

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA



**Identificação dos Polimorfismos do
Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA1) de
Plasmodium vivax em Isolados Brasileiros**

Priscila Grynberg

Belo Horizonte
Fevereiro de 2007

Priscila Grynberg

**Polimorfismo do Antígeno 1 de Membrana
Apical (AMA1) de *Plasmodium vivax* em
Isolados Brasileiros**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Parasitologia, Instituto de Ciências
Biológicas, Universidade Federal de
Minas Gerais como requisito final à
obtenção do grau de Mestre em
Parasitologia.

Área de Concentração: Protozoologia

Orientadora: Prof^a Érika Martins Braga (ICB/UFMG)

Belo Horizonte
Fevereiro de 2007

Trabalho realizado no Laboratório de Malária do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG - Belo Horizonte, MG, com o auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Bolsa de Mestrado/2005-2007) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), processo número CBB 51/03 e CBB 625/06.

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética da UFMG (ETIC 254/06).

Aos meus pais, Jaime e Suely,
por apoiarem e acreditarem
nas minhas decisões.

Às minhas irmãs Silvia e Deborah
pelos momentos divertidos.

À minha avó Leje (*in memoriam*),
por sempre acreditar que nada é
mais importante que a educação.

Ao Felipe, pelo amor, amizade,
companheirismo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, ICB/UFMG, na pessoa do Prof. Pedro Marcos Linardi (Coordenador), os meus sinceros agradecimentos pelos conhecimentos parasitológicos adquiridos durante o curso de Mestrado em Parasitologia, e pela oportunidade de realização dessa Dissertação de Mestrado.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Érika Martins Braga, pela orientação, amizade, incentivo, convívio, dedicação, por acreditar e ter me dado a oportunidade de desenvolver esse trabalho.

Ao Dr. Cor Jesus Fernandes Fontes (Universidade Federal de Mato Grosso) por ter fornecido as amostras biológicas utilizadas nesta dissertação e pela caracterização clínica dos pacientes.

À Prof^a. Élide Rabello e ao Rodrigo (Laboratório de Parasitologia Molecular), à Adriana e ao Ricardo (Laboratório de Insetos Hematófagos), por terem colaborado de diferentes formas com o processo de purificação, seqüenciamento e análise das amostras.

Aos estudantes do Laboratório de Diversidade Molecular (Departamento de Biologia Geral) e do Laboratório de Genética Bioquímica (Departamento de Bioquímica e Imunologia) pelo uso do seqüenciador.

À Dra. Luzia Helena, pesquisadora do Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz - MG, pela doação do Kit de Extração de DNA, que foi essencial nas primeiras etapas deste trabalho.

À Sumara, secretária do curso de Pós Graduação em Parasitologia, pela eficiência demonstrada e pela amizade e carinho.

Aos Professores do Departamento de Parasitologia, por todo o conhecimento que adquiri ao longo do Bacharelado e Mestrado.

À Família Mexicana (Turma de Mestrado – 2005) – Ana Flávia, Carla, Ceres, Fernanda, Kelly, Renata e Sydnei – pelos bons (e maus!) momentos juntos e pelas amizades que ganhei ao longo desses dois anos.

Aos colegas de laboratório Kézia, Cris, Norinne, Lílian, Mateus, e Márcia pelo apoio, colaboração, amizade e troca de conhecimentos.

Aos Losmiguitos, eternos amigos ainda dos tempos de Santo Antônio, pelos muitos momentos divertidos: viagens, festas, saídas, pastéis chinês, pizzas, churrascos do Moacir, crepes, aniversários, artesanomiguitocultos, Loscarmiguitos e vários outros encontros que marcaram e ainda marcarão a minha vida!

Muito Obrigada!!!

SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xi
Resumo	xii
1 Introdução	1
1.1 Situação atual da Malária	1
1.2 Ciclo dos plasmódios no homem	3
1.3 Características do <i>Plasmodium vivax</i>	5
1.4 Antígeno 1 de Membrana Apical	8
1.4.1 Estudos do polimorfismo do gene AMA-1 de <i>P. vivax</i> (<i>PvAMA-1</i>)	14
2 Justificativa	17
3 Objetivos	19
3.1 Objetivo Geral	19
3.2 Objetivos específicos	19
4 Material e Métodos	20
4.1 Populações de estudo	20
4.1.1 População de Cuiabá	20
4.1.2 População de Apicás	21
4.2 Extração de DNA	22
4.3 Amplificações do DNA	23
4.3.1 Amplificação do gene codificador da proteína AMA-1 de <i>P. vivax</i>	23
4.3.2 Amplificação do gene 18S SSu rRNA de plasmódios	24
4.4 Seqüenciamento do gene <i>PvAMA-1</i>	25
4.5 Associação entre polimorfismos e aspectos da morbidade	27
4.6 Análise dos dados e análise estatística	28

5	Resultados	30
5.1	Amplificação do gene <i>PvAMA-1</i>	30
5.2	Seqüenciamento das amostras positivas para o gene <i>PvAMA-1</i>	31
5.3	Polimorfismos de <i>PvAMA-1</i> entre os isolados brasileiros	32
5.4	Diversidade genotípica (haplotípica) das seqüências brasileiras	37
5.5	Análise intrapopulacional	39
5.6	Análise interpopulacional	40
5.7	Associação entre resíduos polimórficos, parasitemia e níveis de plaquetas	50
6	Discussão	55
7	Conclusões	63
8	Referências Bibliográficas	64
9	Anexo	73

Lista de Figuras

	Página
Figura 1: Distribuição mundial da malária em 2005.	1
Figura 2: Distribuição, por estado brasileiro, dos casos notificados ao Ministério da Saúde em 2005.	2
Figura 3: Ciclo dos plasmódios humanos	5
Figura 4: Antígeno de Membrana Apical 1 (AMA-1). Em destaque as oito pontes dissulfeto determinando os três domínios da proteína.	9
Figura 5: Antígeno de Membrana Apical.	11
Figura 6: Mapa do Brasil evidenciando a procedência das amostras de sangue coletadas no HJM ou no Garimpo Satélite em Apiacás, MT.	22
Figura 7: Gel de poliacrilamida 6% com o resultado da amplificação do gene <i>PvAMA-1</i> em amostras extraídas de sangue conservado em guanidina 4M pela <i>Nested</i> PCR.	30
Figura 8: Gel de poliacrilamida 6% ilustrando o resultado da amplificação do gene 18S SSu rRNA de plasmódios das amostras extraídas de sangue conservado em guanidina 4M e em papel-filtro pela <i>nested</i> PCR.	31
Figura 9: Localização dos países/regiões na A – Ásia e B – Oceania das seqüências usadas nas comparações com as amostras brasileiras e avaliados por Figtree e colaboradores (2000).	33
Figura 10: Árvore filogenética das seqüências de <i>PvAMA-1</i> obtidas a partir de amostras brasileiras (método: Neighbor-Joining).	43
Figura 11: Árvore filogenética dos 88 haplótipos definidos a partir de 320 seqüências de <i>PvAMA-1</i> de quatro diferentes continentes (método: Neighbor-Joining)	49
Figura 12: Associação entre parasitemia e níveis de plaquetas em pacientes atendidos no Ambulatório Júlio Müller, Cuiabá, Brasil.	51
Figura 13: Correlação entre os níveis de plaquetas e o grau de parasitemia entre 49 pacientes com malária vivax.	52

Figura 14: Mediana da parasitemia (A) e dos níveis de plaquetas (B) de acordo com a presença dos resíduos de aminoácidos polimórficos nos sítios 193/210 entre os pacientes com malária *vivax* sintomática. 54

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1: Sítios de aminoácidos polimórficos (e os sítios nucleotídicos correspondentes) do domínio I do gene <i>PvAMA-1</i> presentes no Brasil e em países/regiões da África, Ásia e Oceania.	34
Tabela 2: Seqüências de nucleotídeos e os respectivos aminoácidos das amostras brasileiras e os haplótipos gerados.	38
Tabela 3: Análise intrapopulacional: valores da variabilidade nucleotídica, da diversidade genotípica, de d_S e d_N para os isolados brasileiros caracterizados.	41
Tabela 4: Análise interpopulacional dos isolados brasileiros caracterizados.	42
Tabela 5: Valores de F_{ST} entre os estados brasileiros.	44
Tabela 6: Análise intrapopulacional: valores da variabilidade nucleotídica, da diversidade genotípica, e d_S e d_N para os isolados brasileiros em comparação às seqüências obtidas de isolados oriundos de outros continentes.	44
Tabela 7: Análise interpopulacional das seqüências brasileiras e de outros continentes.	46 e 47
Tabela 8: Valores de F_{ST} entre os diferentes países analisados.	48
Tabela 9: Associação entre os sítios de aminoácidos polimórficos, parasitemia e níveis de plaquetas em pacientes com malária <i>vivax</i> no Brasil.	53

RESUMO

Estudos da diversidade populacional dos parasitos causadores da malária apresentam grande significado prático para o desenvolvimento de possíveis estratégias de controle da doença como, por exemplo, o desenvolvimento de uma vacina antimalárica. O antígeno de membrana apical (AMA-1) é uma proteína integral de membrana do tipo 1 presente em todas as espécies de *Plasmodium* já examinadas. O seu gene é altamente conservado, porém exibe diversidade alélica. Acredita-se que este antígeno possui um papel no início do processo de invasão do eritrócito, podendo ser diretamente responsável pela reorientação do merozoíto, ou pode iniciar o contato entre o parasito e o eritrócito. Diversos trabalhos sobre a diversidade gênica de AMA-1 de *Plasmodium vivax* já foram publicados, porém há uma escassez de trabalhos realizados na América Latina, incluindo o Brasil.

O objetivo desse trabalho foi caracterizar molecularmente a diversidade genética do domínio polimórfico do gene *PvAMA-1* em populações de *P. vivax* isoladas de pacientes provenientes de diferentes áreas endêmicas e expostos a diferentes situações epidemiológicas de transmissão na Amazônia Brasileira.

Para isso, 233 amostras de 193 pacientes que adquiriram as infecções maláricas nos estados do Mato Grosso, Acre, Amazonas, Pará, Rondônia e Roraima foram submetidas à extração de DNA. Em seguida, o gene codificador para o domínio I da proteína AMA-1 de *P. vivax* foi amplificado por meio de uma *nested-PCR*. Os produtos amplificados, após terem sido visualizados em um gel de poliacrilamida 6%, foram purificados, seqüenciados no MegaBACE e posteriormente analisados.

O seqüenciamento do gene *PvAMA-1* de isolados brasileiros revelou 10 novos sítios nucleotídicos polimórficos, que levaram à mudanças de aminoácidos e à duas substituições sinônimas. Além disso, a diversidade do gene *PvAMA-1* nos isolados brasileiros mostrou-se menor quando comparada à diversidade encontrada na África, Ásia e Oceania. Não foram vistas diferenças de diversidade entre os estados brasileiros, ao contrário do observado em outras regiões. Determinados alelos mostraram alto coeficiente de associação com a contagem de plaquetas circulantes em pacientes com

malária vivax aguda, indicando que a presença desta variante do antígeno pode ser um importante indicador de morbidade.

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Situação atual da Malária

A Malária é uma doença que infecta anualmente 350 a 500 milhões de pessoas sendo endêmica em regiões tropicais e subtropicais do globo (África sub-saara, Sudeste Asiático, Oceania, América Central e América do Sul) (Figura 1). Além disso, ela causa a morte de cerca de um milhão de pessoas por ano, em sua maioria crianças com até cinco anos de idade, vítimas de infecções causadas pelo *Plasmodium falciparum*. Cento e sete são os países ou territórios cuja população (3,2 bilhões de pessoas - 48% da população mundial) possui algum risco de contrair a doença, mas esse número já foi bem maior chegando a 140 países no início do século passado (Hay et al., 2004). Essa redução foi devida aos esforços mundiais em controlar a malária, que conseguiu erradicá-la dos países epidêmicos, reduzir a transmissão em 66% nos países hipoendêmicos e em 45% nos países mesoendêmicos entre 1900 e 2002. No entanto, verificou-se a redução de apenas 16% da transmissão nos países holoendêmicos e não houve nenhuma alteração da transmissão nos países hiperendêmicos (Hay et al., 2004).

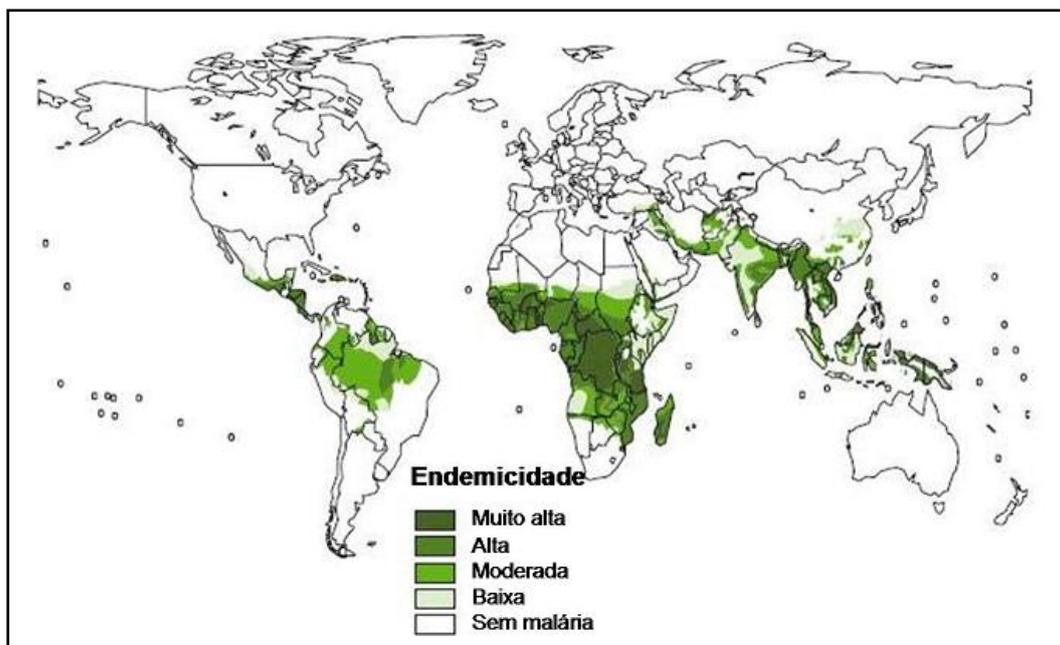


Figura 1: Distribuição mundial da malária em 2005 (Fonte: OMS, 2005)

No Brasil, as regiões que concentram o maior número de casos são as regiões Norte e parte da região Centro-Oeste. Cerca de 99% dos casos notificados ocorrem nessas regiões, que concentram apenas 12% da população no Brasil (WHO, 2005). Em 2005, foram notificados 603.118 casos, sendo 594.164 autóctones (Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica em Malária - SIVEP, 2006). O estado com o maior número de notificações foi o estado do Amazonas, com mais de 223.000 casos, seguidos pelos estados do Pará e Rondônia, com aproximadamente 120.000 casos cada (Figura 2).

