. Sistema MSP1F3

Foram identificados 5 padrões de fragmentos gerados na PCR pelos iniciadores MS\_3F e MS\_3R, nomeados A, B, C, D e E, respectivamente, em 152 amostras analisadas

(68% do total, Tabela 7), sendo identificados 164 clones. Entre essas amostras, 12 delas apresentaram perfis policlonais de infecção, sendo A+B (3); A+C (1); A+D (1); B+C (4); C+D (2); C+E(1). Destes, 9 infecções múltiplas teriam ocorrido em área rural. Em 60% dos casos o homem foi o portador de cada uma das formas alélicas identificadas (Figura 13, Tabela 15), e novamente frisando o viés amostral com relação ao gênero.

**Figura 13.** Polimorfismos genéticos observados em MSP1F3



Nos poços 1, 2 e 3 foram utilizados padrões conhecidos; nos poços 5 a 11 mostram vários padrões: 5 (A); 6 Padrão heterozigoto (B+C); 7 (C); 8 (B); 9 (C+D); 10 (D+E) 11 (E). Edição com a união de vários géis, mantendo a posição do fragmento em relação ao padrão de peso molecular (4 10pb).

As formas polimórficas mais frequentes foram as A, B e C, que em conjunto corresponderam por mais de 81,7% das detecções. O alelo B foi mais prevalente na população rural, enquanto na população urbana foi mais frequente o C. Não foi encontrada nenhuma relação estatística entre a parasitemia (infecções classificadas com parasitemia em formas ou meia cruz contra infecções superiores a uma cruz) e o padrão alélico ou associando infecções múltiplas contra as monoinfecções (dados não mostrados). O sistema MSP1F3 apresentou uma alta diversidade genética ( $He = 0,75$ , Tabela 16). A diferença entre amostras provenientes de áreas urbanas e rurais foi baixa, pelo teste exato de diferenciação gênica G ( $p = 0.16363$ ;  $SE = 0,00310$ )

**Tabela 15.** Perfil epidemiológico dos padrões polimórficos da MSP1F3 nas amostras

Padrão	Sexo		Possível local de infecção			Parasitemia em cruces						Policlonal	Total*
	M	F	Urbana*	Rural*	Ign* <sup>1</sup>	<1/2+	1/2+	+	++	+++	Ign <sup>1</sup>		
A	25	16	8 (0,178)	30 (0,261)	3 (0,750)	10	1	12	13	2	3	5	41 (0,250)
B	33	15	12 (0,267)	36 (0,313)	0	7	3	15	17	3	3	7	48 (0,293)
C	30	15	17 (0,378)	27 (0,235)	1 (0,250)	6	5	12	15	6	1	5	45 (0,274)
D	19	6	8 (0,178)	17 (0,148)	0	4	2	3	13	2	1	3	25 (0,152)
E	3	2	0	5 (0,043)	0	0	1	2	1	0	1	1	5 (0,030)
<b>Total</b>	<b>110</b>	<b>54</b>	<b>45</b>	<b>115</b>	<b>4</b>	<b>27</b>	<b>12</b>	<b>44</b>	<b>59</b>	<b>13</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>164</b>

\* O valor dentro do parêntese refere-se à frequência do padrão polimórfico. <sup>1</sup>Ign = dado não coletado (ignorado)

**Tabela 16.** Diversidade gênica no marcador MSP1F3

MSP1F3	n*	NA <sup>a</sup>	Ne <sup>b</sup>	I <sup>c</sup>	He <sup>d</sup>	uh <sup>e</sup>
Total	164	5	4,038	1,454	0,752	0,757
Urb <sup>f</sup>	45	4	3,610	1,334	0,723	0,739
Rural	115	5	4,083	1,473	0,755	0,762
Ign <sup>g</sup>	4	2	1,600	0,562	0,375	0,500

\*n, tamanho amostral; NA<sup>a</sup> Número de alelos identificados; Ne<sup>b</sup> Número efetivo de alelos; I<sup>c</sup> Índice de informação de Shannon; He<sup>d</sup> Diversidade gênica; uh<sup>e</sup> diversidade genética corrigida; <sup>f</sup>Urbano; Local desconhecido (Ignorado)

#### 5.2.4. Sistema CSP

Os iniciadores da CSP produziram 8 fragmentos, nomeados A à H, respectivamente. Das 224 amostras analisadas, foram obtidos resultados de 100 destas, sendo possível identificar 143 clones. Os padrões polimórficos não estão presentes na mesma frequência, de tal forma que os padrões C, D, E, G e H foram os mais frequentes (89,4%). Como nos outros sistemas, a maior parte das amostras provém da área rural (64,1%). Os alelos mais frequentes apresentaram frequências similares nas áreas rurais e urbanas. Os homens também corresponderam pela maior parte dos portadores (~70%). Aproximadamente 27% da amostra analisada apresentavam carga parasitária igual ou inferior a meia cruz, e 69% superior (Tabela 17), reiterando o caráter enviesado das amostras.

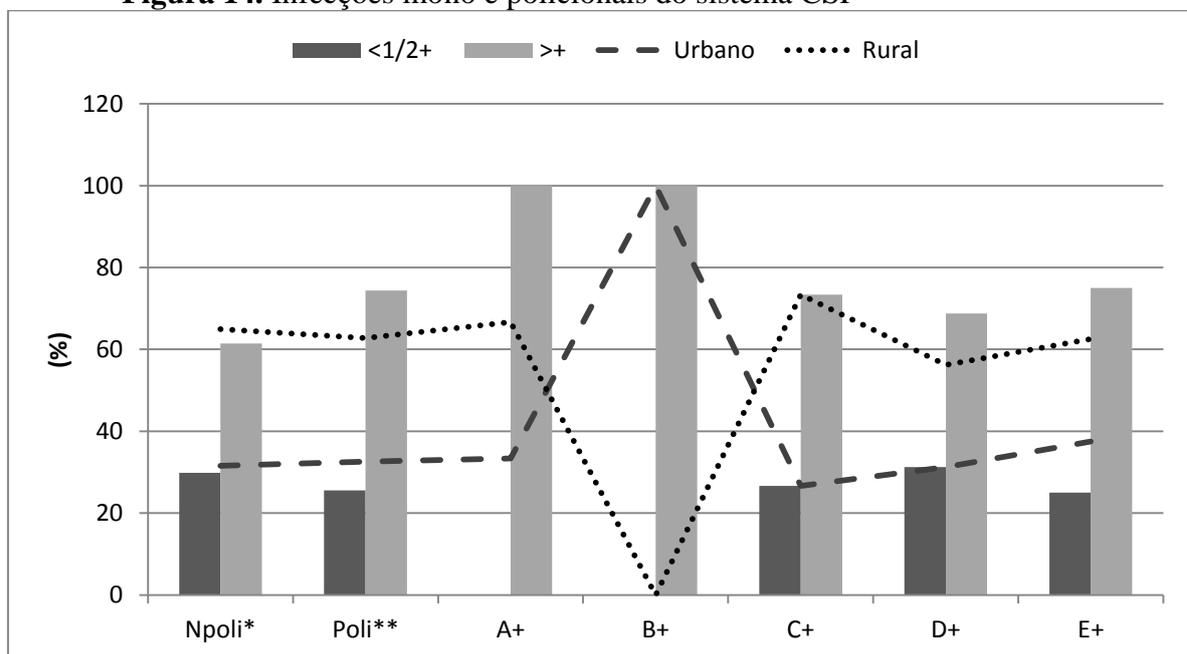
Tabela 17. Perfil epidemiológico molecular do sistema CSP

Padrão	Sexo		Possível local de infecção			Parasitemia em cruzes						Total*
	M	F	Urbana*	Rural*	Ign <sup>1</sup>	<1/2+	1/2+	+	++	+++	Ign <sup>1</sup>	
A	4	1	3 (0,065)	2 (0,022)	0	1	0	1	2	1	0	5 (0,028)
B	1	0	1 (0,022)	0	0	0	0	0	1	0	0	1 (0,007)
C	13	7	5 (0,109)	14 (0,154)	1 (0,167)	4	2	5	6	3	0	20 (0,141)
D	19	9	9 (0,196)	17 (0,187)	2 (0,333)	9	2	10	5	2	0	28 (0,197)
E	15	4	7 (0,152)	11 (0,121)	1 (0,167)	3	2	4	9	0	1	19 (0,134)
F	6	4	4 (0,087)	6 (0,066)	0	0	1	2	6	1	0	10 (0,070)
G	19	11	10 (0,217)	20 (0,220)	0	9	0	7	10	3	1	30 (0,211)
H	22	8	7 (0,152)	21 (0,231)	2 (0,333)	4	2	13	6	2	3	30 (0,211)
<b>Total</b>	<b>99</b>	<b>44</b>	<b>46</b>	<b>91</b>	<b>6</b>	<b>30</b>	<b>9</b>	<b>42</b>	<b>45</b>	<b>12</b>	<b>5</b>	<b>143</b>

\* O valor dentro do parêntese refere-se à frequência do padrão polimórfico. <sup>1</sup>Ign = dado não coletado (ignorado)

Em relação aos outros sistemas analisados, este apresentou um maior índice de policlonalidade (43%), não sendo observadas diferenças entre amostras provenientes de áreas rurais e urbanas, bem como diferenças quanto a carga parasitária, menor que meia cruz e maior que uma cruz (Figura 14).

Figura 14. Infecções mono e policlonais do sistema CSP



Npoli: Não Policlonal; Poli: Policlonal; A+: infecções policlonais entre as formas A+D; B+: infecções policlonais entre as formas B+G; C+: infecções entre as formas C+F, C+G e C+H; D+: infecções entre os padrões D+G e D+H; E+: infecções entre as formas E+F, E+G e E+H. <1/2+ infecções com carga parasitária igual ou inferior a meia cruz; >+: infecções com parasitemia igual ou acima de uma +

A diversidade genética observada no sistema CSP foi maior do que aquelas obtidas para outros sistemas (He = 0,828; I = 1,845) (Tabela 18).

**Tabela 18.** Diversidade gênica no marcador CSP

<b>CSP</b>	<b>n*</b>	<b>NA<sup>a</sup></b>	<b>Ne<sup>b</sup></b>	<b>I<sup>c</sup></b>	<b>He<sup>d</sup></b>	<b>uh<sup>e</sup></b>
<b>Total</b>	142	8	5,824	1,845	0,828	0,834
<b>Urbano</b>	46	8	6,412	1,939	0,844	0,863
<b>Rural</b>	91	7	5,569	1,791	0,820	0,830
<b>Ignorado</b>	6	4	3,600	1,330	0,722	0,867

\*n, tamanho amostral; NA<sup>a</sup> Número de alelos identificados; Ne<sup>b</sup> Número efetivo de alelos; I<sup>c</sup> Índice de informação de Shannon; He<sup>d</sup> Diversidade gênica; uh<sup>e</sup> diversidade genética corrigida.