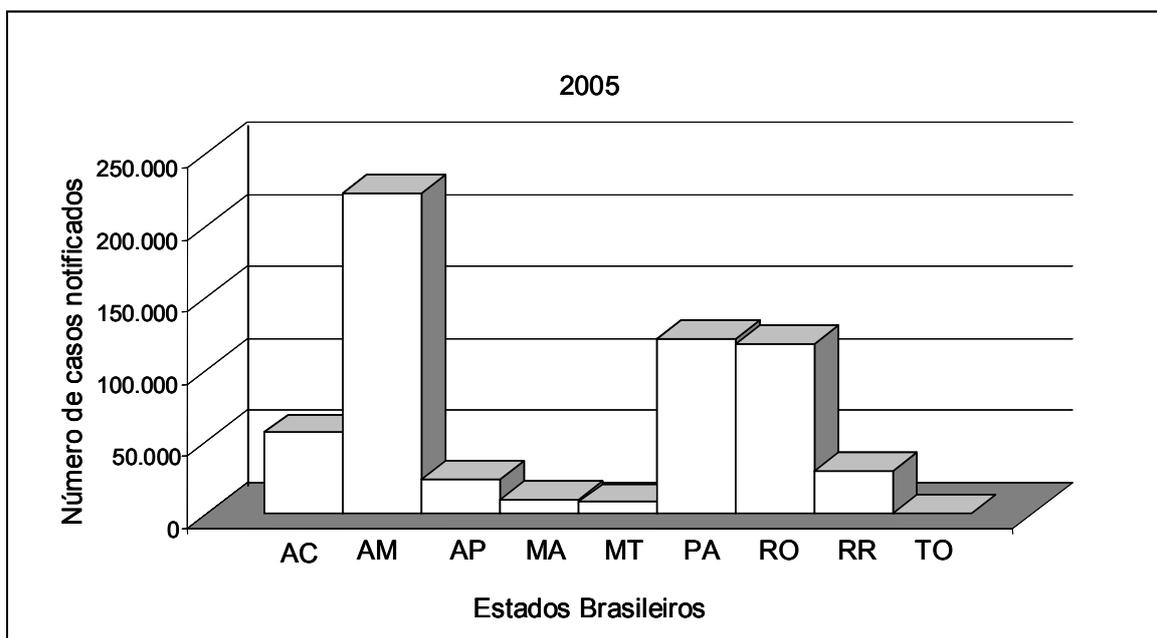


Figura 2: Distribuição, por estado brasileiro, dos casos notificados ao Ministério da Saúde em 2005 (Fonte: SIVEP, 2005).

Em 2006, até a primeira quinzena de dezembro foram notificados cerca de 480.000 casos autóctones (SIVEP, 2006). Comparado ao mesmo período do ano passado, houve uma redução de 14% no número de casos notificados. Essa redução ocorreu nos estados do Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Nos estados do Amapá, Maranhão e Mato Grosso, o aumento do número de casos foi pouco expressivo. Porém, no estado do Acre, o número de casos notificados aumentou consideravelmente.

A espécie prevalente no Brasil é o *Plasmodium vivax*, que no ano de 2006 foi responsável por aproximadamente 73,3% dos casos. *P. falciparum* é a

segunda espécie com maior número de casos (25%). As infecções mistas causadas por *P. vivax* e *P. falciparum* respondem por 1,6% das infecções notificadas e o *Plasmodium malariae*, por apenas 0,1%.

O Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (PNCM) se baseia em diversas estratégias de combate à doença e concentra a sua ação na região da Amazônia Legal. O apoio à estruturação dos serviços locais de saúde, o diagnóstico e o tratamento precoces, a vigilância epidemiológica, a capacitação de recursos humanos, a educação em saúde, a comunicação e a mobilização social e o controle seletivo de vetores são estratégias de ação que norteiam o PNCM. Essas ações visam reduzir a incidência, a mortalidade e as formas graves de malária, eliminar a transmissão em áreas urbanas nas capitais e manter a ausência de transmissão em áreas onde a mesma já tenha sido interrompida. O programa também possui como um dos principais objetivos, intensificar as ações de controle de malária nos estados extra-amazônicos.

1.2 – Ciclo dos plasmódios no homem

A infecção malárica inicia-se quando o mosquito vetor (fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*) inocula esporozoítos de *Plasmodium* no tecido subcutâneo, e com menos frequência, diretamente na circulação sangüínea do homem (Figura 3). Recentemente, em um trabalho utilizando-se como modelo experimental o *Plasmodium berghei*, demonstrou-se que apenas uma proporção dos parasitos entra nos capilares sangüíneos enquanto outros são drenados para os vasos linfáticos, atingindo os linfonodos (Amino et al., 2006). Os esporozoítos que atingem os linfonodos podem se desenvolver como formas exo-eritrocíticas. Porém, são degradados por leucócitos. Apenas aqueles que atingem a circulação sangüínea são capazes de se desenvolverem (Amino et al., 2006). No interior dos hepatócitos, os esporozoítos se desenvolvem transformando-se em trofozoítos pré-eritrocíticos. Acredita-se que o esporozoíto passe por diversas células e mesmo hepatócitos antes de invadir aquele que será o seu local de desenvolvimento (Mota et al., 2001). Após reprodução assexuada por esquizogonia, estas formas darão origem a dezenas de milhares de merozoítos. Os merozoítos atingem a

circulação sangüínea envoltos por uma estrutura vesicular denominada merosoma, visto em infecções experimentais com *P. berghei* (Sturm et al., 2006). Cada merosoma pode conter desde poucos a milhares de merozoítos. A velocidade de deslocamento dessas estruturas é menor quando comparada a velocidade dos eritrócitos circulantes, sugerindo que a superfície do merosoma possui moléculas que interagem com o endotélio dos sinusóides hepáticos. Acredita-se que os merozoítos utilizem essa estrutura para atingir a circulação sangüínea com segurança. Eles possuem a capacidade de não serem reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro, permanecendo intactos por pelo menos uma hora. Os estudos revelaram que o núcleo da célula hospedeira se apresenta condensado, ocorre perda do potencial de membrana da mitocôndria com conseqüente liberação do citocromo *c* das mesmas. No entanto, a morte da célula hospedeira não ocorre pelas vias clássicas, como a necrose ou apoptose. Os parasitos inibem a exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática da célula hospedeira impedindo que esta seja reconhecida como célula apoptótica e assim, seja fagocitada. Sem o reconhecimento pelas células fagocitárias, os merozoítos, após romperem a membrana do merosoma, são liberados na circulação para invasão dos eritrócitos iniciando o ciclo sangüíneo. A invasão dos eritrócitos pelos merozoítos é um evento que envolve a ligação entre receptores no merozoíto e ligantes nos eritrócitos (Waters et al., 1990). O desenvolvimento intra-eritrocítico do parasito se dá por esquizogonia, originando novos merozoítos que invadirão novos eritrócitos. Após algumas gerações de merozoítos sangüíneos, uma pequena proporção destes parasitos se diferencia em estágios sexuais, os gametócitos, que originarão esporozoítos no inseto vetor, após novo repasto sangüíneo. Ainda não se sabe ao certo qual o estímulo ou mensagem responsável pela sua produção a partir dos merozoítos ou esquizontes e existem duas hipóteses: a primeira sugere que os merozoítos já estão pré-determinados a evoluírem em formas assexuadas ou formas sexuadas antes de invadir a hemácia e a outra hipótese, ao contrário, sugere que fatores ambientais ou estresse determinam a diferenciação dos merozoítos em gametócitos (Dyer et al., 2000).

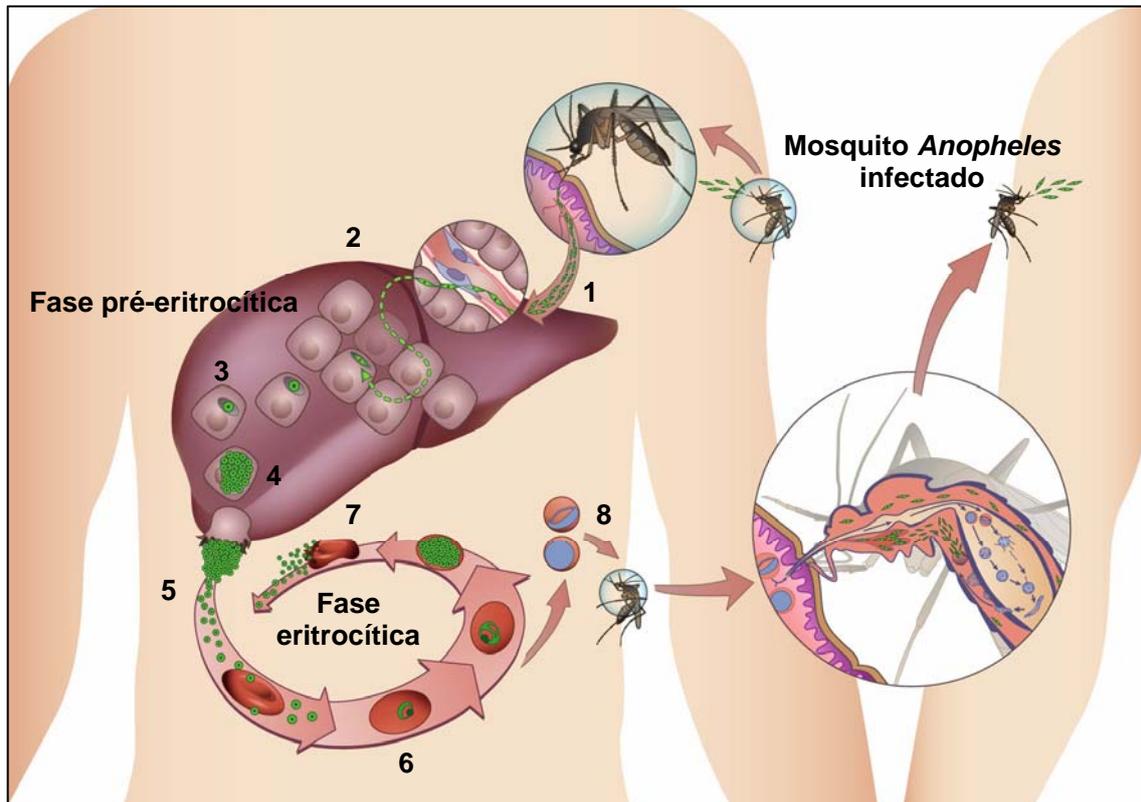


Figura 3: Ciclo dos plasmódios humanos (www.imm.ul.pt).

1.3 – Características do *Plasmodium vivax*

P. vivax é a espécie causadora de malária humana com maior distribuição geográfica, respondendo por cerca de 80 milhões de casos anuais (WHO, 2005). Cerca de 65% dos casos de malária causada por *P. vivax* ocorrem no sul asiático e no pacífico ocidental. A América do Sul responde por 12,5% do total, ou seja, cerca de oito milhões de casos. Isso representa aproximadamente 70% do total de infecções maláricas registradas nessa região. Essa espécie possui uma diversidade fenotípica extraordinária, sendo encontrada em uma variedade enorme de ecótopos, desde a Rússia até as regiões tropicais da Ásia, do Pacífico, e Américas Centrais e do Sul (Mendis et al., 2001). *P. vivax* é a maior responsável pela introdução de malária em áreas não endêmicas (Svenson et al., 1995).

A habilidade deste parasito de completar o seu ciclo esporogônico em temperaturas relativamente baixas (em torno de 16°C) tem contribuído substancialmente para o seu sucesso em estabelecer focos estáveis de

transmissão não só em zonas tropicais quanto em localidades de zonas temperadas (Cui et al., 2003).

Apesar de a malária causada por *P. vivax* ser considerada benigna, ou seja, raramente causa a morte do hospedeiro, a infecção é uma causa importante de morbidade e de perdas sócio-econômicas (Mendis et al., 2001). A sua presença tem uma forte correlação negativa com o crescimento econômico (Mendis et al., 2001). As mortes relacionadas a essa espécie são associadas a danos pulmonares e problemas respiratórios (Torres et al., 1997; Carlini et al., 1999), e também à ruptura do baço (Leclerc et al., 1989).

A infecção por *P. vivax* pode causar diversos sintomas como febre, calafrios, dor de cabeça, mialgia, náuseas, diarreia, vômitos e tosse (Oh et al., 2001). A febre, que pode atingir 40,5 °C é precedida, cerca de meia hora antes, por calafrios e sudorese (Karunaweera et al., 1992). Hepatomegalia e esplenomegalia também são achados comuns. Mais raramente, pode aparecer petéquias. As anormalidades hematológicas mais comuns são anemia (hemoglobina < 12g/dL), leucopenia (leucócitos < 4.000/μL) e plaquetopenia (contagem de plaquetas < 150.000/μL).

A plaquetopenia em pacientes com infecções maláricas, tanto por *P. vivax* quanto por *P. falciparum*, é uma característica comum. Em experimentos com macacos, foi visto que a queda na contagem das plaquetas é o primeiro distúrbio hematológico observado durante a infecção, antes mesmo da queda na contagem de eritrócitos (Contamin et al., 2000).