### 5.3. Sequenciamento

Foi possível sequenciar amostras amplificadas pelos sistemas RgMSP1 e MSP1F3 (Apêndices I e II). Em todas as situações verificou-se uma grande quantidade de polimorfismos do tipo SNP (polimorfismos de troca de base única). Também foi verificado, no caso do sistema MSP1F3, vários *gaps* (polimorfismos de inserções e deleções de nucleotídeos), evidenciando a grande diversidade de fragmentos distintos. Em ambas as condições, SNP ou *gaps* não são observados no gel de agarose, este último, devido a diferença de tamanho dos fragmentos distintos serem menores do que a sensibilidade de detecção da eletroforese em agarose.

## 6. DISCUSSÃO

A malária tem apresentado uma queda na incidência global de aproximadamente 25% entre 2000 e 2012. Essa substancial redução foi associada a intervenções vetoriais em larga escala (uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas), aumento na cobertura de diagnósticos com implementação de testes rápidos bem como, o tratamento de terapias combinadas com artemisina (ACTs) (WHO, 2013). No entanto, vários outros fatores podem influenciar nestes resultados, como por exemplo, a ecologia e o comportamento humano como também vetorial, a imunidade do hospedeiro, bem como as alterações climáticas (REITER, 2008). No Brasil, de maneira semelhante, também foi registrada reduções da incidência da malária, a exceção do surto de 2005 (Figura 2), após políticas de intervenção governamentais, PIACM e o PNCM (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010), e que também não podem ser vistas como as únicas razões para o controle da doença, tendo em vista, que outras abordagens de controle, bem como alterações ambientais locais, também são passíveis de influenciar a incidência da doença (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; VIEIRA et al., 2014a). Mesmos após as adoções das estratégias de controle, a incidência da malária no Brasil continua alta, com maior prevalência de *P. vivax*, que correspondem por mais de 95% dos casos registrados em Rondônia e Porto Velho, e acima de 80% no Brasil, em 2014 (Tabela 1) (BRASIL, 2014).

Analisando os dados epidemiológicos de Porto Velho, pode-se observar que, baseado no provável local de infecção relatado pelos pacientes, 84% dos registros ocorreram em áreas rurais, e cerca de 16% em áreas urbanas, e, por conseguinte, estas regiões tornam-se importantes para a manutenção daquelas incidências elevadas. Apesar das nossas amostras não serem representativas, estas apresentaram proporções semelhantes aos dados registrados no SIVEP/MALÁRIA, de modo que aproximadamente 70% das amostras apontaram áreas rurais como provável local de infecção, e aproximadamente 27% como sendo a área urbana o provável local de infecção (Tabela 6).

Estes indicadores (infecções em áreas urbanas e rurais) tornam-se interessantes quando se avalia o comportamento dos moradores. Há um intenso fluxo de cidadãos que adentram áreas rurais para agricultura, pesca ou turismo (58%) (VIEIRA et al., 2014b). Considerando a estratégia de transmissão de *P. vivax*, que gera gametócitos maduros e

infectivos, quase que simultaneamente ao aparecimento de fases assexuadas e antes que o limiar de uma infecção clínica no sangue seja atingido (SHORTT; GARNHAM, 1948; MENDIS et al., 2001), muitos daqueles que adentraram a área rural retornam à cidade, infectados. Estes, com efeito, podem ser fonte de transmissão urbana, desde que na presença de vetores. Observações nos postos de coleta e na literatura, mostram que o tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico são superiores a 4 dias, em média (CERUTTI et al., 2007), e, portanto, mais do que suficiente para a transmissão de gametócitos maduros.

Não obstante, deve-se considerar que o possível local de infecção é meramente especulativo, uma vez que o período de incubação do *P. vivax* é muito variável. As formas hepáticas são detectadas após 7 dias da infecção e o desenvolvimento das formas eritrocíticas, de 12 dias a vários meses, sendo assim impreciso determinar o local exato do acometimento da doença (MENDIS et al., 2001; WHITE, 2011)

Ainda assim, é esperado que maior parte das infecções tenha ocorrido em áreas rurais, já que o *An. darlingi* é o principal vetor da malária no Brasil (regiões neotropicais), e geralmente, apresenta hábitos rurais, ribeirinhos e em áreas florestais densas (SINKA et al., 2010; BARBOSA et al., 2014). Contudo, a transmissão urbana não pode ser descartada, uma vez que foi demonstrado que em locais de desmatamento, com crescimento secundário e presença antrópica há registros do vetor, demonstrando que este parece ser atraído por ambientes de assentamento humano (BROCHERO et al., 2005). Deste modo, regiões periféricas da cidade de Porto Velho, que apresentam características semelhantes àsquelas (fronteira à vegetação e com a presença de igarapés, coleções de água), tenha realmente transmissão urbana. Esse processo é semelhantemente ao mecanismo de transmissão denominado como malária de fronteira, demonstrando que a expansão humana em direção à floresta (DE CASTRO et al., 2006; VITTOR et al., 2009; HAHN et al., 2014), bem como o assentamento, próximo às rodovias tende a aumentar a transmissão do agravo (HAHN et al., 2014).

Isto é um problema crucial, pois o controle da doença em determinada área, e o não controle em regiões (ou países) vizinhas, origina a importação da doença, de modo que haja a sua reemergência, ou manutenção de sua incidência (COHEN et al., 2010). Portanto, as estratégias para controle e possível erradicação da malária devem conter, além do controle vetorial, bloquear o fluxo de malária de áreas de maior incidência e reduzir a transmissão na origem (MOONEN et al., 2010)

Nesse sentido, a compreensão da dinâmica da transmissão da malária em Porto Velho, no espaço rural-urbano, são pontos chaves no controle da doença. A falta do entendimento da estrutura populacional, bem como a dinâmica de transmissão da malária decorrente de *P. vivax* (ARNOTT; BARRY; REEDER, 2012) geram lacunas nos programas de controle da doença. De tal modo que a Agenda de Pesquisa para Erradicação da Malária (malERA) afirma que nenhuma campanha de erradicação ou controle pode proceder sem aqueles conhecimentos (THE MALERA CONSULTATIVE GROUP ON BASIC SCIENCE AND ENABLING TECHNOLOGIES, 2011). Outro problema, que também deve ser citado, já que foi demonstrado em nossa região, é a presença de portadores assintomáticos que geram uma transmissão residual (KATSURAGAWA et al., 2013) dificultando o total controle e erradicação da doença.

Assim, os resultados obtidos por este trabalho foram úteis, pois permitiram a identificação de várias cepas distintas de algumas regiões (rurais e urbanas), determinando assim a diversidade parasitária e a detecção de infecções policlonais, sendo, portanto, uma análise inicial da dinâmica de transmissão em uma amostra de Porto Velho. Contudo, deve-se ressaltar que nossos resultados foram gerados pela PCR, e que alguns problemas são inerentes à essa técnica. Muitos fatores afetam sua eficiência, entre eles a qualidade dos iniciadores que devem ser específicos para uma única região e que não formem dímeros, entre outros fatores ligados à qualidade do material genético, concentrações de sais, temperaturas de pareamento e qualidade da enzima (BESSERIS, 2014).

Tal interferência foi imputada na dificuldade da padronização e reprodutibilidade em nossos testes com o sistema MSP1F1 (Tabela 3). Após análises dos iniciadores pode-se deduzir que o tamanho excessivamente grande de alguns oligonucleotídeos (30 bases), e a formação de estruturas em grampos (*hairpin*) ( $\Delta G = -2,16^\circ\text{C Kcal/mol}$ ) podem ter dificultado a reação (Figura 15). Assim, as análises dos oligos por meio de softwares, Primer3, Prise2, IDT OligoAnalyzer 3.1, BlastPrimer, por exemplo, foram necessárias para desenhar e analisar a estrutura e a eficácia dos iniciadores (OWCZARZY et al., 2008; HUANG et al., 2014)



portadores de malária vivax adquiridas em áreas rurais, ao retornarem às regiões urbanas, inicie um ciclo de transmissão urbana, seria esperada, portanto, uma distribuição de padrões polimórficos semelhantes nas duas regiões. Nossos resultados indicam, contudo, que a diversidade encontrada em áreas rurais e urbanas não foram exatamente similares, provavelmente devido à heterogeneidade geográfica, e não representativa, das amostras coletadas. Conquanto, não foi possível diferenciar as amostras de ambas as localidades, exceto pelo marcador RgMSP1 (MSP1F3;  $\rho = -0,0057$ , teste exato de diferenciação gênica “G”  $p = 0.16363$ ; RgMSP1  $\rho=0,1052$ ; teste G:  $p = 0.00139$ ; MSP1F2 AluI  $\rho=-0,0184$ ; Teste G:  $p = 0,70077$ ; MSP1F2 *Bst NI* ( $\rho=-0,0167$ ; Teste G:  $p = 0,86301$ , CSP,  $\rho= -0.01275$ , Teste G:  $p = 0.81999$ ).

A proporção de infecções policlonais (~38%) pode estar diretamente relacionada à diversidade. A maior parte destas infecções ocorreu em regiões rurais, onde a diversidade gênica foi maior, quando comparada com a diversidade de infecções de regiões urbanas, exceto para o marcador CSP (He urbana: MSP1F3 = 0,739; RgMSP1 = 0,799; MSP1F2 AluI = 0,771; MSP1F2 *Bst NI* = 0,728; CSP = 0,863. He rural: MSP1F3 = 0,762; RgMSP1 = 0,813; MSP1F2 AluI = 0,756; MSP1F2 *BstNI* = 0,686; CSP = 0,830). Este resultado é corroborado pelos achados de Ferreira et al., (2007) que demonstrou que infecções oriundas de regiões rurais, no interior do Acre, tendem a ter maior diversidade genética.

Nossos resultados de infecções policlonais foram semelhantes aos encontrados por outros autores, levando-se em conta o cuidado com diferentes técnicas e tamanhos amostrais. Bruce et al., (1999) encontrou uma taxa de 23% em amostras coletadas da Índia, Sudão e Siri Lanka. Kolakovich et al., (1996) em Papua Nova Guiné obteve a porcentagem de 65% de infecções múltiplas, e 35,6% em estudo reportado na Tailândia por Cui et al., (2003b).

No entanto, foi relatado que em materiais genômicos complexos, isto é, com a presença de várias formas da mesma região genômica pode ocorrer distorções e perda da sensibilidade de detecção de algumas formas (LUCITO et al., 1998; MAKRIGIORGOS et al., 2002), e aliado ao fato de que a amplificação da amostra não ocorra de maneira linear, de modo que a reprodutibilidade pode ser afetada por impurezas da amostra (HEID et al., 1996). Deste modo, a técnica de Real Time PCR demonstrou-se ser mais eficiente na detecção de infecções mistas, experimentalmente, devido a sua sensibilidade (CHEESMAN et al., 2003). A análise do sequenciamento de algumas amostras de nosso estudo (em apêndice) e a partir de sequências disponibilizadas no Genebank (Tabela 4) foi observada amostras com mesmo

tamanho, e portanto, identificadas visualmente como sendo uma única cepa, mas com a presença de vários polimorfismos de base única (SNPs). Assim, a frequência de infecções policlonais pode ser muito subestimada.