Uma característica particular do *P. vivax* é a sua capacidade de causar recaídas, ou seja, a ocorrência de ciclos pré-eritrocíticos e eritrocíticos devido à esquizogonia tardia de parasitos “dormentes” (hipnozoítos) no interior dos hepatócitos, gerando novamente os sintomas da malária. Este fenômeno biológico ainda não está totalmente elucidado, porém aparenta ser totalmente independente da resposta imune do hospedeiro infectado (Cogswell, 1992). Acredita-se que a recaída ocorra a partir da mesma população inoculada, ou seja, no curso do ciclo, parte dos esporozoítos continua o curso normal da infecção e parte transformar-se em hipnozoítos (Kirchgatter et al., 1998)

Diversos experimentos e estudos clínicos têm investigado as infecções causadas pelo *P. vivax* em diferentes regiões geográficas e climáticas e têm demonstrado diferenças nos padrões de recaídas. Cepas de

P. vivax originárias dos trópicos possuem a característica de causar a infecção primária num curto período após a picada infectante seguido por um curto período de latência antes da recaída (5-10 semanas). Cepas que circulam em zonas temperadas possuem período variável para o início das manifestações clínicas da primo-infecção seguido por um período longo de latência antes da recaída (5-10 meses). Assim, tem sido sugerido que o intervalo entre a primo-infecção e a recaída é cepa-dependente e é determinado por características genéticas dos esporozoítos (Craig & Kain, 1996).

Há duas hipóteses acerca da origem evolutiva desta espécie. A primeira acredita que esta espécie teria se originado na África, baseado no argumento da alta prevalência de indivíduos com falta do antígeno do grupo sanguíneo Duffy nas populações sub-saarianas (Livingstone, 1984; Carter & Mendis, 2002; Carter, 2003). A especificidade da interação Duffy-*P. vivax* sugere que essa espécie pode ter tido contato com populações humanas africanas, permitindo a fixação do alelo responsável pelo fenótipo FY*B^{ES} nesta população (Carter, 2003). Porém, visto que infecções causadas por esta espécie não exibem altos níveis de virulência, este não parece ser um fator evolutivo de grande impacto (Livingstone, 1984). A segunda hipótese defende que *P. vivax* possui origem no sudeste asiático junto com outros plasmódios parasitos de primatas não humanos (Garnham, 1966). O argumento foi baseado na abundância de parasitos causadores de malária em símios nesta região (comparado com a África) e na observação de que estes parasitos possuem características biológicas e morfológicas comuns ao *P. vivax* (Garnham, 1966; Carter & Mendis, 2002; Carter, 2003).

O *P. vivax* está filogeneticamente relacionado a outras espécies causadoras de malária humana, com exceção do *P. falciparum*, e com três espécies de *Plasmodium* causadoras de malária em primatas da Ásia, formando um grupo monofilético (Escalante et al., 2005), ou seja, todos eles evoluíram a partir de um ancestral comum. Estudos de variabilidade de microssatélites e repetições *in tandem* indicam que *P. vivax* tornou-se capaz de infectar humanos há apenas 10.000 anos aproximadamente, quando houve uma troca de hospedeiros (de primatas para humanos) (Leclerc et al., 2004), embora outros estudos baseados nos polimorfismos de dois genes nucleares e genes mitocondriais datam esse fato como ocorrido entre 45.000 e 81.000 anos

(Escalante et al., 2005, Mu et al., 2005), ou entre 217.000 e 304.000 anos atrás (Jongwutiwes et al., 2005). A razão para a discrepância entre esses dados pode estar relacionada às diferenças entre as amostras utilizadas. Portanto, foi realizada uma análise de todos os dados em conjunto o que sugere que os melhores resultados são aqueles descritos por Mu e colaboradores (2005) (Cornejo & Escalante, 2006).

P. vivax e *P. simium* são geneticamente semelhantes, então acredita-se que houve uma segunda troca de hospedeiros na América do Sul, onde *P. vivax* passaria a infectar primatas sul-americanos, surgindo então, a espécie *P. simium* (Escalante et al., 2005; Mu et al., 2005). Diversas espécies parasitas de gibões e orangotangos deveriam ser incluídas nas análises moleculares filogenéticas, pois poderiam ajudar no esclarecimento da origem dessa espécie (Cornejo & Escalante, 2006).

1.4 - Antígeno 1 de membrana Apical

A habilidade dos plasmódios em primeiro reconhecer e então invadir as células sangüíneas constitui o pivô do processo da doença, e as moléculas do parasito envolvidas no reconhecimento e invasão são, sem dúvida, consideradas alvos de imunização profilática (Mitchell et al., 2004). Para o parasito ter sucesso na invasão, ele deve expressar receptores de ligação no eritrócito, sofrer uma reorientação apical, formação de junção e então sinalizar para invasão com posterior formação do vacúolo derivado da membrana plasmática do eritrócito (Miller et al., 2002).

O contato inicial entre o merozoíto e o eritrócito é um passo crucial, já que o parasito deve distinguir entre aquelas células aptas a serem invadidas e outros tipos celulares (Cowman & Crabb, 2006). A superfície do merozoíto é envolvida por proteínas ancoradas via glicosilfosfatidilinositóis (GPI), como as MSPs (Proteínas de superfície de merozoítos), por proteínas de superfície de membranas e por proteínas das micronemas, como AMA-1 (Sanders et al., 2005). Diversas proteínas presentes nas diferentes fases evolutivas do parasito participam ativamente no processo de infecção envolvendo, portanto, receptores específicos. Essas proteínas constituem importantes alvos para compor possíveis vacinas antimaláricas. Dentre as moléculas da fase

eritrocítica, apresentam destaque a proteína de superfície de merozoíto - 1 (MSP-1) e o antígeno de membrana apical - 1 (AMA-1).

AMA-1 foi inicialmente descrita como uma proteína de 66-kDa em *Plasmodium knowlesi* (PK66) presente na fase tardia de formação dos esquizontes (Deans et al., 1982). Desde então, percebeu-se que esta proteína possuía um papel importante na invasão de eritrócitos, pois neste trabalho foi visto que anticorpos monoclonais inibiam a invasão *in vitro* dos esquizontes nos eritrócitos.

AMA-1 é uma proteína integral de membrana do tipo 1, altamente imunogênica (Peterson et al, 1989; Narum & Thomas, 1994; Galinski et al., 1996; Riley et al., 2000) presente em todas as espécies de *Plasmodium* já examinadas. Possui pelo menos 16 resíduos de cisteína, sendo que todos eles estão incorporados em oito pontes dissulfeto formando os três domínios da molécula, sendo que o domínio I (resíduos 43-248, 19 kDa) possui três pontes dissulfeto, o domínio II (resíduos 249-385, 13 kDa) possui duas e o domínio III (resíduos 386-487, 13 kDa) possui três, como pode ser visto na Figura 4 (Hodder et al., 1996; Pizarro et al., 2005). O domínio I é o mais polimórfico deles, seguido pelo domínio III (Polley et al., 2003). O domínio II, ao contrário

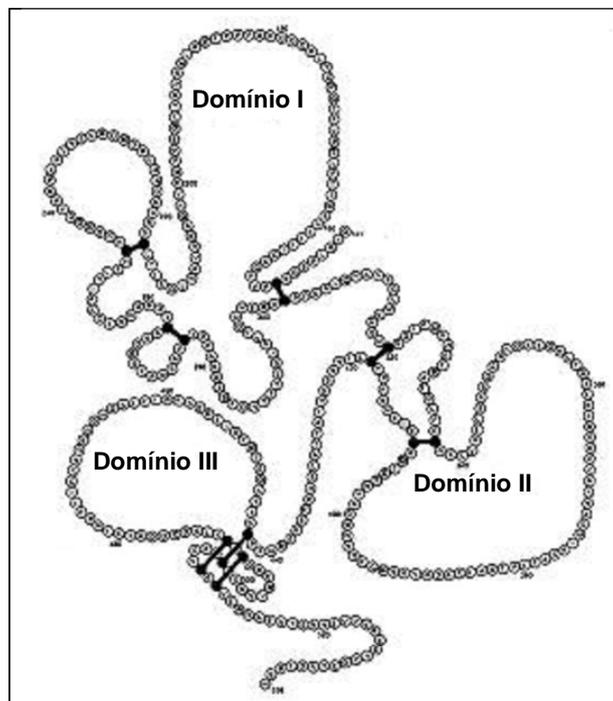


Figura 4: Antígeno de Membrana Apical 1 (AMA-1). Em destaque as oito pontes dissulfeto determinando os três domínios da proteína. Figura adaptada de Hodder et al., 1996

dos outros, é uma região relativamente conservada de AMA-1, e apresenta uma maior estabilidade com o domínio I do que com o domínio III, em função da estrutura da proteína (Feng et al., 2005). AMA-1 possui duas alças hidrofóbicas, uma próxima à região N terminal, a qual pode atuar como um peptídeo sinal, e a outra localizada a 55 aminoácidos do resíduo C terminal (Peterson et al., 1989). A proteína AMA-1 é sintetizada tardiamente durante as últimas quatro horas da fase eritrocítica (Crewther et al., 1990), quando os esquizontes já se apresentam maduros e segmentados (Narum & Thomas, 1994). Acreditava-se que esta proteína era expressa inicialmente como um precursor de vida curta de 80 kDa presente no complexo apical do merozoíto associado à parte mais eletrodensa das roptrias sendo proteoliticamente processada na porção N-terminal antes de translocar-se para a superfície dos merozoítos maduros em um fragmento de 62 kDa (Hodder, 1996, Anders et al., 1993, Crewther et al., 1990, Narum & Thomas, 1994). No entanto, foi comprovado que AMA-1 se localiza enquanto precursora de 80 kDa e mesmo já processada nos micronemas, e não nas roptrias, e que a proteína é translocada ao longo de microtúbulos durante o desenvolvimento do merozoíto até ser encontrada na sua membrana no momento da ruptura do esquizonte (Healer et al., 2004; Bannister et al., 2003). Segundo Narum & Thomas (1994), esta proteína ainda é presente nos estágios iniciais de trofozoítos, não sendo perdida durante a invasão, como inicialmente proposto pelo fato de não detectá-la em trofozoítos por imunofluorescência (Peterson et al., 1989). Foi visto que, pelo menos em *P. falciparum*, tanto o precursor quanto a molécula processada possuem o domínio transmembrana e citoplasmático não-modificados (Howell et al., 2001). Após a translocação para a superfície do merozoíto, a proteína é proteoliticamente clivada em um de dois sítios possíveis: entre os domínios II e III, ou em um sítio após o domínio III, próximo à membrana (Howell et al., 2001, Healer et al., 2004). Como resultado, a proteína permanece na superfície do merozoíto na forma de dois fragmentos, sendo que no caso de *P. falciparum*, possuem 44 e 48 kDa cada (Howell et al., 2001).

A proteína AMA-1 também é expressa em esporozoítos, e é perdida após a invasão dos hepatócitos, e anticorpos anti-AMA-1 inibem a invasão dos

esporozoítos, sugerindo que esta proteína também estaria envolvida no processo de invasão dos hepatócitos (Silvie et al., 2004).

A estrutura cristalizada do ectodomínio da proteína AMA-1 de *P. vivax* foi recentemente publicada (Pizarro et al., 2005), e compreende os resíduos Pro⁴³ a Leu⁴⁸⁷. O trabalho confirmou a divisão desta região em três domínios estruturais já citados anteriormente (Figura 5). Várias quebras ocorreram nas cadeias principais de todos os domínios como resultado da falta ou baixa densidade de elétrons; estas regiões correspondem a 15% da cadeia polipeptídica. Um fato interessante observado pelos autores foi que não havia eletrodensidade no segmento de 40 resíduos de aminoácidos (295-334) no domínio II, mostrando que esta região é desordenada ou possui mobilidade. Essa região foi determinada como o “loop” do domínio II. Comparando a estrutura de AMA-1 de *P. vivax* com outras estruturas tridimensionais conhecidas, os autores descobriram que os domínios I e II são estruturalmente semelhantes entre si, sugerindo que eles podem ter se originado a partir da duplicação dentro de um mesmo gene.

O gene que codifica AMA-1 é altamente conservado entre as espécies de *Plasmodium* que infectam roedores, macacos ou humanos (Cheng & Saul, 1994). O primeiro trabalho que afirmou que AMA-1 estava presente em todas

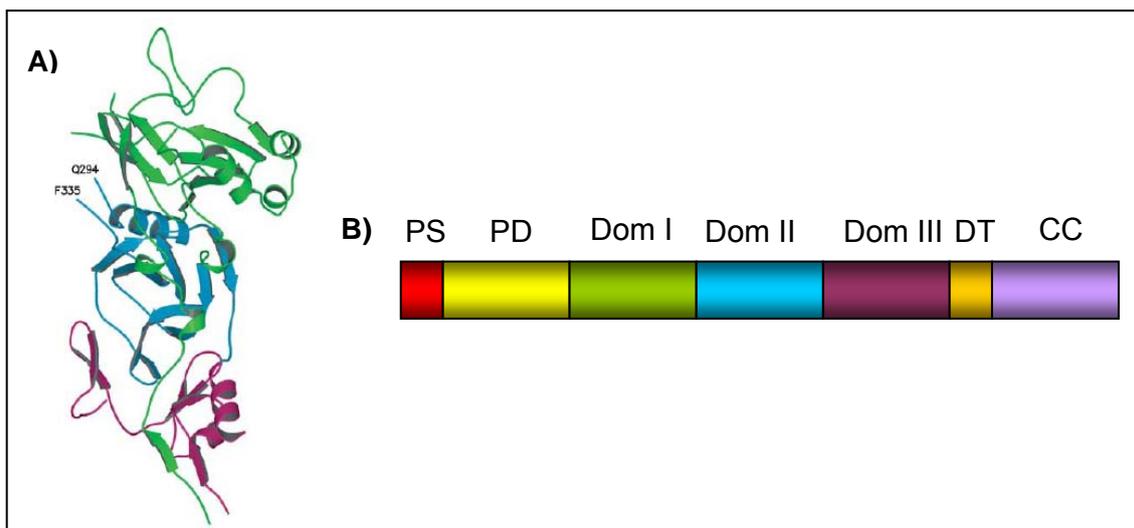


Figura 5: Antígeno de Membrana Apical 1. A) Estrutura terciária da proteína PvAMA-1: verde = domínio I, azul = domínio II e violeta = domínio III. Figura extraída de Pizarro et al., 2005. B) Esquema do Antígeno de Membrana Apical 1: PS = Peptídeo sinal, PD = Pró-domínio, Dom I = Domínio I, Dom II = Domínio II, Dom III = Domínio III, DT = Domínio transmembrana e CC = Cauda citoplasmática. Figura adaptada de Hodder et al., 1996

as espécies de *Plasmodium* já analisadas foi o publicado por Waters e colaboradores (1990), onde um experimento de hibridização de DNA mostrou que existiam seqüências altamente semelhantes em todas as espécies de plasmódios de símios testadas (*Plasmodium fragile*, *Plasmodium cynomolgi*, *P. knowlesi*, *Plasmodium inui*) e em *P. vivax*. Em *P. falciparum* e *P. berghei*, a presença de AMA-1 foi demonstrada por imunofluorescência (Waters et al., 1990). Além disso, tentativas de silenciar o gene AMA-1 de *P. falciparum* (*PfAMA-1*) com plasmídeos nocautes (contendo o gene rompido) falharam, não ocorrendo crescimento de culturas transfectadas, indicando que o silenciamento desse gene é deletério para o crescimento do parasito na fase eritrocítica do ciclo (Triglia et al., 2000). Estes fatos sugerem que AMA-1 seja essencial para a biologia e sobrevivência do parasito. Também já foram vistas proteínas homólogas a AMA-1 em outros organismos pertencentes ao Filo Apicomplexa, incluindo *Toxoplasma* (Hehl et al., 2000) e *Babesia* (Gaffar et al., 2004). Assim, ocorre limitada diversidade deste gene, apesar de ocorrerem mutações pontuais em vários alelos, com algumas mudanças de aminoácidos (Marshall et al., 1996; Thomas et al., 1990).

Estudos recentes propõem que AMA-1 possui um papel no início do processo de invasão do eritrócito, e pode ser diretamente responsável pela reorientação do complexo apical do merozoíto ao encontrar um eritrócito, ou esta molécula pode iniciar o contato entre o parasito e o eritrócito, ação dependente da ligação de proteínas Duffy (Mitchell et al., 2004). Foi demonstrado que o domínio III de AMA-1 se liga à proteína Kx de membrana de eritrócito, e em experimentos com eritrócitos sem expressão desta proteína, foi visto que a taxa de invasão pelo parasito foi menor, indicando um papel significativo, porém não exclusivo de AMA-1 no processo de invasão (Kato et al., 2005). Em 1990, Waters e colaboradores anteciparam um papel para PK66 (proteína de *P. knowlesi* de 66kDa, homóloga a AMA-1) no processo de reorientação do parasito na superfície dos eritrócitos.

Anticorpos anti-AMA-1 podem inibir a invasão do merozoíto *in vitro* (Hodder et al., 2001) e proteger contra os efeitos da doença em infecções experimentais em *P. knowlesi* (Deans et al., 1982; Thomas et al., 1984; Deans et al., 1988), *Plasmodium chabaudi* (Anders et al., 1998), *P. yoelli* (Narum et al.,

2000) e *P. falciparum* (Stowers et al., 2002; Kocken et al., 2002). Além disso, Triglia e colaboradores (2000) sugerem que anticorpos anti-AMA-1 inibem a invasão dos eritrócitos pelos merozoítos. A resposta imune protetora contra AMA-1 é altamente direcionada para os epitopos conformacionais dependentes das pontes dissulfeto (Anders et al., 1998). O domínio I polimórfico é considerado o principal alvo da resposta protetora mediada por anticorpos (Hodder et al., 2001). No entanto, há evidências, pelo menos em *P. falciparum*, que epitopos do domínio III são alvos importantes para anticorpos inibitórios em humanos (Nair et al., 2002). O domínio II apesar de conservado também pode ser alvo de respostas protetoras via anticorpos (Feng et al., 2005).

Foi visto que em *P. falciparum* que os polimorfismos ocorrem ao longo da região codificante da proteína, principalmente dentro do ectodomínio, em regiões definidas da molécula, indicando que AMA-1 está sobre uma seleção diversificadora positiva, resultado da pressão do sistema imune (Marshall et al., 1996; Oliveira et al., 1996). Além disso, esses polimorfismos são os principais responsáveis pela evasão da resposta imune pelo parasito (Healer et al., 2004). Acredita-se que os polimorfismos presentes em regiões não-repetitivas podem estar envolvidos no escape do reconhecimento por células T que possuem um papel crucial na imunidade contra a malária, tanto pela regulação da produção de anticorpos quanto por mediar a imunidade celular dependente de anticorpos (Verra & Hughes, 2000). E este é o ponto crítico da imunidade contra a malária, pois a resposta imune do hospedeiro a uma variante alélica é pouco efetiva contra parasitos que expressam diferentes formas alélicas em um único locus (Crewther et al., 1996; Renia et al., 1997).

A caracterização de ortólogos de AMA-1 de espécies de *Plasmodium* incluindo *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. chabaudi*, *P. knowlesi*, *P. cynomolgi*, *P. fragile* e *P. reichenowi* tem demonstrado que AMA-1 é uma molécula pouco polimórfica com várias características estruturais conservadas presentes em todos os ortólogos descritos (Dutta et al., 1995; Kocken et al., 2000). A comparação entre todas as seqüências de aminoácidos conhecidas de homólogos de AMA-1 mostrou mais de 50% de identidade entre elas, com pelo menos 16 resíduos de cisteína conservados em todas as seqüências (Marshall et al., 1989; Peterson et al., 1990; Waters et al., 1990; Cheng & Saul, 1994; Dutta et al., 1995; Marshall et al., 1996). Em todos os casos onde as

seqüências de AMA-1 de diferentes isolados de uma mesma espécie foram analisadas, existem regiões do gene onde várias substituições de base ocorrem. O domínio I contém 58% de todos os sítios onde ocorrem substituições de aminoácidos que se localizam principalmente entre o primeiro e terceiro resíduo de cisteína (Hodder et al., 1996). Isso sugere que esta região consiste no maior alvo da resposta imune (Verra & Hughes, 2000).

Em *P. falciparum* a análise de todas as seqüências de *PfAMA-1* revelaram pelo menos 68 sítios polimórficos, sendo que apenas 6 dessas substituições foram sinônimas, e que elas ocorrem em sua maioria entre o primeiro e oitavo resíduo de cisteína (Marshall et al., 1996; Gupta et al., 2005). Isso sugere que AMA-1 é um alvo importante para a imunidade naturalmente adquirida, e que esta imunidade é cepa-específica, como já foi observado em experimentos com *P. chabaudi* e *P. berghei* (Crewther et al., 1996, Kappe et al., 1996, respectivamente) e em experimentos *in vitro* realizados com *P. falciparum* (Hodder et al., 2001). Um estudo bastante interessante realizado com *P. falciparum* mostrou que certas substituições de nucleotídeos em determinados sítios do domínio I estão diretamente associados à morbidade da doença, ou seja, o perfil de polimorfismo apresentado pelos pacientes assintomáticos diferiu significativamente do perfil apresentado pelos pacientes sintomáticos. Acredita-se que determinados resíduos são capazes de diminuir a imunogenicidade de AMA-1, sendo necessário um tempo maior de exposição para o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva (Cortés et al., 2003).

1.4.1 – Estudos de polimorfismo no gene AMA-1 de *Plasmodium vivax* (*PvAMA1*)

A primeira análise de seqüências de AMA-1 de *P. vivax* foi realizada por Cheng & Saul, em 1994 utilizando dois isolados que hoje consistem em seqüências de referência para análises filogenéticas (PH84 e PVQ) e outros seis isolados asiáticos. Após o seqüenciamento e posterior análise, foi visto que a região codificadora de AMA-1 em *P. vivax* possui 1686 pb de nucleotídeos com 56% de conteúdo A+T, que gera uma proteína de 562 aminoácidos. A comparação entre essas seqüências mostrou polimorfismo limitado, diferindo em 12 bases simples e resultando em nove substituições de

aminoácidos, sendo que a maioria destas substituições está presente na região entre 300-700 pb (Cheng & Saul 1994).

Na maioria dos genes codificadores de proteínas, a taxa de substituições sinônimas (quando não há mudança de aminoácidos) é bem maior que a taxa de substituições não-sinônimas (quando ocorre alteração de aminoácidos), uma condição conhecida como seleção purificadora (Verra & Hughes, 2000). O padrão oposto presente em AMA-1 é mais um indicativo de que há uma pressão seletiva nos epitopos para reconhecimento dos anticorpos, gerando uma seleção diversificadora positiva (Hughes & Nei, 1988; Verra & Hughes, 2000). Outra hipótese é que há uma maior seleção contra mutações sinônimas nesta proteína em função da necessidade de formar corretamente as pontes de dissulfeto (Hodder et al., 1996). Ao contrário de *P. falciparum*, que contém em sua seqüência 16 resíduos de cisteína conservados, no gene AMA-1 de *P. vivax* (*PvAMA-1*) são encontrados 19 resíduos (Cheng & Saul, 1994), sendo todos eles encontrados no ectodomínio da molécula (Hodder et al., 1996).

A maior análise molecular de *PvAMA-1* já realizada inclui 219 seqüências provenientes de isolados das Filipinas (Morong, Palawan e Agusan del Sur), China, Índia, Indonésia, Papua Nova Guiné, Ilhas Salomão, Vanuatu e África (Figtree et al., 2000). Neste estudo, foram identificados 69 haplótipos diferentes, com 22 sítios polimórficos e 65 substituições de aminoácidos. Muitos destes haplótipos são exclusivos de isolados particulares a cada local avaliado, não sendo encontrados em outras áreas.

Dois anos após este estudo, foi realizada uma análise de 22 seqüências provenientes da Coréia do Sul numa tentativa de se determinar a origem das populações de *P. vivax* causadoras dos casos re-emergentes de malária naquela região (Han et al., 2002). Após a análise das seqüências, foram identificados dois haplótipos, com 13 sítios de mutação. Estes haplótipos são similares a dois isolados chineses, CH-10A e CH-05A anteriormente descritos por Figtree e colaboradores (2000). Essas evidências permitiram a inferência de que o leste asiático constitui a provável origem das populações de *P. vivax* re-emergentes. Conclusão semelhante foi verificada em trabalho posterior o qual analisou mais de 30 seqüências de *PvAMA-1* provenientes de pacientes da Coréia do Sul (Chung et al., 2003).

O primeiro e único trabalho até o momento realizado no Brasil apresentou 20 seqüências do domínio I de *PvAMA-1* de isolados provenientes dos estados do Pará, Amapá e Rondônia (Rodrigues et al., 2005). Os autores encontraram 13 sítios polimórficos e oito haplótipos, utilizando como parâmetro a seqüência do isolado PH-84 (Anexo I), e relacionaram esses polimorfismos à resposta imune específica dirigida a proteínas recombinantes que representam o ectodomínio de *PvAMA-1*.

2. JUSTIFICATIVA

Estudos da diversidade populacional dos parasitos causadores da malária apresentam grande significado prático para o desenvolvimento de possíveis estratégias de controle da doença (Cui, 2003) como, por exemplo, o desenvolvimento de uma vacina antimalárica. A caracterização de genes responsáveis pela resistência de *P. falciparum* e mesmo *P. vivax* a antimaláricos também constitui uma abordagem atual que depende de conhecimentos acerca da diversidade genética de populações naturais do parasito.

O antígeno 1 de membrana apical (AMA-1) é uma proteína integral de membrana do tipo 1 apresentando-se bastante imunogênica (Peterson *et al.*, 1989; Narum & Thomas, 1994; Galinski *et al.*, 1996; Riley *et al.*, 2000) e está presente em todas as espécies de *Plasmodium* já examinadas. Esta proteína possui um papel relevante no processo de invasão do eritrócito por merozoítos, podendo ser diretamente responsável pela reorientação do parasito (Mitchell *et al.*, 2004). Além disso, esta molécula pode iniciar o contato entre o parasito e o eritrócito, ação dependente da ligação de proteínas Duffy (Mitchell *et al.*, 2004). O gene que codifica AMA-1 é altamente conservado entre as espécies de *Plasmodium* que infectam roedores, macacos e humanos (Cheng & Saul, 1994), porém exibe diversidade alélica.

Trabalhos sobre a diversidade gênica de AMA-1 de *P. vivax* já foram publicados, porém há uma escassez de trabalhos realizados na América Latina, em especial no Brasil. Considerando que o *P. vivax* possui ampla distribuição no mundo sendo o maior responsável pelos casos de malária na América Latina, Ásia e Oceania e que no Brasil esta espécie é responsável por aproximadamente 80% dos casos notificados, torna-se de extrema relevância o estudo da diversidade genética desta importante molécula em isolados naturais brasileiros.

A associação entre resíduos polimórficos da proteína AMA-1 de *P. falciparum* e aspectos da morbidade já foi vista (Cortés *et al.*, 2003). Considerando que a proteína AMA-1 é bastante imunogênica, e que polimorfismos presentes no seu ectodomínio podem estar associados a aspectos da morbidade, é justificável a investigação da possível existência de

associação entre polimorfismos do gene *PvAMA-1* e aspectos clínicos da malária causada por *P. vivax*.

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral:

Caracterizar o domínio I do gene *PvAMA-1* em isolados de *P. vivax* oriundos de pacientes provenientes de diferentes áreas endêmicas para malária na Amazônia Brasileira.