Ressalta-se que, embora não encontradas diferenças estatisticamente significantes entre infecções poli e monoclonais com a carga parasitária, estudos tem relacionado à virulência das infecções com a competição entre os clones coinfectantes da malária em modelos animais utilizando *P. chabaudi* (DE ROODE et al., 2005). Os mesmos resultados não têm sido encontrados em humanos (estudos realizados com *P. falciparum*), de tal forma que estudos pós-mortem demonstram a presença monoclonal de parasito, demonstrando a fatalidade associado às cepas mais virulentas (MONTGOMERY et al., 2006).

Neste aspecto outros estudos, utilizando marcadores mais polimórficos, e técnicas de detecção mais sensíveis, associando cepas às alterações clínicas e falhas terapêuticas são necessários, pois casos graves de morbidade e mortalidade associados à malária podem estar relacionados à um tipo específico de cepa circulante. Questão não compreendida, mas que tem afetado grande parte da população Amazônica (BONILLA et al., 2006).

### 7. CONCLUSÃO

- Os oligonucleotídeos produzidos neste estudo para amplificar o bloco 1 da MSP1 (RgMSP1) demonstrou-se eficiente;
- O sistema RgMSP1 detectou 201 parasitos distintos, com 33% de infecções policlonais;
- O sistema MSP1F2, quando digerido pela enzima *AluI* detectou 126 parasitos, sem a detecção de infecções policlonais; ao passo que a digestão do produto de PCR pela enzima de restrição *BstNI*, detectou a 155, com a detecção de 6,9% de infecções policlonais;
- O sistema MSP1F3 identificou 164 parasitos, detectando 12 casos de infecções policlonais;
- O sistema CPS detectou 143 parasitos distintos, sendo detectados 43% de infecções policlonais;
- Nossa amostra não é representativa, não obstante, semelhantemente aos dados do SIVEP, a maior prevalência de amostras provenientes das áreas rurais (70,5%);
- As amostras provenientes de áreas urbanas e rurais apresentaram diversidades genéticas distintas, sem, contudo, apresentarem diferenças estatisticamente significantes;
- Não foi verificada associação entre densidade parasitária e infecções policlonais;
- A análise do sequenciamento demonstrou baixa detecção de infecções policlonais com polimorfismos do tipo SNP ou com inserções e/ou deleções de poucas bases;

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, H. K.; JAIN, D.; KAVERAPPA, V.; JAIN, P.; KUMAR, A.; YADAV, S. Multiple splenic infarcts in acute *Plasmodium vivax* malaria: a rare case report. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 6, n. 5, p. 416–8, 13 maio 2013.
- ANDRADE, R. DE P.; HOCHMAN, G. O Plano de Saneamento da Amazônia (1940-1942). **Historia, Ciência, Saúde - Manguinhos**, v. 14, n. Suplemento, p. 257–277, 2007.
- ANSTEY, N. M.; HANDOJO, T.; PAIN, M. C. F.; KENANGALEM, E.; TJITRA, E.; PRICE, R. N.; MAGUIRE, G. P. Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation. **The Journal of infectious diseases**, v. 195, n. 4, p. 589–96, 15 fev. 2007.
- ARNOT, D. E.; BARNWELL, J. W.; TAM, J. P.; NUSSENZWEIG, V.; NUSSENZWEIG, R. S.; ENEA, V. Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*: gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. **Science (New York, N.Y.)**, v. 230, n. 4727, p. 815–8, 15 nov. 1985.
- ARNOTT, A.; BARRY, A. E.; REEDER, J. C. Understanding the population genetics of *Plasmodium vivax* is essential for malaria control and elimination. **Malaria journal**, v. 11, p. 14, jan. 2012.
- AURRECOECHEA, C.; BRESTELLI, J.; BRUNK, B. P.; DOMMER, J.; FISCHER, S.; GAJRIA, B.; GAO, X.; GINGLE, A.; GRANT, G.; HARB, O. S.; HEIGES, M.; INNAMORATO, F.; IODICE, J.; KISSINGER, J. C.; KRAEMER, E.; LI, W.; MILLER, J. A.; NAYAK, V.; et al. PlasmoDB: A functional genomic database for malaria parasites. **Nucleic Acids Research**, v. 37, 2009.
- BARBOSA, L. M. C.; SOUTO, R. N. P.; FERREIRA, R. M. DOS A.; SCARPASSA, V. M. Composition, abundance and aspects of temporal variation in the distribution of *Anopheles* species in an area of Eastern Amazonia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 313–20, 2014.
- BESSERIS, G. J. A Fast-and-Robust Profiler for Improving Polymerase Chain Reaction Diagnostics. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e108973, jan. 2014.
- BHATTACHARJEE, P.; DUBEY, S.; GUPTA, V. K.; AGARWAL, P.; MAHATO, M. P. The clinicopathologic manifestations of *Plasmodium vivax* malaria in children: a growing menace. **Journal of clinical and diagnostic research : JCDR**, v. 7, n. 5, p. 861–7, maio 2013.
- BONILLA, J. A.; VALIDUM, L.; CUMMINGS, R.; PALMER, C. J. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* Pvcsp and PvmSP1 in Guyana, South America. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 75, n. 5, p. 830–5, nov. 2006.
- BOTELHO, C.; BARBOSA, L. S. G.; SILVA, M. D.; MEIRELLES, S. M. P. Fluxo migratório de casos de malária em c u i a b á / MT , 1986. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 30, n. 3, p. 212–220, 1988.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Portaria 355 de 2001 FNS. Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal. . 2000, p. 97–105.
- BRASIL. FUNASA. **Relatório das Principais Atividades e Resultados - 1999 a 2002**. 1 ed ed.Brasília: [s.n.].
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária**. 2 ed ed.Brasília: Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009.
- BRASIL. IBGE. **Censo demográfico de 2010**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/default.shtm>>. Acessado em: 7 out. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância Epidemiológica. SIVEP/MALÁRIA**. Disponível em: <[http://portalweb04.saude.gov.br/sivep\\_malaria/default.asp](http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/default.asp)>. Acessado em: 1 maio. 2014.
- BRITO, J. DA S. **Análise da descentralização das ações de controle da malária no Estado de Rondônia: Dois estudos de caso**. [s.l.] Fundação Oswaldo Cruz, 2003.
- BROCHERO, H. L.; REY, G.; BUITRAGO, L. S.; OLANO, V. A. Biting activity and breeding sites of Anopheles species in the municipality Villavicencio, Meta, Colombia. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 21, n. 2, p. 182–6, jun. 2005.
- BRUCE, M. C.; GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W.; SNOUNOU, G.; DAY, K. P. Polymorphism at the merozoite surface protein-3 $\alpha$  locus of Plasmodium vivax: global and local diversity. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 61, n. 4, p. 518–25, out. 1999.
- CALDERARO, A.; PICCOLO, G.; GORRINI, C.; ROSSI, S.; MONTECCHINI, S.; DELL'ANNA, M. L.; DE CONTO, F.; MEDICI, M. C.; CHEZZI, C.; ARCANGELETTI, M. C. Accurate identification of the six human Plasmodium spp. causing imported malaria, including Plasmodium ovale wallikeri and Plasmodium knowlesi. **Malaria journal**, v. 12, n. 1, p. 321, jan. 2013.
- CAMARGO, E. P. Malária, Maleita, Paludismo. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 26–29, 2003.
- CDC, C. FOR D. C. AND P. **Laveran and the Discovery of the Malaria Parasite**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/malaria/about/history/laveran.html>>. Acessado em: 14 jul. 2014a.
- CDC, C. FOR D. C. AND P. **Ross and the Discovery that Mosquitoes Transmit Malaria Parasites**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/malaria/about/history/ross.html>>. Acessado em: 14 jul. 2014b.
- CERUTTI, C.; BOULOS, M.; COUTINHO, A. F.; HATAB, M. D. C. L. D.; FALQUETO, A.; REZENDE, H. R.; DUARTE, A. M. R. C.; COLLINS, W.; MALAFRONTTE, R. S.

Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. **Malaria journal**, v. 6, p. 33, jan. 2007.

CHALKIAS, A.; ARIDAS, S.; KARAGEORGOPOULOS, D. E.; STRATIOTIS, G.; MYSTRIOTI, D.; MALLIOS, A.; NAKOS, I.; MPELLOS, N.; GANOTOPOULOU, A.; XANTHOS, T. Severe sepsis and septic shock due to Plasmodium vivax infection. **The American journal of emergency medicine**, v. 31, n. 4, p. 761.e1–2, abr. 2013.

CHEESMAN, S. J.; DE ROODE, J. C.; READ, A. F.; CARTER, R. Real-time quantitative PCR for analysis of genetically mixed infections of malaria parasites: technique validation and applications. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 131, n. 2, p. 83–91, out. 2003.

CHENET, S. M.; TAPIA, L. L.; ESCALANTE, A. A.; DURAND, S.; LUCAS, C.; BACON, D. J. Genetic diversity and population structure of genes encoding vaccine candidate antigens of Plasmodium vivax. **Malaria journal**, v. 11, p. 68, jan. 2012.

COHEN, J. M.; MOONEN, B.; SNOW, R. W.; SMITH, D. L. How absolute is zero? An evaluation of historical and current definitions of malaria elimination. **Malaria journal**, v. 9, p. 213, 2010.

COOPER, J. A. Merozoite surface antigen-I of plasmodium. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 9, n. 2, p. 50–4, fev. 1993.

CORNEJO, O. E.; ESCALANTE, A. A. The origin and age of Plasmodium vivax. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 12, p. 558–63, dez. 2006.

CUI, L.; ESCALANTE, A. A.; IMWONG, M.; SNOUNOU, G. The genetic diversity of Plasmodium vivax populations. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 5, p. 220–226, maio 2003a.

CUI, L.; MASCORRO, C. N.; FAN, Q.; RZOMP, K. A.; KHUNTIRAT, B.; ZHOU, G.; CHEN, H.; YAN, G.; SATTABONGKOT, J. Genetic diversity and multiple infections of Plasmodium vivax malaria in Western Thailand. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 68, n. 5, p. 613–9, maio 2003b.

CURTIS, C. F.; LINES, J. D. Impregnated fabrics against malaria mosquitoes. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 1, n. 5, p. 147, nov. 1985.

DA SILVA, A. N. M.; SANTOS, C. C. B.; LACERDA, R. N.; MACHADO, R. L. D.; PÓVOA, M. M. Susceptibility of Anopheles aquasalis and an. darlingi to Plasmodium vivax VK210 and VK247. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 547–50, ago. 2006.

DA SILVA-NUNES, M.; MORENO, M.; CONN, J. E.; GAMBOA, D.; ABELES, S.; VINETZ, J. M.; FERREIRA, M. U. Amazonian malaria: Asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally-driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. **Acta tropica**, v. 121, n. 3, p. 281–291, 2013.