3.2 - Objetivos específicos

- Amplificar por PCR o domínio I da proteína AMA-1 em populações de *P. vivax* originárias de infecções naturais de pacientes de área endêmica brasileira.
- Seqüenciar o domínio I do gene *PvAMA-1*, a partir dos produtos amplificados.
- Comparar os polimorfismos das seqüências dos isolados brasileiros com os depositados no banco de dados GenBank™.
- Realizar análises intrapopulacionais e interpopulacionais a partir das seqüências obtidas e analisadas.
- Correlacionar os polimorfismos encontrados nas amostras brasileiras com o grau de parasitemia e a contagem do número de plaquetas em pacientes infectados por *P. vivax*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1– População de estudo:

No presente estudo foram avaliadas três populações distintas, que somam 233 amostras de sangue obtidas de 193 pacientes diagnosticados para malária. A seguir, serão apresentadas as populações de estudo agrupadas de acordo com as duas localidades avaliadas.

4.1.1 – População de Cuiabá

A população de Cuiabá é composta por pacientes residentes no município de Cuiabá, estado de Mato Grosso, onde não ocorre transmissão ativa da doença. Estes indivíduos adultos, na sua maioria do sexo masculino (80%), adquiriram malária em diferentes áreas de transmissão localizadas em diferentes estados amazônicos brasileiros (Figura 6). Os pacientes, ao procurarem o serviço de pronto-atendimento do ambulatório do Hospital Júlio Müller da Universidade Federal de Mato Grosso, foram atendidos e um exame clínico minucioso com atenção especial para os aparelhos cardiovascular e respiratório foi realizado, além de serem avaliados a palidez da mucosa, a icterícia e foi realizada a palpação esplênica. Confirmaram-se, assim, os casos de malária importada. Foi aplicado um questionário padrão (anexo II) contendo informações sobre dados pessoais do paciente como idade, naturalidade, sexo (caso a pessoa seja do sexo feminino, se gestante), cor, estado civil, escolaridade, ocupação principal, e informações relacionadas a malária como o resultado da gota-espessa, parasitemia (expresso em número de parasitos/ μ L sangue), contagem de plaquetas, história migracional, duração e caracterização dos sintomas. Todos os pacientes foram tratados de acordo com a política nacional de tratamento da malária no Brasil conforme preconizado no Manual de Terapêutica da Malária (Ministério da Saúde, 2001).

De cada paciente foram coletados 5 mL de sangue de veia cubital, em tubos vacutainer com EDTA. Imediatamente após a retirada do sangue o tubo foi mantido em geladeira a 4° C, até o momento da extração do DNA.

Cento e oitenta e três amostras provenientes de 143 pacientes foram colhidas entre maio de 2001 e janeiro de 2006. As infecções foram adquiridas nos Estados do Acre (AC), Amazonas (AM), Mato Grosso (MT), Pará (PA), Rondônia (RO) e Roraima (RR). Dos 143 pacientes, 113 possuíam apenas uma amostra coletada em um único período apresentando, portanto, um único registro no banco de dados do ambulatório do Hospital Júlio Müller. Os 30 pacientes restantes possuíam entre duas a cinco amostras coletadas em épocas diferentes, o que implicou em retorno ao ambulatório do Hospital Júlio Müller, indicando, portanto, a ocorrência de possíveis recaídas ou reinfecções. Esses 30 pacientes respondem por 70 amostras.

De acordo com o exame da gota-espessa, *P. vivax* foi diagnosticado em 72,5%, enquanto *P. falciparum* foi diagnosticado em 20,0%. Infecções mistas foram diagnosticadas em 7,5% dos pacientes. Aproximadamente 35% dos pacientes apresentaram baixas parasitemias (até 500 parasitos/ μ L), enquanto 33% apresentaram parasitemias moderadas (até 2.000 parasitos/ μ L) e 32% apresentaram altas parasitemias (acima de 2.000 parasitos/ μ L).

4.1.2 – População de Apiacás

A segunda população estudada é composta por 50 garimpeiros residentes no Garimpo Satélite, Município de Apiacás, Mato Grosso. Este município está localizado a aproximadamente 1.000km da capital Cuiabá no extremo norte do estado, na divisa dos estados do Pará e Amazonas (Figura 6). Estes indivíduos compõem parte de um estudo epidemiológico tipo corte transversal conduzido no ano de 1996 pelo Dr. Cor Jesus Fernandes Fontes, UFMT (Fontes, 2001), onde foram avaliados um total 531 garimpeiros. As etapas de coleta de dados e acompanhamento clínico foram realizadas exclusivamente pelo Dr. C.J.F.Fontes.

Durante a coleta de dados todos os pacientes foram entrevistados com o auxílio de um questionário clínico-epidemiológico que abordava dados demográficos, histórico de migração, de exposição à malária, bem como sintomas clínicos apresentados pelos pacientes. Foram confeccionadas gotas espessas com o sangue colhido de cada indivíduo e coletado sangue em papéis filtro para armazenamento das amostras.

O diagnóstico molecular realizado nestas amostras se baseou na amplificação do gene 18S rRNA conforme padronização prévia realizada por nosso grupo (Scopel et al., 2004). Somente as amostras positivas para *P. vivax* foram selecionadas para o presente estudo.

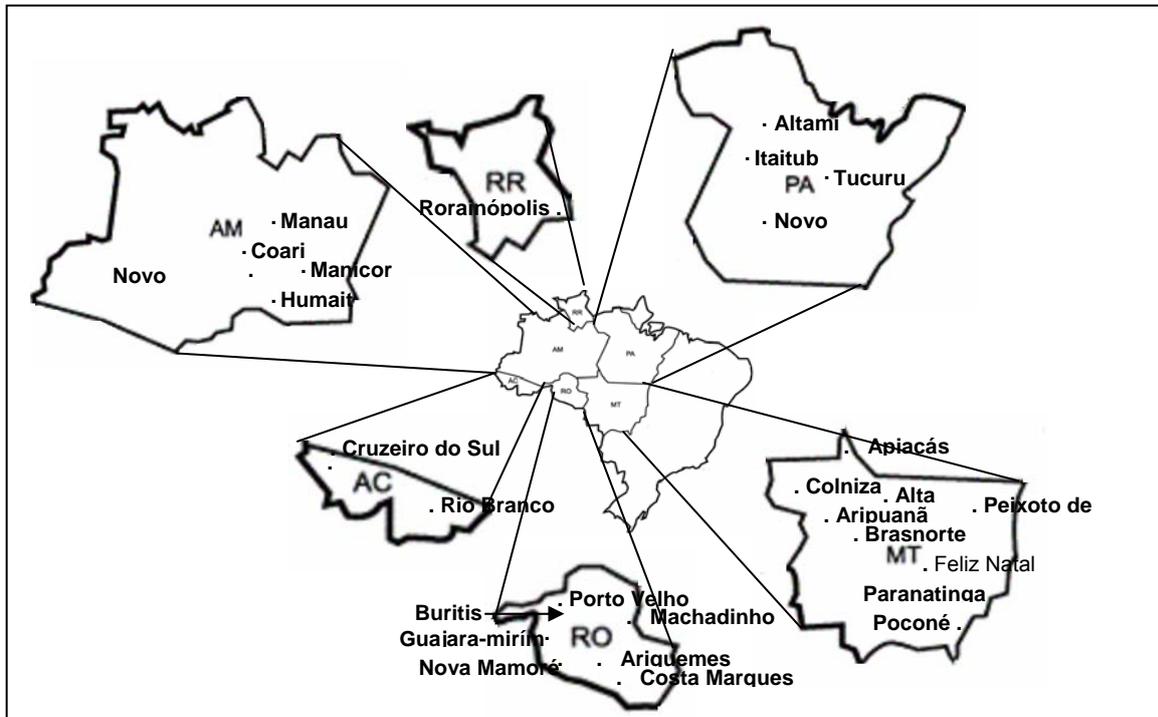


Figura 6: Mapa do Brasil evidenciando a procedência das amostras de sangue coletadas no HJM ou no Garimpo Satélite em Apicás, MT.

4.2 - Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada diretamente a partir de amostras de sangue conservadas em guanidina 4M, seguindo o protocolo de extração a partir de 300µL de sangue total descrito no kit Genomic DNA Purification Kit, da Puregene®, EUA. Para a lise celular, 300µL de sangue foram adicionados a um tubo de microcentrífuga (1,5mL) contendo 900µL de Solução de Lise de eritrócitos. As amostras foram incubadas por um min a temperatura ambiente, invertendo-se gentilmente os tubos por 10 vezes. Após 20 seg de centrifugação a 16.000 g o sobrenadante foi removido deixando no tubo um sedimento celular com aproximadamente 10-20µL de líquido residual. Os tubos foram levados ao vórtex por 10 seg para ressuspensão das células. Foram adicionados em cada

tubo 300µL de Solução de Lise Celular. Após a lise, 100µL de Solução de Precipitação Protéica foram adicionados a cada tubo. Novamente, os tubos foram levados ao vórtex por 20 seg para misturar a solução uniformemente com o lisado celular. Seguiu-se à centrifugação (16.000 g) por 1 min para obtenção de um sedimento que foi descartado. O sobrenadante de aproximadamente 400 µL contendo o DNA foi transferido para um novo tubo de microcentrifuga (1,5 mL) contendo 300µL de isopropanol 100% (2-propanol). Os tubos foram invertidos gentilmente 50 vezes. As amostras foram centrifugadas por 1 min a 16.000 g. O sobrenadante foi descartado e 300µL de etanol 70% foram adicionados, invertendo-se os tubos várias vezes para lavar o sedimento de DNA. As amostras foram centrifugadas por um min a 16.000 g. Os tubos foram invertidos e secados em um papel absorvente por cinco seg. O último passo foi a solubilização do DNA: 100µL de Solução de Solubilização de DNA foram adicionados aos tubos que foram levados ao vórtex por cinco seg e incubados a 65°C por cinco min. Novamente, os tubos foram levados ao vórtex por cinco seg, sendo estocados a 4°C.

4.3 – Amplificações do DNA

4.3.1 - Amplificação do gene codificador da proteína AMA-1 de *P. vivax*

Para a amplificação do gene da proteína AMA-1 de *P. vivax*, foram realizadas *nested* PCRs, segundo protocolo descrito por Cheng & Saul (1994).

A primeira reação consiste da adição de 0,2 pmoles dos iniciadores PvAR11 (5'-TCC TAA ATT TTT ACG GGG GCA-3') e PvAF11 (5'-AGA ATT CCA GCT CCA AGA TG-3'), 0,2mM de dNTPs, 5,0 µL de tampão *Taq* Promega® - Madison, USA – 1X, MgCl₂ 1,5mM, 1,25U de *Taq* polimerase Promega® - Madison, USA, e 5,0µL (aproximadamente 100 ng) de DNA, totalizando 50µL de mix. Em termociclador, as amostras passaram por um ciclo inicial de 95 °C por cinco min, e em seguida por dois ciclos de 95°C por 30 seg, 45°C por 50 seg e 72°C por 40 seg, seguidos por mais 33 ciclos de 95°C por 30 seg , 55°C por 50 seg e 72°C por 40 seg. A reação foi então finalizada com 10 min a 72 °C.

Para a segunda reação, 0,26 pmoles dos iniciadores PvAR11 (5'- TCC TAA ATT TTT ACG GGG GCA -3') e PvAF05 (5'-GTA TCG TCA TAG AGA ATT CCG-3'), 0,2mM de dNTPs, 5,0 µL de tampão *Taq* Promega® - Madison, USA – 1X, MgCl₂ 1,5mM, 1,25U de *Taq* polimerase Promega® - Madison, USA, e 2,0µL do produto de mix da primeira reação foram adicionados, totalizando 50µL de mix. Para a segunda reação, as condições de amplificação foram semelhantes aquelas descritas anteriormente: um ciclo inicial de 95 °C por cinco min, dois ciclos de 95°C por 30 seg, 45°C por 50 seg e 72°C por 40 seg, seguidos por 23 ciclos de 95°C por 30 seg, 55°C por 50 seg e 72°C por 40 seg. Da mesma forma, a reação foi finalizada por uma extensão por 10 min a 72°C. Os fragmentos amplificados apresentaram aproximadamente 400 pb, e representam a domínio I da região codificadora da proteína, que se localiza entre os nucleotídeos 320 e 738.

Um controle positivo (DNA extraído de pacientes infectados com *P. vivax*) e dois controles negativos (DNA extraído de indivíduos livres de infecção por qualquer espécie de *Plasmodium* e mix da reação de PCR sem acréscimo de DNA) foram incluídos em cada experimento. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de poliacrilamida 6%, tampão TBE 1X, corrido a 140 volts por aproximadamente 2 horas. O gel de poliacrilamida foi fixado em solução de álcool etílico 10% e ácido acético 0,5%, corado em solução de nitrato de prata e os fragmentos de aproximadamente 100pb foram evidenciados em solução reveladora de hidróxido de sódio e formaldeído (Sanguinetti et al., 1994).

4.3.2 – Amplificação do gene 18S rRNA de plasmódios

A fim de confirmar a presença de *P. vivax* como espécie determinante das infecções, uma *nested* PCR foi realizada segundo protocolo inicialmente descrito por Kimura e colaboradores (1997) e modificado por Scopel e colaboradores (2004). A primeira reação é gênero-específica e a segunda, espécie específica. A primeira reação consiste em um volume final de 25 µL de solução contendo 10 pmoles do iniciador P1 (5'-ACG ATC AGA TAC CGT CGT AAT CTT-3'), 10 pmoles do iniciador P2 (5'-GAA CCC AAA GAC TTT GAT TTC TCA T-3') (Kimura et al., 1997), 125 µM de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP e

dTTP), 2,5 µL de tampão *Taq* Promega® - Madison, USA – 1X, MgCl₂ 1,5mM, 1,25 unidade de *Taq* polimerase Promega® - Madison, USA e 5 µL de DNA. A amplificação consiste de um ciclo de 92 °C por dois min, 35 ciclos de 92 °C por 30 seg e 60 °C por 90 seg, e 60 °C por cinco min. O produto de amplificação obtido contém aproximadamente 130 pb. Os produtos finais desta reação foram diluídos 40X em água estéril.