- DE CASTRO, M. C.; MONTE-MÓR, R. L.; SAWYER, D. O.; SINGER, B. H. Malaria risk on the Amazon frontier. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 7, p. 2452–7, 14 fev. 2006.
- DE ROODE, J. C.; PANSINI, R.; CHEESMAN, S. J.; HELINSKI, M. E. H.; HUIJBEN, S.; WARGO, A. R.; BELL, A. S.; CHAN, B. H. K.; WALLIKER, D.; READ, A. F. Virulence and competitive ability in genetically diverse malaria infections. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 21, p. 7624–8, 24 maio 2005.
- DE SOUZA-NEIRAS, W. C.; DE MELO, L. M. S.; MACHADO, R. L. D. The genetic diversity of *Plasmodium vivax*--a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 245–54, jun. 2007.
- DEANE, L. M. MALARIA STUDIES AND CONTROL IN BRAZIL. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 38, n. 2, p. 223–230, 1988.
- DEL PORTILLO, H. A.; GYSIN, J.; MATTEI, D. M.; KHOURI, E.; UDAGAMA, P. V; MENDIS, K. N.; DAVID, P. H. *Plasmodium vivax*: cloning and expression of a major blood-stage surface antigen. **Experimental parasitology**, v. 67, n. 2, p. 346–53, dez. 1988.
- DEL PORTILLO, H. A.; LONGACRE, S.; KHOURI, E.; DAVID, P. H. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. May, p. 4030–4034, 1991.
- FERREIRA, M. U.; KARUNAWEEERA, N. D.; DA SILVA-NUNES, M.; DA SILVA, N. S.; WIRTH, D. F.; HARTL, D. L. Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in rural Amazonia. **The Journal of infectious diseases**, v. 195, n. 8, p. 1218–26, 15 abr. 2007.
- FERREIRA, M. U.; DA SILVA NUNES, M.; WUNDERLICH, G. Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 11, n. 6, p. 987–95, nov. 2004.
- FREITAS, E. B. **Representações da Estrada de Ferro Madeira Mamoré.XXVII Simpósio Nacional de História**. [s.l: s.n.]. .2013.
- GERÊNCIA TÉCNICA DE MALÁRIA; CCDTU; DEOPE/FNS; SIM; CENEPI; MALÁRIASVS/SIVEP, F. **Evolução dos casos de malária em Rondônia de 1960 a 2013. Gentilmente cedido pelo Laboratório de Epidemiologia CEPEN/FIOCRUZ**, 2014.
- GIBSON, H. L.; TUCKER, J. E.; KASLOW, D. C.; KRETTLI, A. U.; COLLINS, W. E.; KIEFER, M. C.; BATHURST, I. C.; BARR, P. J. Structure and expression of the gene for Pv200, a major blood-stage surface antigen of *Plasmodium vivax*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 50, p. 325–333, 1992.
- GREENWOOD, B. M. Control to elimination: implications for malaria research. **Trends in parasitology**, v. 24, n. 10, p. 449–54, out. 2008.

- HAHN, M. B.; GANGNON, R. E.; BARCELLOS, C.; ASNER, G. P.; PATZ, J. A. Influence of deforestation, logging, and fire on malaria in the Brazilian Amazon. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e85725, jan. 2014.
- HAN, E.-T.; WANG, Y.; LIM, C. S.; CHO, J. H.; CHAI, J.-Y. Genetic diversity of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium vivax* field isolates in Republic of Korea. **Parasitology research**, v. 109, n. 6, p. 1571–6, dez. 2011.
- HAVRYLIUK, T.; FERREIRA, M. U. A closer look at multiple-clone *Plasmodium vivax* infections: detection methods, prevalence and consequences. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 67–73, fev. 2009.
- HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome research**, v. 6, p. 986–994, 1996.
- HOLDER, A. A.; FREEMAN, R. R. Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody. **The Journal of experimental medicine**, v. 156, n. November, p. 1528–1538, 1982.
- HUANG, Y.-T.; YANG, J.; CHROBAK, M.; BORNEMAN, J. PRISE2: Software for designing sequence-selective PCR primers and probes. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 1, p. 317, 2014.
- HUSSEIN, K.; MATIN, E.; NERLICH, A. G. Paleopathology of the juvenile Pharaoh Tutankhamun-90th anniversary of discovery. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 463, n. 3, p. 475–9, set. 2013.
- IMWONG, M.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; GRÜNER, A. C.; RÉNIA, L.; LETOURNEUR, F.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N. J.; SNOUNOU, G. Practical PCR genotyping protocols for *Plasmodium vivax* using Pvc and Pvmsp1. **Malaria journal**, v. 4, n. 1, p. 20, jan. 2005.
- JOY, D. A.; GONZALEZ-CERON, L.; CARLTON, J. M.; GUEYE, A.; FAY, M.; MCCUTCHAN, T. F.; SU, X. Local adaptation and vector-mediated population structure in *Plasmodium vivax* malaria. **Molecular biology and evolution**, v. 25, n. 6, p. 1245–52, jun. 2008.
- KAKKILAYA, B. S. **History of Malaria: Scientific Discoveries**. Disponível em: <[http://www.malariasite.com/malaria/history\\_science.htm](http://www.malariasite.com/malaria/history_science.htm)>. Acessado em: 15 jul. 2014.
- KATSURAGAWA, T. H.; GIL, L. H. S.; TADA, M. S.; DA SILVA, L. H. P. Endemic and epidemic diseases in Amazonia Malaria and other emerging diseases in riverine areas of the Madeira River. A school case. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, p. 111–141, 2008.
- KATSURAGAWA, T. H.; GIL, L. H. S.; DE LIMA, A. A.; FREITAG, E. M.; DOS SANTOS, T. M.; DO NASCIMENTO FILHA, M. T.; DOS SANTOS JÚNIOR, A. P. J.; DA SILVA, J. M.; RODRIGUES, A. D. F.; TADA, M. S.; FONTES, C. J. F.; PEREIRA DA SILVA, L. H. Selective intermittent preventive treatment of vivax malaria: reduction of malaria incidence in an open cohort study in Brazilian Amazon. **Malaria research and treatment**, v. 2013, p. 310246, 2013.

- KIM, A.; PARK, Y.-K.; LEE, J.-S.; CHUNG, M.-H.; KIM, E. S. A case of symptomatic splenic infarction in vivax malaria. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 45, n. 1, p. 55, 2007.
- KIMURA, E.; MATTEI, D.; DI SANTI, S. M.; SCHERF, A. Genetic diversity in the major merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*: high prevalence of a third polymorphic form detected in strains derived from malaria patients. **Gene**, v. 91, n. 1, p. 57–62, 2 jul. 1990.
- KIRCHGATTER, K.; DEL PORTILLO, H. A. Molecular analysis of *Plasmodium vivax* relapses using the MSP1 molecule as a genetic marker. **The Journal of infectious diseases**, v. 177, n. 2, p. 511–5, fev. 1998.
- KOLAKOVICH, K. A.; SSENGOBA, A.; WOJCIK, K.; TSUBOI, T.; AL-YAMAN, F.; ALPERS, M.; ADAMS, J. H. *Plasmodium vivax*: favored gene frequencies of the merozoite surface protein-1 and the multiplicity of infection in a malaria endemic region. **Experimental parasitology**, v. 83, n. 1, p. 11–9, jun. 1996.
- KRAFTS, K.; HEMPELMANN, E.; SKÓRSKA-STANIA, A. From methylene blue to chloroquine: a brief review of the development of an antimalarial therapy. **Parasitology research**, v. 111, n. 1, p. 1–6, jul. 2012.
- LIN, C. S.; UBOLDI, A. D.; MARAPANA, D.; CZABOTAR, P. E.; EPP, C.; BUJARD, H.; TAYLOR, N. L.; PERUGINI, M. A.; HODDER, A. N.; COWMAN, A. F. The Merozoite Surface Protein 1 complex is a platform for binding to human erythrocytes by *P. falciparum*. **The Journal of biological chemistry**, p. 0–25, 29 jul. 2014.
- LIVADAS, G. A.; GEORGOPOULOS, G. Development of resistance to DDT by *Anopheles sacharovi* in Greece. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 8, n. 4, p. 497–511, jan. 1953.
- LOIOLA, C. C. P.; SILVA, C. J. M.; TAUIL, L. Controle da malária no Brasil : 1965 a 2001. **Rev Panam Salud Publica**, v. 11, n. 1, p. 235–244, 2002.
- LUCITO, R.; NAKIMURA, M.; WEST, J. A.; HAN, Y.; CHIN, K.; JENSEN, K.; MCCOMBIE, R.; GRAY, J. W.; WIGLER, M. Genetic analysis using genomic representations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. April, p. 4487–4492, 1998.
- MACCORMACK, C. P. Human ecology and behaviour in malaria control in tropical Africa. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 62 Suppl, n. 1984, p. 81–7, jan. 1984.
- MACHADO, R. L. D.; DE FIGUEREIDO FILHO, A. F.; CALVOSA, V. S. P.; FIGUEREDO, M. C.; NASCIMENTO, J. M.; PÓVOA, M. M. Correlation between *Plasmodium vivax* variants in Belém, Pará State, Brazil and symptoms and clearance of parasitaemia. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 7, n. 3, p. 175–7, jun. 2003.
- MACHADO, R. L.; PÓVOA, M. M. Distribution of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in three endemic areas of the Amazon region of Brazil and their

correlation with chloroquine treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 377–381, 2000.

MAKRIGIORGOS, G. M.; CHAKRABARTI, S.; ZHANG, Y.; KAUR, M.; PRICE, B. D. A PCR-based amplification method retaining the quantitative difference between two complex genomes. **Nature biotechnology**, v. 20, n. 9, p. 936–9, set. 2002.

MANN, V. H.; HUANG, T.; CHENG, Q.; SAUL, A. Sequence variation in the circumsporozoite protein gene of *Plasmodium vivax* appears to be regionally biased. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 68, n. 1, p. 45–52, 1994.

MARQUES, A. C. Migrations and the dissemination of malaria in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. Suppl. II. Intern. Symp. on Malaria, p. 17–30, 1986.

MCBRIDE, J. S.; HEIDRICH, H. G. Fragments of the polymorphic Mr 185,000 glycoprotein from the surface of isolated *Plasmodium falciparum* merozoites form an antigenic complex. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 23, n. 1, p. 71–84, fev. 1987.

MCGREADY, R.; WONGSAEN, K.; CHU, C. S.; TUN, N. W.; CHOTIVANICH, K.; WHITE, N. J.; NOSTEN, F. Uncomplicated *Plasmodium vivax* malaria in pregnancy associated with mortality from acute respiratory distress syndrome. **Malaria journal**, v. 13, p. 191, jan. 2014.

MENDIS, K.; SINA, B. J.; MARCHESINI, P.; CARTER, R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 64, n. 1-2 Suppl, p. 97–106, 2001.

MENDIS, K.; RIETVELD, A.; WARSAME, M.; BOSMAN, A.; GREENWOOD, B.; WERNSDORFER, W. H. From malaria control to eradication: The WHO perspective. **Tropical medicine & international health : TM & IH**, v. 14, n. 7, p. 802–9, jul. 2009.

METCALF, R. L. A century of DDT. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 21, n. 4, p. 511–9, 1973.

MONTGOMERY, J.; MILNER, D. A.; TSE, M. T.; NJOBVU, A.; KAYIRA, K.; DZAMALALA, C. P.; TAYLOR, T. E.; ROGERSON, S. J.; CRAIG, A. G.; MOLYNEUX, M. E. Genetic analysis of circulating and sequestered populations of *Plasmodium falciparum* in fatal pediatric malaria. **The Journal of infectious diseases**, v. 194, n. 1, p. 115–22, 1 jul. 2006.

MOONEN, B.; COHEN, J. M.; SNOW, R. W.; SLUTSKER, L.; DRAKELEY, C.; SMITH, D. L.; ABEYASINGHE, R. R.; RODRIGUEZ, M. H.; MAHARAJ, R.; TANNER, M.; TARGETT, G. Operational strategies to achieve and maintain malaria elimination. **Lancet**, v. 376, n. 9752, p. 1592–603, 6 nov. 2010.

NÁJERA, J. A.; GONZÁLEZ-SILVA, M.; ALONSO, P. L. Some lessons for the future from the Global Malaria Eradication Programme (1955-1969). **PLoS medicine**, v. 8, n. 1, p. e1000412, jan. 2011.

- NUSSENZWEIG, V.; NUSSENZWEIG, R. S. Circumsporozoite proteins of malaria parasites. **Bulletin et memoires de l'Academie royale de medecine de Belgique**, v. 144, n. September, p. 493–504, 1985.
- OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V. G.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L. B.; TAUIL, P. L.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria journal**, v. 9, p. 115, jan. 2010.
- OWCZARZY, R.; TATAUROV, A. V; WU, Y.; MANTHEY, J. A; MCQUISTEN, K. A; ALMABRAZI, H. G.; PEDERSEN, K. F.; LIN, Y.; GARRETSON, J.; MCENTAGGART, N. O.; SAILOR, C. A; DAWSON, R. B.; PEEK, A. S. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. **Nucleic acids research**, v. 36, n. Web Server issue, p. W163–9, 1 jul. 2008.
- PAYNE, D. Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 3, n. 8, p. 241–6, ago. 1987.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 28, n. 19, p. 2537–9, 1 out. 2012.
- PINHEIRO, E. A. Fluxos de casos de malaria no Brasil em 1980. **Revista brasileira de malariologia e doencas tropicais**, n. 34, p. 1–31, 1982.
- PINTO, C. Disseminação da malária pela aviação; biologia do *Anopheles gambiae* e outros anofelinos do Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 34, n. 3, p. 1–13, 1939.
- PLASMO DB. **PVX\_119355, Circumsporozoite Protein (CSP)**. Disponível em: <[http://plasmodb.org/plasmo/showRecord.do?name=GeneRecordClasses.GeneRecordClass&source\\_id=PVX\\_119355&project\\_id=PlasmoDB](http://plasmodb.org/plasmo/showRecord.do?name=GeneRecordClasses.GeneRecordClass&source_id=PVX_119355&project_id=PlasmoDB)>. Acessado em: 14 jan. 2015a.
- PLASMO DB. **PVX\_099980. Merozoite Surface Protein 1**. Disponível em: <[http://plasmodb.org/plasmo/showRecord.do?name=GeneRecordClasses.GeneRecordClass&source\\_id=PVX\\_099980&project\\_id=PlasmoDB](http://plasmodb.org/plasmo/showRecord.do?name=GeneRecordClasses.GeneRecordClass&source_id=PVX_099980&project_id=PlasmoDB)>. Acessado em: 19 jul. 2014b.
- PRICE, R. N.; TJITRA, E.; GUERRA, C. A.; YEUNG, S.; WHITE, N. J.; ANSTEY, N. M. Vivax malaria: neglected and not benign. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 61, p. 79–87, 2009.
- PRICE, R. N.; DOUGLAS, N. M.; ANSTEY, N. M. New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. **Current opinion in infectious diseases**, v. 22, n. 5, p. 430–5, out. 2009.
- PUTAPORNTIP, C.; JONGWUTIWES, S.; SAKIHAMA, N.; FERREIRA, M. U.; KHO, W.-G.; KANEKO, A.; KANBARA, H.; HATTORI, T.; TANABE, K. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 25, p. 16348–53, 10 dez. 2002.

QARI, S. H.; SHI, Y. P.; GOLDMAN, I. F.; UDHAYAKUMAR, V.; ALPERS, M. P.; COLLINS, W. E.; LAL, A. A. Identification of Plasmodium vivax-like human malaria parasite. **Lancet**, v. 341, n. 8848, p. 780–783, 1993.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. **J. Hered.**, v. 86, n. 3, p. 248–249, 1 maio 1995.

REID, H.; VALLELY, A.; TALEO, G.; TATEM, A. J.; KELLY, G.; RILEY, I.; HARRIS, I.; HENRI, I.; IAMAHER, S.; CLEMENTS, A. C. A. Baseline spatial distribution of malaria prior to an elimination programme in Vanuatu. **Malaria journal**, v. 9, p. 150, 2010.

REITER, P. Global warming and malaria: knowing the horse before hitching the cart. **Malaria journal**, v. 7 Suppl 1, p. S3, jan. 2008.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–7, dez. 1977.

SCHWEICKARDT, J. C.; LIMA, N. T. Os cientistas brasileiros visitam a Amazônia : as viagens científicas de Oswaldo Cruz e Carlos Chagas. **Historia, Ciência, Saúde - Manguinhos**, v. 14, n. Suplemento, p. 15–50, 2007.

SHORTT, H. E.; GARNHAM, P. C. C. The pre-erythrocytic stage of human malaria, Plasmodium vivax. **British medical journal**, v. 1, n. 4550, p. 547, 20 mar. 1948.

SINKA, M. E.; RUBIO-PALIS, Y.; MANGUIN, S.; PATIL, A. P.; TEMPERLEY, W. H.; GETHING, P. W.; VAN BOECKEL, T.; KABARIA, C. W.; HARBACH, R. E.; HAY, S. I. The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. **Parasites & vectors**, v. 3, p. 72, jan. 2010.

TALISUNA, A. O.; BLOLAND, P.; D’ALESSANDRO, U. History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 1, p. 235–54, jan. 2004.

TANABE, K.; MACKAY, M.; GOMAN, M.; SCAIFE, J. G. Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite Plasmodium falciparum. **Journal of molecular biology**, v. 195, n. 2, p. 273–87, 20 maio 1987.

TANWAR, G. S.; KHATRI, P. C.; SENGAR, G. S.; KOCHAR, A.; KOCHAR, S. K.; MIDDHA, S.; TANWAR, G.; KHATRI, N.; PAKALAPATI, D.; GARG, S.; DAS, A.; KOCHAR, D. K. Clinical profiles of 13 children with Plasmodium vivax cerebral malaria. **Annals of tropical paediatrics**, v. 31, n. 4, p. 351–6, jan. 2011.

TAUIL, P. L.; DEANE, L. M.; SABROZA, P.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Debates - A malária no Brasil. **Cadernos de saúde pública**, v. 1, n. 1, p. 71–111, 1985.

THE MALERA CONSULTATIVE GROUP ON BASIC SCIENCE AND ENABLING TECHNOLOGIES. **A research agenda for malaria eradication: Basic science and enabling technologies** PLoS Medicine, jan. 2011. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3026698&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acessado em: 9 jan. 2015.

TOCANTIS, Leandro. Formação Histórica do Acre, 2 volumes. Rio de Janeiro: **Civilização Brasileira**, 1979. In FREITAS, E. B. .Representações da Estrada de Ferro Madeira Mamoré. **XXVII Simpósio Nacional de História**. [s.l: s.n.]. .2013

VIEIRA, G.; BASANO, S.; KATSURAGAWA, T. H.; CAMARGO, L. M. A. Insecticide-treated bed nets in Rondônia, Brazil: evaluation of their impact on malaria control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 6, p. 493–497, 2014a.

VIEIRA, G.; GIM, K. N. M.; ZAQUEO, G. M.; ALVES, T. DA C.; KATSURAGAWA, T. H.; BASANO, S.; CAMARGO, L. M. A.; SOUZA, C. M. Reduction of incidence and relapse or recrudescence cases of malaria in the western region of the Brazilian Amazon. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 9, p. 1181–1187, 2014b.

VITAL, A. V. Visões do Alto Madeira : Comissão Rondon , malária e política em Santo Antônio do Madeira ( 1910-1915 )\*. **Revista Brasileira de Historia da Ciência**, v. 5, n. 1, p. 77–90, 2012.

VITTOR, A. Y.; PAN, W.; GILMAN, R. H.; TIELSCH, J.; GLASS, G.; SHIELDS, T.; SÁNCHEZ-LOZANO, W.; PINEDO, V. V; SALAS-COBOS, E.; FLORES, S.; PATZ, J. A. Linking deforestation to malaria in the Amazon: characterization of the breeding habitat of the principal malaria vector, *Anopheles darlingi*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 81, n. 1, p. 5–12, jul. 2009.

WHITE, N. J. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. **Malaria journal**, v. 10, n. 1, p. 297, jan. 2011.

WHO. **World Health Organization. Chemotherapy of Malaria. Report of a Technical Meeting. Technical Report Series No. 226**. Geneva, Switzerland: [s.n.]. .1960. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_226.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_226.pdf)>. Acessado em: 3 dez. 2014.

WHO. **World Health Organization. Re-examination of the Global Strategy of Malaria Eradication. 22 World Health Assembly**. Manila: [s.n.]. .1969. Disponível em: <[http://iris.wpro.who.int/bitstream/10665.1/9036/1/WPR\\_RC020\\_04\\_EB-WHA\\_1969\\_eng.pdf](http://iris.wpro.who.int/bitstream/10665.1/9036/1/WPR_RC020_04_EB-WHA_1969_eng.pdf)>. Acessado em: 29 out. 2014.

WHO. **World Health Organization. Ministerial Conference on Malaria. Report of The Ministerial Conference on Malaria**. Amsterdam: [s.n.]. .1992. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/58661/1/CTD\\_MCM\\_92.6.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/58661/1/CTD_MCM_92.6.pdf?ua=1)>. Acessado em: 19 nov. 2014.

WHO. **World Health Organization. A global strategy for malaria control**. Geneva, Switzerland: [s.n.]. .1993. Disponível em: <<http://whqlibdoc.who.int/publications/9241561610.pdf>>. Acessado em: 17 nov. 2014.

WHO, W. H. O. **World Malaria Report**. Geneva, Switzerland: [s.n.]. .2008. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241563697\\_eng.pdf?ua=1](http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241563697_eng.pdf?ua=1)>. Acessado em:

WHO, W. H. O. . **World Malaria Report 2013**. *Nature*. [s.l: s.n.]. .2013. Disponível em: <[http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2013/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/en/)>. Acessado em:

WHO, W. H. O. . **World Malaria Report**. Geneva, Switzerland: [s.n.]. .2014. Disponível em: <[http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2014/report/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/report/en/)>. Acessado em: 30 jan. 2015.

WILLIAMS, L. L. Malaria eradication in the United States. **American journal of public health and the nation's health**, v. 53, p. 17–21, jan. 1963.