A segunda reação contém as mesmas condições da primeira, exceto pelos iniciadores que permitem o diagnóstico molecular específico, acrescidos de 5 µL de DNA diluído 40X. Todas as reações utilizaram o iniciador P1 e outro, espécie-específico. Para amplificação específica de *P. falciparum* foi utilizado o iniciador PF (5'-CAA TCT AAA AAG TCA CCT CGA AAG ATG-3'). Para diagnosticar infecções por *P. vivax*, o iniciador utilizado foi o PV (5'-CAA TCT AAG AAT AAA CTC CGA AGA GAA A-3'). E finalmente, para *P. malariae*,

o iniciador utilizado foi o PM (5'-GGA AGC TAT CTA AAA GAA ACA CTC ATA T-3'). A amplificação é constituída por um ciclo de 92 °C por dois min, 18 ciclos de 92 °C por 30 seg e 60 °C por 90 seg, seguidos por cinco min a 60 °C. O fragmento obtido contém aproximadamente 100pb.

Em todas as reações foram utilizados dois controles negativos (mix da PCR sem acréscimo de DNA e DNA de indivíduos livres de infecção) e três controles positivos (para cada espécie de *Plasmodium*) a fim de detectar falhas no processo de realização da técnica de PCR e/ou contaminações. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de poliacrilamida 6%, e corados pela prata.

4.4 – Seqüenciamento do gene *PvAMA-1*

O gene *PVAMA-1* foi seqüenciado a partir do produto de PCR de AMA-1. Para a purificação do produto de PCR, foi utilizado o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, da Amersham Biosciences®, NJ, USA e um protocolo utilizando PEG 8.000 20%. Para cada purificação com o kit, uma coluna GFX foi inserida num tubo coletor onde 500 µL de tampão de captura foram adicionados. O produto de PCR foi transferido para a coluna GFX, evitando transferir óleo mineral. Os tubos foram centrifugados a 16.000 g por

30 seg. A coluna GFX foi retirada e o tubo coletor, esvaziado. A coluna GFX foi recolocada no tubo coletor e foram adicionados 500 µL de tampão de lavagem. Novamente os tubos foram levados à centrífuga por 30 seg a 16.000 g. Os tubos coletores foram descartados e as colunas GFX, recolocadas em tubos de microcentrífuga (1,5 mL). Cinquenta microlitros de água bidestilada estéril foram adicionados na coluna GFX. As amostras foram então incubadas à temperatura ambiente por 1 min, e logo após, centrifugadas à velocidade máxima (16.000 g), também por 1 min.

As amostras purificadas com o PEG 8.000 seguiram o seguinte protocolo: foi adicionado PEG 8.000 20% nos tubos de microcentrífuga (com o produto de PCR) em volume idêntico ao do produto de PCR. As duas soluções foram misturadas no agitador. Os tubos foram levados à centrífuga apenas para que o volume aderido à parede do tubo retornasse para o fundo. Os tubos permaneceram em banho-maria a 37°C por 15 min. Logo após, foram centrifugados em centrífuga refrigerada a 4°C por 15 min a 15.000 g. Essa etapa teve como objetivo a precipitação do DNA. Os sobrenadantes foram então retirados e 125 µL de etanol 70% foram adicionados. Os tubos foram novamente centrifugados a 4°C por 15 min a 15.000 g. Os sobrenadantes foram novamente retirados e os tubos foram deixados na estufa para secarem. Após secos, acrescentou-se H₂O destilada (mesmo volume do produto de PCR inicial).

As amostras purificadas foram analisadas em gel de agarose 1% a fim de se determinar a concentração de DNA. Duas misturas de PCR contendo 4 µL de Mix para reação de seqüenciamento (Dyynamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit for MegaBace DNA Analysis Systems), 0,26 pmoles do iniciador PvAf05 (5'-GTA TCG TCA TAG AGA ATT CCG-3') (primeira mistura) ou PvAR11 (5'-TCC TAA ATT TTT ACG GGG GCA-3') (segunda mistura) e 5 µL do produto de PCR purificado, totalizando 10 µL, foram utilizadas para a reação de seqüenciamento. Assim, para cada amostra, obtivemos a seqüência "Reverse" (iniciador PVAR11) e a seqüência "Foward" (iniciador PVAF05).

Uma etapa fundamental antes de injetar as amostras no MegaBACE é eliminar os nucleotídeos marcados não incorporados nas seqüências. Para isso, seguimos o protocolo fornecido pelo kit de Seqüenciamento (Dydynamic

ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit for MegaBACE DNA Analysis Systems) com algumas modificações. Para cada amostra, 1 µL de acetado de amônia (componente do kit) e 2,5 volumes de etanol absoluto foram acrescentados. A placa de 96 poços foi agitada rigorosamente e depois permaneceu por 20 min a temperatura ambiente, envolta em papel alumínio para evitar ação da luminosidade. Depois desse período, a placa foi centrifugada por 45 min a 5.000 g. O sobrenadante foi descartado por inversão da placa. Foram acrescentados, em cada poço, 150 µL de etanol 70%. A placa foi novamente centrifugada por 15 min a 5.000 g. O sobrenadante foi descartado (por inversão da placa) e a placa deixada a temperatura ambiente por 10 min, envolta no papel alumínio, para secagem dos poços. A última solução acrescentada foi o tampão “loading” (componente do kit), em um volume de 10 µL por amostra. A placa foi agitada rigorosamente e então, rapidamente centrifugada. A placa foi então, injetada no MegaBACE. As amostras foram seqüenciadas pelo menos duas vezes, sempre a partir de uma nova purificação de um novo produto de amplificação de PCR.

As amostras, após terem sido seqüenciadas, foram inicialmente analisadas por três programas: Phred (Ewing et al., 1998), Phrap (Green, 1998), e Consed (Gordon et al., 1998). O software Phred é usado para o *base-calling*, ou seja, interpretação do cromatograma, geração da seqüência e determinação do valor de qualidade de cada base. As seqüências foram então processadas pelo software Phrap, que calcula a seqüência consenso a partir das duas seqüências geradas pelo par de iniciadores utilizados: PVA05 e PVAR11. O programa Consed é uma ferramenta para visualizar, editar e finalizar as seqüências criadas pelo Phrap.

4.5 – Associação entre polimorfismos e aspectos da morbidade

Os aspectos de morbidade selecionados para este estudo foram o grau de parasitemia e a contagem de plaquetas. As amostras selecionadas foram aquelas oriundas dos pacientes da população de Cuiabá cujas amostras de sangue foram colhidas entre agosto de 2004 a janeiro de 2006, quando

passou-se a incluir a contagem de plaquetas como informação relevante na ficha médica de cada paciente.

Os pacientes foram divididos em grupos de acordo com a parasitemia e níveis de plaquetas. Parasitemias baixas foram aquelas com número de parasitos igual ou inferior a 530/μL de sangue. Este valor foi obtido com base no percentil 25% da amostra analisada. Dessa forma, 14 pacientes apresentaram parasitemias ≤ 530 parasitos/μL (média de idade de $40,1 \pm 15,9$ anos) e 42 pacientes com parasitemias acima de 530 parasitos/μL (média de idade de $36,7 \pm 13,4$ anos). Com relação ao número de plaquetas avaliado por contagem automática de células sanguíneas (ABX Pentra 90, Horiba Diagnostics, Kyoto, Japão), os pacientes foram classificados em dois grupos: (a) 32 pacientes plaquetopênicos (média de idade de $35,5 \pm 15,6$ anos) que apresentaram níveis de plaquetas inferiores a 150.000 plaquetas/μL e (b) 22 indivíduos com níveis de plaquetas superiores a 150.000 plaquetas/μL (média de idade de $39,1 \pm 13,3$ anos). Quarenta e nove pacientes apresentaram os dados referentes às duas informações (parasitemia e níveis de plaquetas) e foram avaliados para se testar uma possível correlação entre o grau de parasitemia e o nível de plaquetas no sangue.

4.6 – Análise dos dados e análise estatística

As análises foram realizadas comparando-se os resultados com as seqüências já depositadas no bando de dados GenBankTM, através do BlastN (www.pubmed.com). As amostras foram alinhadas utilizando o programa ClustalW (Thompson et al., 1994). As seqüências foram editadas no programa MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004).

Após a análise das seqüências obtidas avaliou-se o polimorfismo encontrado em cada amostra e comparou-se as seqüências brasileiras com outras seqüências de outros continentes. Para tais objetivos, foram realizados os cálculos da variabilidade nucleotídica (diferença entre as seqüências de nucleotídeos) através do programa Mega 3.1 e genotípica ou haplotípica (diferença entre as seqüências de aminoácidos) com o programa DNAsp 4.0 (Rozas et al., 2004). A taxa de substituições sinônimas em sítios sinônimos

- d_S - (substituições de nucleotídeos que não alteram o aminoácido gerado) e a taxa de substituições não sinônimas por sítio não sinônimo - d_N - (substituições de nucleotídeos que geram uma mudança de aminoácido) foram calculados segundo o método de Nei e Gojobori (1986) com a correção de Jukes e Cantor (1969) a fim de se evidenciar a seleção positiva natural, no Mega 3.1 (Kumar et al., 2004), mesmo programa utilizado para construir as árvores filogenéticas pelo método de Neighbor Joining (Saitou & Nei, 1987). Para comparar a diversidade nucleotídica entre as seqüências brasileiras com as seqüências dos outros continentes, foram calculados os valores de F_{ST} (índice de fixação de alelos) no Software Arlequin 3.1 utilizando-se o método de distância de Jukes & Cantor (1969). O F_{ST} varia entre 0 (cada população estudada apresenta os mesmos haplótipos entre si) e 1 (cada população possui haplótipos não presentes nas outras populações estudadas). No mesmo programa, ainda foram identificados sítios que se apresentavam em desequilíbrio de ligação. Os parâmetros utilizados foram os determinados pelo próprio software.

Para comparar a freqüência dos resíduos de aminoácidos dos sítios polimórficos com os parâmetros de morbidade (parasitemia e níveis de plaquetas), utilizou-se o teste exato de Fisher (duas caudas). Os testes foram considerados positivos após a correção de Bonferroni. O teste de Mann-Whitney (Wilcoxon Rank-sum test) foi utilizado para comparar os valores das medianas de parasitemia e plaquetas. O modelo de regressão linear múltipla foi usado para testar a contribuição independente da parasitemia e dos resíduos de aminoácidos dos sítios polimórficos nos níveis sanguíneos de plaquetas. Os testes foram realizados no software Stata 6.0. Os níveis de significância foram definidos em 5%.

5. RESULTADOS

5.1 - Amplificação do gene *PvAMA-1*

As amostras de Cuiabá e Apiacás foram utilizadas para amplificação do gene *PvAMA-1*. Cento e nove das 183 amostras da população “Cuiabá” e nove das 50 amostras de “Apiacás” positivas no diagnóstico molecular amplificaram para esse gene, totalizando 118 amostras. O fragmento de DNA obtido possui aproximadamente 400 pb conforme mostrado na Figura 7.

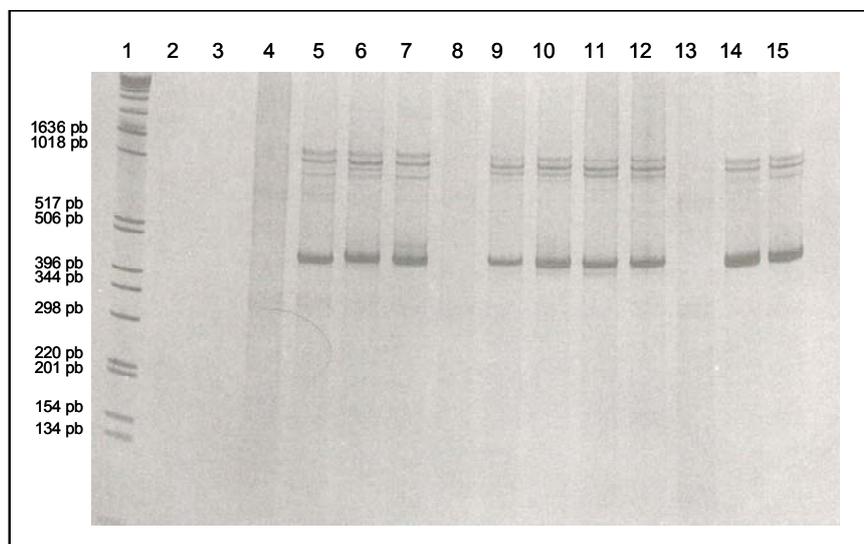


Figura 7: Amplificação do gene *PvAMA-1* por *Nested* PCR em amostras extraídas de sangue conservado em guanidina 4M. Canaletas: 1, padrão de peso molecular (1Kb Ladder); 2, branco do 1º mix; 3, branco do 2º mix; 4, controle negativo; 5, controle positivo; 6-15, pacientes. Canaletas 8 e 13: negativas para a amplificação do gene

Inicialmente foi importante verificar se a amplificação do gene *PvAMA-1* era restrita apenas às amostras positivas para *P. vivax*. Assim, o diagnóstico molecular foi realizado em 93 amostras, positivas ou não para o gene *PvAMA-1*, a fim de se correlacionar o resultado da amplificação do gene *PvAMA-1* ao resultado obtido após amplificação do gene de plasmódios 18S rRNA (fragmento de aproximadamente 100 pb) (Figura 8).

Todas as amostras positivas para *AMA-1* foram positivas para *P. vivax*, incluindo infecções mistas por *P. falciparum*, *P. malariae*, ou por ambas as

espécies, totalizando 51 amostras. As amostras negativas para o gene *PvAMA-1* mostraram-se positivas para outras espécies que não o *P. vivax* (14 amostras), ou negativas para infecção malárica (28 amostras). Desta forma, pôde-se concluir que a amplificação do gene *PvAMA-1* ocorre de maneira satisfatória mesmo quando o paciente apresenta infecções mistas conforme verificado em algumas amostras.