ZAKERI, S.; MEHRIZI, A. A.; MAMAGHANI, S.; NOORIZADEH, S.; SNOUNOU, G.; DJADID, N. D. Population structure analysis of *Plasmodium vivax* in areas of iran with different malaria endemicity. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 74, n. 3, p. 394–400, mar. 2006.

ANEXOS

**ANEXO I. Aprovação do CEP Projeto: Estudos de marcadores genéticos em *Plasmodium vivax* em recidivas (Presente estudo)**



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Estudo de marcadores genéticos em *Plasmodium vivax* em recidivas

**Pesquisador:** Mauro Shugiro Tada

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 19461513.3.0000.0011

**Instituição Proponente:** Centro de Pesquisa em Medicina Tropical - CEPEM -Rondônia

**Patrocinador Principal:** INSTITUTO DE PESQUISAS EM PATOLOGIAS TROPICAIS DE RONDONIA  
Centro de Pesquisa em Medicina Tropical - CEPEM -Rondônia

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 457.637

**Data da Relatoria:** 29/10/2013

**Apresentação do Projeto:**

Projeto de Pesquisa de caráter epidemiológico molecular. A malária vivax apresenta-se com altos índices de morbidade. Estudos sobre a dinâmica populacional da malária em nosso município são necessárias para que se melhor defina políticas públicas de controle desta doença. Assim, pretende-se avaliar e quantificar a presença de cepas de *P. vivax* na região de Porto Velho, com base em marcadores genéticos moleculares. A amostra consistirá de pacientes sintomáticos, que passivamente procurarem o Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM) para diagnóstico da malária, a partir do qual, havendo consentimento, será recolhido amostra por punção venosa. Será realizado exames de rotina ambulatorial e extração do material genético do parasita, por meio de kits específicos. A partir do DNA será realizado os testes de PCR para alguns marcadores polimórficos, tais como CSP e MSP1. O resultado da PCR será confirmada em gel de agarose. Para os protocolos que o exigirem, será realizado RFLP. Espera-se determinar a relação entre tipos de cepas e outros fatores, como recidivas alterações apresentadas nos exames laboratoriais, por meio de testes estatísticos, bem como avaliar a distribuição das cepas em determinadas regiões da cidade, bem como correlacionar estas cepas com os resultados obtidos em outros estudos.



Continuação do Parecer: 457.637

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Geral:**

Caracterizar a presença de cepas circulantes de *Plasmodium sp.* com base em polimorfismos genéticos das proteínas CSP (proteína Circunsporozoíta) e MSP1 (Proteína de superfície do merozoíta).

**Objetivos específicos:**

- Determinar a presença cepas *P. vivax* VK210 e VK247 na amostra;
- Verificar a condição de policlonalidade das cepas de *vivax* em infecções primárias e recidivas;
- Avaliar relação entre cepas em infecções primárias e secundárias;
- Correlacionar cepas em possíveis recaídas;
- Comparar polimorfismos genéticos entre *P. vivax* e *P. falciparum*.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo a Resolução 466/12 Item V. Toda pesquisa envolvendo seres envolve riscos em tipos e gradações variadas. O projeto caracteriza ter risco mínimo em função de punção venosa e digital necessária para coleta de sangue. Mas os benefícios são diretos aos participantes, com acompanhamento médico para o diagnóstico e tratamento, exames de rotina, o que pode ser útil para equipe médica visualizar ao participante da pesquisa a indicação de outro quadro clínico além da malária. O projeto terá benefícios indiretos tanto a sociedade científica quanto a sociedade geral.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto de extrema relevância, pois favorece o alcance de melhores dados epidemiológicos e assim um controle adequado da malária, para isso é necessário que se entenda a dinâmica populacional das cepas circulantes de *P. vivax*.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Projeto atende todos os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares, tendo sido respondido todas as pendências solicitadas no Parecer Consubstanciado nº 375.349.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto encontra-se Aprovado, tendo em vista que foram respondidas todas as pendências.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**ANEXO II.** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Projeto (TCLE): Estudos de marcadores genéticos em *Plasmodium vivax* em recidivas (Presente estudo)

**VOCÊ ESTÁ SENDO CONVIDADO (A) COMO VOLUNTÁRIO (A) A PARTICIPAR DA PESQUISA:**

**Estudo de marcadores genéticos em *Plasmodium sp.***

**Sob responsabilidade do pesquisador:** Dr. Mauro Shugiro Tada

**Telefone para contato: (069) 3216-5442**

Você está sendo convidado a participar deste projeto de pesquisa sobre malária vivax para que possamos avaliar a diversidade de parasitos que estão em circulação na cidade de Porto Velho.

**A JUSTIFICATIVA, OS OBJETIVOS E OS PROCEDIMENTOS:**

A realização de tal estudo justifica-se pela necessidade de compreender a biologia do parasito.

O objetivo é avaliar e comparar a presença de polimorfismo no parasito em estudos genéticos.

O(s) procedimento(s) a serem adotados serão: de coleta de material biológico e dados, e serão realizados da seguinte forma: Quando o voluntário aceitar a participar da pesquisa, este receberá o TCLE, e as explicações sobre a pesquisa. A seguir será coletado 10 ml de sangue periférico sob condições de assepsia e anti-sepsia de rotina hospitalar.

Junto com você serão convidados mais 80 .

**DESCONFORTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS:**

Existe um desconforto, e será de leve sensação dolorosa no momento da coleta de sangue por punção justificada para que se possa realizar o procedimento tal.

Além do benefício indireto com o resultado científico deste projeto, o usuário deste projeto apresentará como ganho direto pela participação a execução de exames laboratoriais, avaliação médica e acompanhamento pela equipe do projeto, o que poderá fornecer dados sobre doenças secundárias, ressaltando que não será recusado atendimento médico especializado em caso de não aceitação à participação no projeto.

**GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO:**

Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

O(s) pesquisador (es) irá (ao) tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados das determinações da inflamação que serão realizadas dentro de laboratório de pesquisa serão guardados e poderão ser enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar desse estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Centro de Pesquisa em Medicina Tropical e outra será fornecida a você.

**CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS:**

A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

**ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS EM BIORREPOSITÓRIO E BIOBANCO**

As amostras colhidas nesse trabalho serão armazenadas em Biorrepositórios primeiramente, que se destina a ser um tipo de depósito ao qual suas amostras ficarão no tempo de realização deste projeto de pesquisa, cuja guarda ficará com o pesquisador principal Dr. Mauro Shugiro Tada e de responsabilidade institucional Centro de Pesquisa em Medicina Tropical, este depósito permanecerá o tempo programado para realização do trabalho. Caso haja necessidade poderá ser prolongada mediante justificativa e aprovação do CEP (Comitê de Ética em Pesquisa). Este material poderá sofrer transferência para Biobanco institucional, pelo qual sua amostra fará parte de um banco de responsabilidade institucional podendo ser utilizado para pesquisas futuras, essas pesquisas também serão avaliadas por CEP's. Seu material biológico será armazenado sobre um sistema seguro de identificação, que garante o sigilo, o respeito à confidencialidade e à recuperação dos seus dados, para fornecimento de informações de seu interesse ou para a obtenção de consentimento específico para utilização em nova pesquisa;

Por isso torna-se necessário que marque qualquer alternativa abaixo, que condiz com sua participação nesse estudo:

(  ) **Necessidade de novo consentimento a cada pesquisa (a cada nova pesquisa o pesquisador responsável entrará em contato para adquirir novo termo de consentimento livre e esclarecido).**

( ) Dispensa de novo consentimento a cada pesquisa ( seu material biológico poderá ser utilizado para pesquisa futuras sem a necessidade de novo termo de consentimento livre e esclarecido).

É importante esclarecer que você participante desta pesquisa tem garantia expressa da possibilidade de acesso do conhecimento dos resultados obtidos com a utilização dos materiais biológicos e as orientações quanto as suas implicações, em qualquer tempo. Para isso ficará o contato da instituição responsável por seu armazenamento (CEPEM – RO – (69) 3216-5442).

**DECLARAÇÃO DO (A) PARTICIPANTE (A) OU DO SEU RESPONSÁVEL:**

Eu, \_\_\_\_\_, fui informada(o) dos objetivos da pesquisa acima, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. O Professor Orientador certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar os estudantes e/ou o professor Orientador Mauro Shugiro Tada, no telefone (069) 3216-5442, ou e-mail cepemesauro@gmail.com

Declaro que recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

\_\_\_\_\_  
Participante da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Roger LaFontaine (Orientando)

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi **aprovado** pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CEPEM/IPEPATRO/FIOCRUZ, em reunião realizada no dia 25 de Março de 2013.

**ANEXO III. Aprovação CEP/CEPEM do projeto “Avaliação do impacto do tratamento de portadores de *Plasmodium vivax* na manutenção de endemia em pacientes atendidos nas unidades de saúde de Porto Velho – Rondônia”**



REF.: Parecer 48/10 CEP/CEPEM  
Registro CAAE: 0009.0.046.000-10

Porto Velho, 06 de Dezembro de 2010.

Ilmo Dr. Mauro Shugiro Tada  
Instituição: CEPEM

Sr. Pesquisador, em sua Décima reunião realizada no dia 02 de Dezembro de 2010, a Comissão de Ética do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical - CEPEM, atendendo sua solicitação, analisou o projeto sob sua responsabilidade intitulado: “Avaliação do impacto do tratamento de portadores de *Plasmodium vivax* na manutenção da endemia em pacientes atendidos nas unidades de saúde de Porto Velho - Rondônia”. Informo que, após análise e discussão a Comissão de Ética considerou **APROVADO**, o citado projeto.

De acordo com o item VII.13.d, da resolução CNS nº 196/96, V.Sa. deve encaminhar a nossa secretaria relatórios parcial e final do referido projeto enquanto durar a pesquisa.

Atenciosamente,

  
Dra. Carla Freire Celedonio Fernandes  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Centro de Pesquisa em Medicina Tropical –CEPEM  
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEP  
Aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP  
Av Guaporé, 215 - Lagoa Telefone: 3219-6012 / 3216-5442  
Porto Velho – RO



**ANEXO IV: TCLE do projeto: “Avaliação do impacto do tratamento de portadores de *Plasmodium vivax* na manutenção de endemia em pacientes atendidos nas unidades de saúde de Porto Velho – Rondônia”**

Estudo: Avaliação do impacto do tratamento de portadores de *Plasmodium vivax* na manutenção da endemia em pacientes atendidos nas unidades de saúde de Porto Velho – Rondônia

Eu,.....