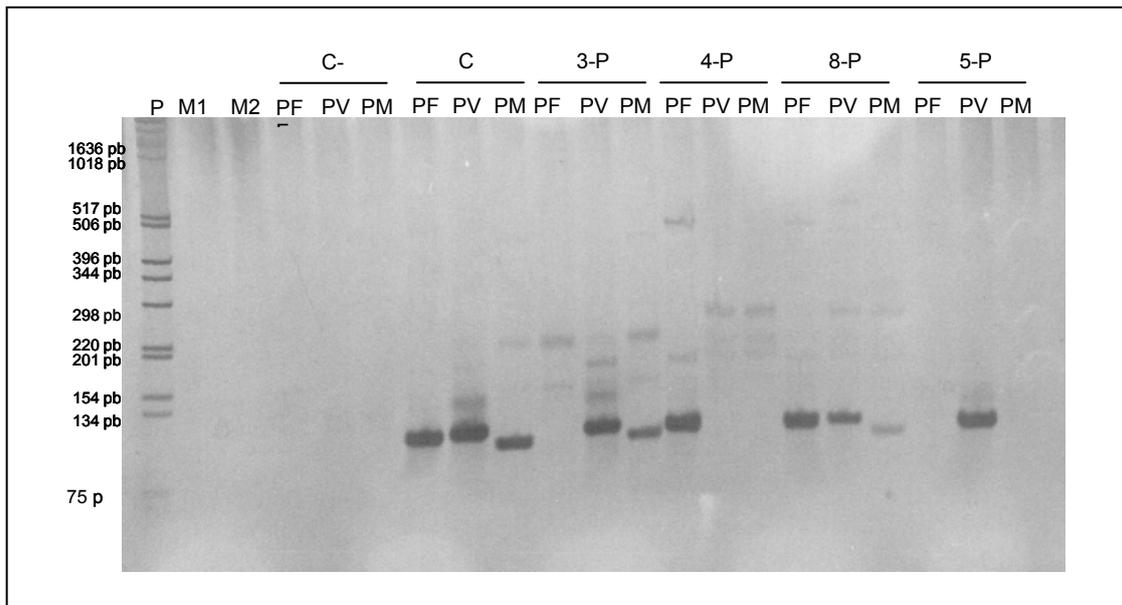


Figura 8: Amplificação por *Nested* PCR do gene 18S SSu rRNA de plasmódios das amostras extraídas de sangue de pacientes conservadas em guanidina 4M. Canaletas: P: Padrão de peso molecular (1 Kb Ladder); M1: Mix da 1ª reação; M2: Mix da 2ª reação; C-: Controle negativo usando DNA de indivíduo sem malária; C+: Controle positivo usando DNA de paciente infectado com as três espécies de *Plasmodium*; 1: Paciente infectado com *P. vivax* e *P. malariae*; 2: Paciente diagnosticado com *P. falciparum*; 3: Paciente infectado com as três espécies de *Plasmodium*; 4: Paciente infectado com *P. vivax*.

5.2 – Seqüenciamento das amostras positivas para o gene *PvAMA-1*

De um total de 233 amostras incluídas neste estudo (183 amostras de Cuiabá e 50 amostras de Apiacás), 118 amplificaram para o gene *PvAMA-1*. Dessas, 105 amostras foram seqüenciadas com sucesso após o processo de purificação e quantificação da concentração de DNA em gel de agarose 1%. As seqüências obtidas representam os nucleotídeos 274 a 759, que correspondem aos aminoácidos 92-253 do isolado PH-84 (Cheng & Saul, 1994), seqüência

utilizada como padrão. O número de acesso dessa seqüência no GenBank™ é L27503, e a seqüência completa encontra-se no anexo I. A tabela de aminoácidos encontra-se no anexo III.

As amostras seqüenciadas representam seis estados brasileiros: Acre (8 amostras), Amazonas (13 amostras), Mato Grosso (31 amostras), Pará (20 amostras), Rondônia (32 amostras) e Roraima (1 amostra).

Geralmente as seqüências abrangeram o intervalo entre os sítios 101 e 240, mas houve algumas (minoria) que possuem tamanhos maiores, incluindo desde o sítio 92 até o sítio 253.

5.3 - Polimorfismos de *PvAMA-1* entre os isolados brasileiros

Para a análise comparativa das seqüências dos isolados brasileiros (análise intra e interpopulacional) nos baseamos no principal trabalho de análise de seqüências do antígeno *PvAMA-1* (Figtree et al., 2000) que descreve seqüências de diversos locais dentro dos continentes africano, asiático e da Oceania (Figura 9). Não são conhecidos os locais de aquisição das amostras africanas. A tabela 1 mostra os aminoácidos presentes nos sítios polimórficos encontrados em isolados brasileiros e isolados previamente caracterizados. Outro trabalho também foi utilizado para comparação das seqüências brasileiras. Trata-se do trabalho de Cheng & Saul (1994) que seqüenciou a proteína inteira, em seis isolados provenientes de infecções adquiridas em países asiáticos.

Alguns sítios polimórficos já anteriormente descritos (posições 107, 112, 120, 130, 132, 140, 141, 145, 189, 190, 193, 210, 227 e 228) também foram verificados para os isolados brasileiros.

Dez sítios nucleotídicos polimórficos encontrados nas seqüências brasileiras nunca foram descritos anteriormente, incluindo duas mutações sinônimas. Essas trocas de nucleotídeos geraram mudanças de aminoácidos nas posições 92, 100, 111, 142, 155, 237 e 241 e substituições sinônimas nos sítios 107 e 248.

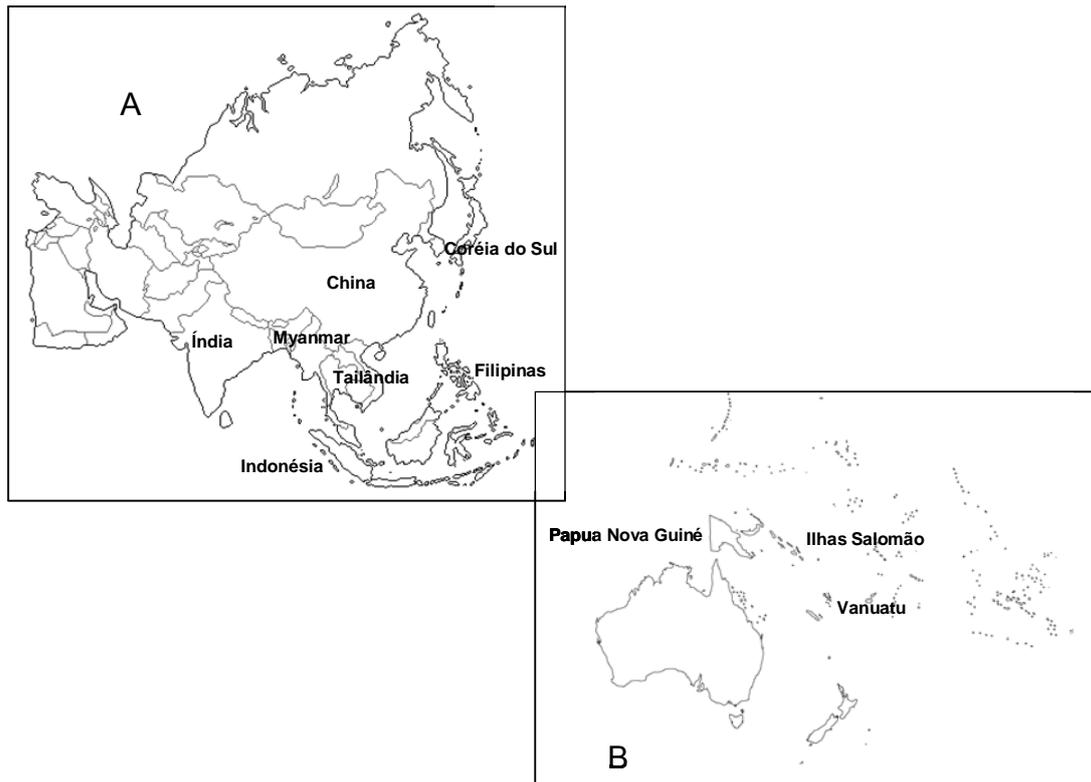


Figura 9: Localização dos países/regiões na A – Ásia e B – Oceania das seqüências usadas nas comparações com as amostras brasileiras e avaliados por Figtree e colaboradores (2000)

Para os isolados brasileiros, os sítios nucleotídicos polimórficos 274 e 275 geraram a troca do aminoácido G^{92} para P^{92} quando estão presentes os nucleotídeos C^{274}/C^{275} (ao invés dos G^{274}/G^{275}). Apenas seis seqüências possuem esse sítio, sendo que cinco apresentaram o polimorfismo.

Dezessete amostras mostram o aminoácido da posição 100 em suas seqüências. A troca do nucleotídeo G^{298} por T^{298} faz com que o aminoácido G^{100} seja substituído por C^{100} . Treze amostras apresentaram esta mutação.

No sítio 107, os resíduos polimórficos conhecidos são os aminoácidos A^{107} (GCT) e D^{107} (GAT). Para as amostras brasileiras, além de GAT, observou-se troca do nucleotídeo T^{321} por C^{321} o que gera substituição sinônima.

Tabela 1: Sítios de aminoácidos polimórficos (e os sítios nucleotídicos correspondentes) do domínio I do gene *PvAMA-1* presentes no Brasil e em países/regiões da África, Ásia e Oceania.

	92 (274,275)	100 (298)	107 (320,321*)	111 (333)	112 (335,336)	120 (359,360)	130 (390*)	132 (394)	133 (397)	140 (418)	141 (422)	142 (424)	145 (434)	155 (463)	172 (514)	189 (565, 567)	190 (568)	191 (572)	193 (577)	210 (628)	218 (652)	227 (680,682)	228 (683,684)	237 (709)	241 (721)	248 (744*)
	G/P	C/G	A/D	L/E	K/R/T	K/R	K*/N	D/N	D	I/L	A/E	N/D	A/E	K/E	A	E/K/N	K/Q	T	H/Y	P/S	V	E/V	D/S	K/Q	N/Y	P/P*
Brasil ¹																										
África ²	x	x	x	L	K/R/T	K/R	N	D/N	D	I/L	A	N	A/E	K	A	E	K	T	H	S	V	E	S	K	N	x
Índia ²	x	x	x	L	K/R/T	K/R	K*/N	D/N	D	I/L	A/E	N	A/E	K	A	E/K/N	E/Q	T	H	P/S	V	E/V	D/S	K	N	x
Sri Lanka ²	x	x	x	L	K/T	K/R	N	D/N	D	I/L	A/E	N	A/E	K	A	E/K	E/K	T	H	P/S	V	E/V	D/	K	N	x
Tailândia ²	x	x	x	L	K/T	K/R	N	D/N	D	I	A	N	A	K	A	E/K	E/K	T	H	P/S	V	E/V	D/S	K	N	x
China ²	x	x	x	L	K/R/T	R	N	D/N	D	I/L	A/E	N	A/E	K	A	E/K	K	T/K	H	P/S	V	E/V	D/S	x	x	x
Coréia Sul ³	x	G	A	L	T	R	N	D	D	L	E	N	A	K	A	E/K	K	T	H	P	V	E	S	K	N	P
Indonésia ²	x	x	x	L	K/T	R/S	K/N	D/N	D/N	I/L	A/E	N	A/E	K	A	E/N	K	T	H	P/S	V	E/V	D/S	K	N	x
ADS ²	x	x	x	L	K/T	R	K/N	D/N	D	I/L	A/E	N	A/E	K	A	E/K/N	E/K	T	H	P/S	L/V	E/V	D/S	K	N	x
Morong ²	x	x	x	L	K/T	R	K/N	D/N	D	I/L	A/E	N	A/E	K	A	E/K/N	E/K	T	H	P/S	L/V	E/V	D/S	K	N	x
Palawan ²	x	x	x	L	K/T	R	K/N	D/N	D	I/L	A/E	N	A/E	K	A	E/K	E/K	T	H/Y	P/S	L/V	E/V	D/S	K	N	x
P.N.G. ²	x	x	x	L	K/R/T	R/S	K/N	D/N	D/N	I/L	A/E	N	A/E	K	A/T	E/K/N	E/K	T	H	S	V	E/V	D/S	K	N	x
Ilhas Sal. ²	x	x	x	L	K/T	R/S	K/N	D/N	D/N	I/L	A/E	N	A/E	K	A/T	E/K	E/K	T	H	S	V	E/V	D/S	K	N	x

¹Grynberg et al., 2007; ²Figtree et al., 2000; ³Han et al., 2002

Nota: ADS = Agusan del Sur e PNG = Papua Nova Guiné. Sítios grifados indicam os presentes somente nas amostras brasileiras, os destacados em cinza representam os sítios não encontrados nas amostras brasileiras e * significa polimorfismos que geram substituições sinônimas (sem troca de aminoácido)

A primeira mutação inédita dentro do intervalo previamente estudado por Figtree e colaboradores (2000) situa-se no sítio 111, onde a troca do nucleotídeo A³³³ por T³³³ levou à mudança do aminoácido L¹¹¹ por F¹¹¹. Três amostras apresentaram essa mutação, sendo que duas possuem exatamente a mesma seqüência de aminoácidos.

Para o sítio 112 os resíduos K¹¹² (AAA) e T¹¹² (ACC) são igualmente freqüentes entre as seqüências conhecidas. Somente os isolados da Coréia do Sul não apresentam o aminoácido K¹¹². O aminoácido R¹¹² (AGA) é mais raro, sendo encontrado, além do Brasil, apenas na África, China, Índia e Papua Nova Guiné.

No sítio 120, há três aminoácidos possíveis, o K¹²⁰, R¹²⁰ e S¹²⁰. Somente os dois primeiros foram encontrados nas amostras brasileiras (K^{AAG} e R^{AGG}). O resíduo S¹²⁰, gerado pelo códon AGT³⁶⁰, é encontrado na Papua Nova Guiné, Ilhas Salomão e Indonésia. Os isolados provenientes destas localidades também apresentam o resíduo R¹²⁰.

O sítio 130 possui uma substituição sinônima e uma não-sinônima. O resíduo N¹³⁰ (AAT) está presente em isolados de diferentes continentes. Já o aminoácido K¹³⁰, que pode ser codificado por dois códons (AAA e AAG), está presente em isolados do Brasil, em isolados de todas as localidades das Filipinas e Oceania, e ausente na África, China, Coréia do Sul, Sri Lanka e Tailândia. A forma mais comum é a codificada pelos nucleotídeos AAA, exceto no Brasil e na Índia que apresentam exclusivamente a forma sinônima.