- Este trabalho tem como a justificativa o estudo da importância de como os casos de recaída de *P. vivax* mantém a distribuição epidemiológica da malária vivax no cenário da cidade de Porto Velho. Tendo como objetivos a averiguação da eficiência do tratamento da malária vivax, averiguar a possibilidade de quantificar a taxa de recaída.
- Com a sua autorização iremos efetuar a coleta de sangue e determinar a espécie de malária, todos os exames realizados serão de graça. Este procedimento poderá resultar em algum desconforto, já que para tanto, será necessário a coleta de sangue a partir da punção venosa (15ml de sangue), ou digital (duas gotas de sangue). No entanto também lhe trará benefícios, pois será acompanhado por uma equipe de especialistas durante o tratamento.
- A amostra colhida será armazenada em biorrepositório podendo ser utilizada em pesquisas posteriores
- A participação é voluntária. Isto quer dizer que você tem todo o direito de não participar deste estudo e retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, e isto não trará nenhum prejuízo, e que terá garantido o seu tratamento, conforme a rotina do serviço de saúde local.
- Pela participação neste estudo, você não receberá nenhum tipo de pagamento.
- Os dados informados pelo paciente serão mantidos em absoluto sigilo e os resultados obtidos neste estudo poderão ser utilizados para trabalhos científicos.
- O resultado será entregue ao paciente, e em caso positivo, o mesmo tratado e acompanhado, ou encaminhado ao serviço médico local para melhor acompanhamento.
- Entendi o que me foi explicado sobre o estudo e concordo de livre e espontânea vontade, participar como voluntário(a) deste estudo realizado no CEPEM, estou ciente que o estudo se faz necessário para avaliar as possíveis causas da doença denominada malária causada por *Plasmodium vivax* na região endêmica de Porto Velho – Rondônia. O estudo compreenderá exame médico, exame de malária.

(Assinatura do participante ou responsável.)

\_\_\_\_\_ Data: ...../...../.....

(Responsável pelo Estudo)- Dr. Mauro Shugiro Tada (69 – 3216-5442) Francisco

Ludervanhe (69 – 92896784); Roger LaFontaine (69-92234620)

(Impressão digital se analfabeto)

\_\_\_\_\_  
(Nome da testemunha ou responsável)

**ANEXO V. Aprovação CEP do Projeto: “Estudo da sensibilidade do limiar de identificação de Plasmodium sp. da região de Porto Velho – RO”**



REF.: Parecer 48/10 CEP/CEPEM  
Registro CAAE: 0009.0.046.000-10

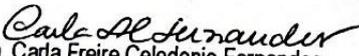
Porto Velho, 06 de Dezembro de 2010.

Ilmo Dr. Mauro Shugiro Tada  
Instituição: CEPEM

Sr. Pesquisador, em sua Décima reunião realizada no dia 02 de Dezembro de 2010, a Comissão de Ética do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical - CEPEM, atendendo sua solicitação, analisou o projeto sob sua responsabilidade intitulado: “**Avaliação do impacto do tratamento de portadores de Plasmodium vivax na manutenção da endemia em pacientes atendidos nas unidades de saúde de Porto Velho - Rondônia**”. Informo que, após análise e discussão a Comissão de Ética considerou **APROVADO**, o citado projeto.

De acordo com o item VII.13.d, da resolução CNS nº 196/96, V.Sa. deve encaminhar a nossa secretaria relatórios parcial e final do referido projeto enquanto durar a pesquisa.

Atenciosamente,

  
Dra. Carla Freire Celedonio Fernandes  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Centro de Pesquisa em Medicina Tropical –CEPEM  
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEP  
Aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP  
Av Guaporé, 215 - Lagoa Telefone: 3219-6012 / 3216-5442  
Porto Velho – RO



**ANEXO VI. TCLE do Projeto: “Estudo da sensibilidade do limiar de identificação de Plasmodium sp. da região de Porto Velho - RO**

Eu,.....

- Com a sua autorização iremos efetuar a coleta de sangue e determinar a espécie de malária, todos os exames realizados serão de graça. **A participação é voluntária.** Isto quer dizer que você tem todo o direito de não participar deste estudo e retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, e isto não trará nenhum prejuízo, e que terá garantido o seu tratamento, conforme a rotina do serviço de saúde local.
- Pela participação neste estudo, você não receberá nenhum tipo de pagamento.
- A amostra colhida será armazenada em biorrepositório podendo ser utilizada em pesquisas posteriores
- Os dados informados pelo paciente serão mantidos em absoluto sigilo e os resultados obtidos neste estudo poderão ser utilizados para trabalhos científicos.
- O resultado será entregue ao paciente, e em caso positivo, o mesmo tratado e acompanhado, ou encaminhado ao serviço médico local para melhor acompanhamento.
- Entendi o que me foi explicado sobre o estudo e concordo de livre e espontânea vontade, participar como voluntário(a) deste estudo realizado no CEPEM, estou ciente que o estudo se faz necessário para avaliar as possíveis causas da doença denominada malária causada por *Plasmodium vivax* na região endêmica de Porto Velho – Rondônia. O estudo compreenderá exame médico, exame de malária.

---

(Assinatura do participante ou responsável.)

\_\_\_\_\_ Data: ...../...../.....

(Responsável pelo Estudo)- MSc. Joana D’Arc Neves Costa (69 – 3216-5442) Fone: \_\_\_\_\_

Ludervanhe (69 – 92896784); Roger LaFontaine (69-92234620)

(Impressão digital se analfabeto)

---

(Nome da testemunha ou responsável)

**ANEXO VI. Aprovação do projeto “Avaliação do desempenho de um teste de diagnóstico rápido para a malária em unidade de atendimento à doença na cidade de Porto Velho”**

29/03/2015 Plataforma Brasil

---

Saúde  
Ministério da Saúde
central de suporte

Plataforma Brasil
V2.21

Público

Consultas

Você está em: Público > Consultas > Pesquisar Validade CAAE

PESQUISAR VALIDADE CAAE

**Dados para Validação**

\* Número do CAAE

---

DETALHAMENTO DO CAAE

<p><b>Número CAAE</b> 07738212.4.0000.5541</p> <p><b>Pesquisador Responsável</b> Luciano Teixeira Gomes</p> <p><b>Título do Projeto de Pesquisa</b> Avaliação do desempenho de um teste de diagnóstico rápido para a malária em unidade de ate(...)</p>	<p><b>Contato Público</b> Luciano Teixeira Gomes</p> <p><b>Data Início do Cronograma</b> 14/01/2013</p> <p><b>Data Fim do Cronograma</b> 31/01/2014</p>
---	---

Este sistema foi desenvolvido para os navegadores Internet Explorer (versão 7 ou superior),  
ou Mozilla Firefox (versão 9 ou superior).

Conselho Nacional de Saúde
Ministério da Saúde

APÊNDICE

APÊNDICE I. Sequenciamento RgMSP1

MSP1	CTGATGCACGTGATCA <b>ACTTCCA</b> CTATGATTTGTTGAGCGCGAACGTCCACGACATGTGT	420
67R	-----	0
81R	-----N	1
14R	-----	0
36	-----	0
MSP1	GCCCATGATTATTGCAAAATACCGGAGCATCTAAAAATCTCTGACAAAGAGCTGGACATG	480
67R	---TNNNTTGGGCAAAATACCGGAGCATCTAAAAATCTCTGACAAAGAGCTGGACATG	57
81R	NAAATTTTATTTGGCAAAATACCGGAGCATCTAAAAATCTCTGACAAAGAGCTGGACATG	61
14R	NNAAATTTTATTTGCAAAATACCGGAGCATCTAAAAATCTCTGACAAAGAGCTGGACATG	60
36	NNAAATTTTATTTGCAAAATACCGGAGCATCTAAAAATCTCTGACAAAGAGCTGGACATG	60
	* *****	
MSP1	CTGAAGAAAGTTGTGCTGGGATTATGGAAGCCCTTGGACAACATAAAGGACGATATTGGA	540
67R	CTCAAGAAAGTTGTTCTGGGCTATAGGAAGCCCCTGGACAACATAAAGGACGACATTGGA	117
81R	CTCAAGAAAGTTGTTCTGGGCTATAGGAAGCCCCTGGACAACATAAAGGACGACATTGGA	121
14R	CTCAAGAAAGTTGTTCTGGGCTATAGGAAGCCCCTGGACAACATAAAGGACGACATTGGA	120
36	CTCAAGAAAGTTGTTCTGGGCTATAGGAAGCCCCTGGACAACATAAAGGACGACATTGGA	120
	** ***** * *****	
MSP1	AAATTGGAGACCTTCATCACTAAAAACAAGGAAACAATAAGCAATATAAACAAGTTAATT	600
67R	AAATTGGAGGCTTTATCACTAAAAACAAGGAAACAATAAGCAATATAAACAAGTTAATT	177
81R	AAATTGGAGGCTTTATCACTAAAAACAAGGAAACAATAAGCAATATAAACAAGTTAATT	181
14R	AAATTGGAGGCTTTATCACTAAAAACAAGGAAACAATAAGCAATATAAACAAGTTAATT	180
36	AAATTGGAGGCTTTATCACTAAAAACAAGGAAACAATAAGCAATATAAACAAGTTAATT	180
	***** **	
MSP1	AGTGATGAGAATGCTAAAAGGGGAGGCCAATCCACCAACACGACTAATGGCCCCGGAGCG	660
67R	AGTGATGAGAATGCTAAAAGGGGAAGCCAATCCACCAACACGACTAATGGAACCGGAGCG	237
81R	AGTGATGAGAATGCTAAAAGGGGAAGCCAATCCACCAACACGACTAATGGAACCGGAGCG	241
14R	AGTGATGAGAATGCTAAAAGGGGAAGCCAATCCACCAACACGACTAATGGAACCGGAGCG	240
36	AGTGATGAGAATGCTAAAAGGGGAAGCCAATCCACCAACACGACTAATGGAACCGGAGCG	240
	*****	
MSP1	CAAAACAATGCTGCTCAAGGTTCAACAGGCAATACTGAAACAGGTA	720
67R	CAAAACAATGCTGCTCAAGGTTCAACAGGCAATACTGAAACAGGTA	297
81R	CAAAACAATGCTGCTCAAGGTTCAACAGGCAATACTGAAACAGGTA	301
14R	CAAAACAATGCTGCTCAAGGTTCAACAGGCAATACTGAAACAGGTA	300
36	CAAAACAATGCTGCTCAAGGTTCAACAGGCAATACTGAAACAGGTA	300
	*****	
MSP1	TCATCTAACACTCTCTCGGTTGGCGATGGTACGACGGTCGTAGGAACATCTTCTCCAGCA	780
67R	TCATCTAACACTCTCTCGGTTGGCGATGGTACGACGGTCGTAGGAACATCTTCTCCAGCA	357
81R	TCATCTAACACTCTCTCGGTTGGCGATGGTACGACGGTCGTAGGAACATCTTCTCCAGCA	361
14R	TCATCTAACACTCTCTCGGTTGGCGATGGTACGACGGTCGTAGGAACATCTTCTCCAGCA	360
36	TCATCTAACACTCTCTCGGTTGGCGATGGTACGACGGTCGTAGGAACATCTTCTCCAGCA	360
	*****	
MSP1	CCTGCTGCTCCATCTTCAACAAATGAAGACTACGACGAGAAGAAAAAATCTACCAAGCC	840
67R	CCTGCTGCTCCATCTTCAACAAATGCAAACTACGAAGCGAAGAAAAATCATCTACCAAGCC	417
81R	CCTGCTGCTCCATCTTCAACAAATGCAAACTACGAAGCGAAGAAAAATCATCTACCAAGCC	421
14R	CCTGCTGCTCCATCTTCAACAAATGCAAACTACGAAGCGAAGAAAAATCATCTACCAAGCC	420
36	CCTGCTGCTCCATCTTCAACAAATGCAAACTACGAAGCGAAGAAAAATCATCTACCAAGCC	420
	***** * ***** * *****	
MSP1	ATG <b>TACAACGGCATATTTTACACG</b> AGCCAGCTGGAGGAGGCGCAAAGTTAATCGAAGTC	900
67R	ATCTACAACGGCATATTTTACACGANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	457
81R	ATCTACAACGGCATATTTTACACGANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	455
14R	ATCTACAACGGCATATTTTACACGANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	447
36	ATCTACAACGGCATATTTTACACGANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	448
	** *****	

Os trechos em destaque demonstram a região de alinhamento dos iniciadores da segunda PCR (Nested).

APÊNDICE II. Sequenciamento da MSP1F3

GQ890962	GAAGCTTTG	<b>CAAGCCTACCAAGAATTGATCCCCAA</b>	GGTGACCACTCAGGAAAGCGCATCC	3780
Q63	-----	<b>CAAGCCTACCAAGAATTGATCCCCAA</b>	AGTAACCTCTCAGGAAAGCACATCC	51
Q26	-----	<b>CAAGCCTACCAAGAATTGATCCCCAA</b>	AGTAACCTCTCAGGAAAGCACATCC	51
Q23	-----	<b>CAAGCCTACCAAGAATTGATCCCCAA</b>	GGTGACCACTCAGGAAAGCACATCC	51
Q19	-----	<b>CAAGCCTACCAAGAATTGATCCCCAA</b>	AGTAACCTCTCAGGAAAGCACATCC	51
Q11	-----	<b>CAAGCCTACCAAGAATTGATCCCCAA</b>	GGTGACCACTCAGGAAAGCGCATCC	51
Q39	-----	<b>CAAGCCTACCAAGAATTGATCCCCAA</b>	GGTGACCACTCAGGAAAGCACATCC	51
Q38	-----	<b>CAAGCCTACCAAGAATTGATCCCCAA</b>	AGTAACCTCTCAGGAAAGCACATCC	51
Q36	-----	<b>CAAGCCTACCAAGAATTGATCCCCAA</b>	GGTGACCACTCAGGAAAGCGCATCC	51
Q27	-----	<b>CAAGCCTACCAAGAATTGATCCCCAA</b>	GGTGACCACTCAGGAAAGCGCATCC	51
		*****	*****	
GQ890962	GCACCAGCAGCAGCAGCAGTAAC	-AGTACCAGGAGCAGGAGTAGTACCAGGAGCAGCAGC		3839
Q63	GTGGCAGTAACAGTACCAGGAGC	-AGTAGTACCAT---CAGCAGTACCAGGAGGATTA--		105
Q26	GTGGCA-GTAACAGTACCAGGAGCAGTAGTACCAG	---GCGTACCAACAGCAGCAGCC--		105
Q23	GTGGCA-GTAACAGTACCAGGAGCAGTAGTACCAG	---GCGTACCAACAGCAGCAGCC--		105
Q19	GTGGCA-GTAACAGTACCAGGAGCAGTAGTACCAG	---GCGTACCAACAGCAGCAGCC--		105
Q11	GCACCAGCAGCAGCAGCAGTAAC	-AGTACCAGGAGCAGGANGT-----ACCCAGCAGC		102
Q39	GTGGCA-GTAACAGTACCAGGAGCAGTAGTACCAG	---GCGTACCAACAGCAGCAGCC--		105
Q38	GTGGCAGTAACAGTACCAGGAGCAGTAGTACCAG	---GCGTACCAACAGCAGCAGCC--		106
Q36	ACAACAGCGGCAACATTACCAGTAACAGTACCAGT	---CAGCAGTACCAGGAGGATTA--		106
Q27	ACAACAGCGGCAACATTACCAGTAACAGTACCAGT	---CAGCAGTACCAGGAGGATTA--		105
	**	*	*	
GQ890962	AGCAGGAGTAGT	-AGTACCAGGAGCAGCAGCAGCAGGAGTAGTACCAGGAGCATCAGCAG		3898
Q63	-CCTGGAGCAGG	-AGTACCAGGAGCAGCAGCA-----GGACTAACAC-----		145
Q26	-GCAGGATCAGG	-----AGCATCAGGC-----GCAGTACC-----		134
Q23	-GCAGGATCAGG	-----AGCATCAGGC-----GCAGTACC-----		134
Q19	-GCAGGATCAGG	-----AGCATCAGGC-----GCAGTACC-----		134
Q11	AGGAGCAGGAGT	-AGTACCAGGAGCAGCAGCAGGAGTAGTACCAGGAGCATCAGCAG		161
Q39	-GCAGGATCAGG	-----AGCATCAGGC-----GCAGTACC-----		134
Q38	-GCAGGATCAGG	-----AGCATCAGGC-----GCAGTACC-----		135
Q36	-CCTGGAGCAGG	AGNTACCAGGAGCAGCAGCA-----GGACTAACAC-----		147
Q27	-CCTGGAGCAGG	-AGTACCAGGAGCAGCAGCA-----GGACTAACAC-----		145
	**	***	***	
GQ890962	CAGGAGTAGTACCAGGAGCATCAGCAGCAGGAGTA	----GTACCAGGAGCACCAGCAGGA		3954
Q63	-----	CACCACCACCAGCAGGATCAGTA-----CCAGCAACAGGACCAGGA		186
Q26	-----	ACCAGCAGGAGGACCATCACCACCAGCAACAGGA-CCAGGAGCAGCA		180
Q23	-----	ACCAGCAACAGGA-----CCAGGAGCAGCA		159
Q19	-----	ACCAGCAGGAGGACCATCACCACCAGCAACAGGAGGAGTAGTACCA		181
Q11	CAGGAGTAGTACCAGGAGCACCAGCAGGAGCAGTACCAGCAGGAGCAGCACCAGCAGGA			221
Q39	-----	ACCAGCAACAGGA-----CCAGGAGCAGCA		159
Q38	-----	ACCAGCAGGAGGACCATCACCACCAGCAACAGGA-CCAGGAGCAGCA		181
Q36	-----	CACCACCACCAGCAGGATCAGTA-----CCAGCAACAGGACCAGGA		188
Q27	-----	CACCACCACCAGCAGGATCAGTA-----CCAGCAACAGGACCAGGA		186
	*	**	**	
GQ890962	GCAGCATCATCAGCACCAGGAGCAACAAGAAACAAACACAACACAAGCGCA	<b>GGACTACGCC</b>		4014
Q63	GCAGCAGCAGGAA	----TCAACAGAAGAAAAAGCTAGCAGCAAAAAGCGCA <b>GGACTACGCC</b>		241
Q26	GCA	----GGAT----CAACAGAAGAAAA-CGTAGCAGCAAAAAGCGCA <b>GGACTACGCC</b>		228
Q23	GCA	----GGAT----CAACAGAAGAAAA-CGTAGCAGCAAAAAGCGCA <b>GGACTACGCC</b>		207
Q19	GGAGTAGTAGAAT	----CAGCAGAAGC-ACAAACACAACACAAGCGCA <b>GGACTACGCC</b>		235
Q11	GCAGCACCATCAGCACCAGGAGCAACAAGAAACAAACACAACACAAGCGCA	<b>GGACTACGCC</b>		281
Q39	GCA	----GGAT----CAACAGAAGAAAAAGCTAGCAGCAAAAAGCGCA <b>GGACTACGCC</b>		207
Q38	GCA	----GGAT----CAACAGAAGAAAAAGCTAGCAGCAAAAAGCGCA <b>GGACTACGCC</b>		230
Q36	GCAGCAGCAGG	-A----TCAACAGAAGAAAAAGCTAGCAGCAAAAAGCGCA <b>GGACTACGCC</b>		242
Q27	GCAGCAGCAGG	-A----TCAACAGAAGAAAAAGCTAGCAGCAAAAAGCGCA <b>GGACTACGCC</b>		240
	*	*	*	
GQ890962	<b>GAGGACTACGACAAAGTAAT</b>	CGCGCTGCCCTGTTGGCAACAACGATGACGACGGGGAG		4074
Q63	<b>GAGGACTACGACAAAGTAAT</b>	-----		261
Q26	<b>GAGGACTACGACAAAGTAAT</b>	-----		248
Q23	<b>GAGGACTACGACAAAGTAAT</b>	-----		227
Q19	<b>GAGGACTACGACAAAGTAAT</b>	-----		255
Q11	<b>GAGGACTACGACAAAGTAAT</b>	-----		301
Q39	<b>GAGGACTACGACAAAGTAAT</b>	-----		229
Q38	<b>GAGGACTACGACAAAGTAAT</b>	-----		250
Q36	<b>GAGGACTACGACAAAGTAAT</b>	-----		262
Q27	<b>GAGGACTACGACAAAGTAAT</b>	-----		260
	*****			

Os trechos em destaque demonstram a região de alinhamento dos iniciadores da segunda PCR

**APÊNDICE II. Resumos publicados em Eventos**

TABORDA, ROGER LAFONTAINE MESQUITA ; RODRIGUES, F. L. S. ; SANTOS JUNIOR, A. P. J. ; MELO, C. F. R. ; SILVA, R. R. ; KATSURAGAWA, TONY HIROSCHI ; COSTA, J. D. N. ; TADA, M. S. . Análise da MSP1 Bloco 3 em Amostras de Pacientes com Infecção por P. Vivax na Região de Porto Velho - Rondônia. In: **50 Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2014**, Rio Branco. 50 Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2014.

TABORDA, ROGER LAFONTAINE MESQUITA; RODRIGUES, F. L. S. ; JUSTINIANO JUNIOR, A. P. ; MELO, C. F. R. ; SILVA, R. R. ; TADA, MAURO SHUGIRO . ANÁLISE DA MSP1 BLOCO 3 EM AMOSTRAS DE PACIENTES COM INFECÇÃO POR P. VIVAX NA REGIÃO DE PORTO VELHO - RONDÔNIA. In: **50 Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2014**, Rio Branco. 50 Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2014.

TABORDA, ROGER LAFONTAINE MESQUITA ; COSTA, J. D. N. ; RODRIGUES, F. L. S. ; TADA, M. S. . PROJETO: PADRÃO DE RECIDIVAS DE MALÁRIA VIVAX EM PORTO VELHO, ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DOS CASOS NA ÁREA URBANA. In: **XIII Reunião Nacional de Pesquisa da Malária, 2013**, Manaus. Anais XIII Reunião Nacional de Pesquisa em Malária, 2013.

TABORDA, ROGER LAFONTAINE MESQUITA ; COSTA, JOANA D'ARC NEVES ; RODRIGUES, FRANCISCO LURDEVANHE DA SILVA ; TADA, MAURO SHUGIRO . Análise epidemiológica da malária na área urbana de Porto Velho RO, no período de 2003-2012. In: **XIII Reunião Nacional de Pesquisa da Malária, 2013**, Manaus. Anais XIII Reunião Nacional de Pesquisa da Malária, 2013.