Os sítios seguintes não apresentam variação por apresentarem somente duas formas possíveis e serem amplamente distribuídas no mundo. São eles o sítio 132 (D^{GAT} e N^{AAT}), 140 (I^{ATA} e L^{TTA}), 141 (A^{GCG} e E^{GAG}) e 145 (A^{GCA} e E^{GAA}).

Outra mutação inédita situa-se no sítio 142. Duas amostras, da mesma localidade (Apiacás, MT) apresentaram, ao invés do aminoácido N¹⁴², o aminoácido D¹⁴². A mutação ocorreu devido à troca do nucleotídeo A⁴²⁴ por G⁴²⁴. Em uma dessas amostras encontra-se outra mutação nunca descrita no sítio 155. O A⁴⁶³, ao ser substituído por G⁴⁶³, gerou a troca do aminoácido K¹⁵⁵ por E¹⁵⁵.

O sítio 189 possui três aminoácidos possíveis, todos presentes nas amostras brasileiras: E¹⁸⁹ (GAA), K¹⁸⁹ (AAA) e N¹⁸⁹ (AAT). Somente os isolados

de mais quatro localidades possuem as três formas em suas amostras: as seqüências de Agusan del Sur, Índia, Morong e Papua Nova Guiné. Nos isolados da África, não foi encontrado polimorfismo para esse sítio, sendo o aminoácido E¹⁸⁹ a única forma presente. Nos outros locais, os aminoácidos predominantes são E¹⁸⁹ e K¹⁸⁹, com exceção das seqüências da Indonésia, que apresentam E¹⁸⁹ e N¹⁸⁹.

O sítio 190 possui uma particularidade: apenas isolados do Brasil e da Índia apresentam polimorfismo nesse sítio. O aminoácido K⁵⁶⁸ é substituído pelo aminoácido G⁵⁶⁸, trocando o aminoácido K¹⁹⁰ por Q¹⁹⁰. É interessante notar que esses são os únicos locais onde ocorre a substituição sinônima no aminoácido K¹³⁰.

A troca do nucleotídeo C⁵⁷⁷ por T⁵⁷⁷ gera a troca do resíduo H para o Y no sítio 193. Essa mutação só havia sido descrita anteriormente nos isolados de Palawan, nas Filipinas, em apenas duas amostras. Nos isolados brasileiros, 10 amostras possuem esse polimorfismo.

No sítio 210, a troca de T⁶²⁸ por C⁶²⁸ gera a mudança do aminoácido P²¹⁰ para S²¹⁰. Entre os isolados da Coréia do Sul, o único resíduo encontrado é o P²¹⁰, enquanto que nos da África e da Oceania (Papua Nova Guiné e Ilhas Salomão), somente o aminoácido S²¹⁰ é encontrado. No restante das áreas estudadas, ambos os resíduos são encontrados.

Outra mutação inédita observada localiza-se no sítio 237, onde, além do aminoácido K²³⁷, encontra-se também o aminoácido Q²³⁷, devido à troca de uma A⁷⁰⁹ por C⁷⁰⁹. Dez seqüências possuem essa mutação. A última mutação não sinônima inédita encontrada nas seqüências brasileiras localiza-se no sítio 241, e está presente em sete amostras. A troca do nucleotídeo A⁷²¹ por T⁷²¹ gerou a mudança de N²⁴¹ para Y²⁴¹.

No final do domínio I da proteína, ainda temos uma substituição sinônima inédita localizada no sítio 248, cujo resíduo de aminoácido é o P. Quatro das 36 amostras que possuem essa parte do domínio I seqüenciadas a possuem, sendo que duas apresentam o nucleotídeo G⁷⁴⁴ e as outras duas, A⁷⁴⁴, ao invés do C⁷⁴⁴.

Existem cinco sítios polimórficos já descritos para isolados em diferentes partes do mundo que não foram encontrados nas seqüências brasileiras aqui

caracterizadas. Cada um deles gera um aminoácido diferente nos sítios 120 (já descrito), 133, 172, 191 e 218.

O sítio 133 é polimórfico apenas entre isolados da Indonésia, Papua Nova Guiné e Ilhas Salomão. Neste caso, a troca do nucleotídeo G³⁹⁷ por A³⁹⁷ faz com que o aminoácido D¹³³ mute para N¹³³.

No sítio 172, polimórfico apenas entre isolados da Oceania (Papua Nova Guiné e Ilhas Salomão), o aminoácido A¹⁷² é trocado pelo aminoácido T¹⁷² decorrente da substituição do nucleotídeo G⁵¹⁴ por A⁵¹⁴.

A mutação no sítio 191 só foi descrita em uma única seqüência chinesa. Nela, a troca de uma C⁵⁷² por uma A⁵⁷² faz com que o aminoácido T¹⁹¹ seja substituído por K¹⁹¹.

E por último, temos uma mutação descrita apenas nas Filipinas, em Agusan del Sur, Morong e Palawan, no sítio 218. O aminoácido L²¹⁸ está no lugar do V²¹⁸, em função da substituição do nucleotídeo G⁶⁵² por T⁶⁵².

5.4 – Diversidade genotípica (haplotípica) das seqüências brasileiras

Para analisar a diversidade genotípica das amostras brasileiras, apenas as seqüências que compreendem os aminoácidos 101 a 240 (420 nucleotídeos) foram consideradas. Noventa e duas amostras foram incluídas nas análises subseqüentes, sendo oito originadas do Acre, 13 do Amazonas, 23 de Mato Grosso, 17 do Pará, 30 de Rondônia e 1 de Roraima.

A diversidade nucleotídica (π) foi determinada ao comparar as seqüências par a par e apresentou um valor de $0,01662 \pm 0,00073$. Isso significa que o grau de variação entre as seqüências foi de 1,6% ou seja, elas apresentam grande similaridade entre si, da ordem de 98,4%. As 92 seqüências geraram 27 haplótipos (Tabela 2). Neste caso, a diversidade genotípica foi de $0,918 \pm 0,00019$. Assim, mesmo a diversidade nucleotídica sendo muito baixa (1,6%), a variedade haplotípica é bastante alta (91,8%).

Há diversas particularidades nos haplótipos encontrados entre as amostras brasileiras. Para o sítio 107, existem três possibilidades, como já foi descrito anteriormente: A¹⁰⁷, D₁¹⁰⁷ (GAT) e D₂¹⁰⁷ (GAC). É possível notar na Tabela 2 que os aminoácidos A¹⁰⁷ e D₁¹⁰⁷ estão associados aos aminoácidos T¹¹² e R¹²⁰, enquanto D₂¹⁰⁷ está associado aos resíduos K¹¹², R¹¹². O

Tabela 2: Seqüências de nucleotídeos e os respectivos aminoácidos das amostras brasileiras e os haplótipos gerados

	320	321	333	335	336	359	390	394	418	422	424	434	463	565	567	568	577	628	680	682	683	684	709	107	111	112	120	130	132	140	141	142	145	155	189	190	193	210	227	228	237	Estados brasileiros					
Hap1 (17,2%)	C	T	A	C	C	G	T	A	T	A	A	C	A	A	A	C	C	C	A	A	G	C	A	A	L	T	R	N	N	L	E	N	A	K	K	Q	H	P	E	S	K	AM (4)/MT (1)/PA (6)/RO (4)/RR (1)					
Hap2 (14%)	-	-	-	-	-	-	A	G	-	C	-	A	-	G	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AC (3)/AM (3)/RO (7)				
Hap3 (6,4%)	-	-	-	-	-	-	-	-	A	C	-	-	-	G	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AM (1)/MT (4)/PA (1)				
Hap4 (4,3%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AC (1)/RO (3)				
Hap5 (3,2%)	-	-	-	-	-	-	A	G	-	C	-	-	-	G	-	A	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MT (2)/RO (1)			
Hap6 (3,2%)	-	-	-	-	-	-	A	G	-	-	-	-	-	G	-	A	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MT (1)/PA (1)/RO (1)			
Hap7 (2,1%)	-	-	-	-	-	-	A	G	-	C	-	A	-	G	-	A	-	-	T	G	A	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MT (2)			
Hap8 (2,1%)	-	-	-	-	-	-	-	A	C	-	-	-	-	G	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MT (2)			
Hap9 (2,1%)	-	-	-	-	-	-	-	A	C	-	A	-	G	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PA (2)			
Hap10 (1,1%)	-	-	-	-	-	-	-	A	C	G	A	G	G	G	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MT (1)			
Hap11 (1,1%)	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MT (1)			
Hap12 (1,1%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MT (1)			
Hap13 (1,1%)	-	-	-	-	-	-	A	G	-	-	-	-	-	G	-	A	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RO (1)		
Hap14 (1,1%)	-	-	-	-	-	-	A	G	-	C	-	-	-	G	-	A	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MT (1)		
Hap15 (1,1%)	-	-	-	-	-	-	-	G	-	C	-	-	-	G	-	A	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PA (1)		
Hap16 (1,1%)	-	-	-	-	-	-	-	A	C	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PA (1)		
Hap17 (1,1%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	A	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RO (1)		
Hap18 (1,1%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RO (1)		
Hap19 (1,1%)	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MT (1)			
Hap20 (15%)	A	-	-	-	-	-	A	G	-	-	-	-	-	G	T	A	-	-	T	G	A	T	-	D ₁	-	-	-	K	D	-	-	-	-	-	N	K	-	-	V	D	-	-	-	-	-	AC (2)/AM (2)/MT (5)/RO (5)	
Hap21 (1,1%)	A	-	-	-	-	-	A	G	-	-	-	-	-	G	T	A	-	-	T	G	A	T	C	D ₁	-	-	-	K	D	-	-	-	-	-	N	K	-	-	V	D	Q	-	-	-	-	RO (1)	
Hap22 (1,1%)	A	-	-	-	-	-	A	G	-	-	-	-	-	G	T	A	-	-	-	-	-	-	-	D ₁	-	-	-	K	D	-	-	-	-	-	N	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RO (1)	
Hap23 (5,4%)	A	C	-	A	A	-	-	A	C	-	-	-	-	G	-	A	-	-	-	-	-	-	-	D ₂	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MT (2)/PA (1)/RO (2)	
Hap24 (2,1%)	A	C	T	A	A	-	-	A	C	-	-	-	-	G	-	A	-	-	-	-	-	-	-	D ₂	F	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AM (1)/PA (1)	
Hap25 (5,4%)	A	C	-	G	A	A	-	A	C	-	-	-	-	G	-	A	-	-	-	-	-	-	-	D ₂	-	R	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AC (2)/AM (1)/PA (2)	
Hap26 (3,2%)	A	C	-	G	A	A	-	A	C	-	-	-	-	G	-	A	-	-	T	G	A	T	-	D ₂	-	R	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AM (1)/PA (1)/RO (1)	
Hap27 (1,1%)	A	C	-	G	A	A	-	A	C	-	-	-	-	G	-	A	-	-	-	-	-	-	-	D ₂	-	R	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RO (1)

D1 = GAT; G2 = GAC.

aminoácido D₁¹⁰⁷ só está presente nos haplótipos quem contém o aminoácido raro N¹⁸⁹.

Nos sítios 130 e 132, os aminoácidos K¹³⁰ e N¹³⁰ parecem estar associados aos aminoácidos D¹³² e N¹³² respectivamente, mas existem exceções como verificado para o haplótipo 15. Apesar de somente esse haplótipo diferir dos outros, esse padrão é bem comum em outras localidades, como África, China, Índia, Papua Nova Guiné e Ilhas Salomão.

Semelhantemente para os sítios 189 e 190, o aminoácido E¹⁸⁹ tende a se apresentar associado ao aminoácido K¹⁹⁰, assim como o aminoácido K¹⁸⁹ parece estar associado ao aminoácido Q¹⁹⁰. Mas os haplótipos 11 e 16 diferem em conter os aminoácidos E¹⁸⁹ e Q¹⁹⁰. Como já foi dito anteriormente, o único local que apresenta o resíduo polimórfico Q no sítio 190 é a Índia, mas está associado, assim como a maioria das seqüências brasileiras, ao aminoácido K¹⁸⁹. Independente do lugar, o aminoácido N¹⁸⁹ está sempre associado ao aminoácido K¹⁹⁰.

Outra particularidade é o desequilíbrio de ligação entre os sítios 193 e 210 ($r^2 = 1.00$). Nota-se que o resíduo Y¹⁹³ está sempre acompanhado do resíduo S²¹⁰, da mesma forma que o resíduo H¹⁹³ está sempre associado ao resíduo P²¹⁰. Nas únicas seqüências onde o aminoácido polimórfico Y¹⁹³ foi descrito (Palawan, Filipinas), o aminoácido acompanhante é o P²¹⁰. No entanto, o resíduo H¹⁹³ vem igualmente acompanhado por ambos os resíduos do sítio 210, o que não ocorre nas seqüências brasileiras.

5.5 – Análise intrapopulacional

Para as seqüências dos isolados brasileiros, determinamos o número de substituições sinônimas por sítios sinônimos (d_S) e o número de substituições não-sinônimas por sítios não-sinônimos (d_N). Segundo o método de Nei e Gojobori (1986) com correção de Jukes & Cantor (1969), $d_S = 0,0093 \pm 0,0056$, enquanto que $d_N = 0,0189 \pm 0,0052$. Para avaliar a participação de uma seleção diversificadora sobre o gene PvAMA1, utilizou-se o teste Z onde $z = (d_N - d_S) \cdot [\text{var}(d_N) + \text{var}(d_S)]^{-0.5}$. Para as seqüências brasileiras, $z = \pm 1,25$, e rejeita, portanto, a hipótese de que $d_N > d_S$.

Analisando os estados brasileiros separadamente com relação à diversidade nucleotídica, diversidade genotípica, e aos valores de d_S e d_N , percebemos que os valores são bastante semelhantes (Tabela 3). Em nenhum estado o teste-z foi significativo. Comparando os estados entre si, também não foram observadas diferenças entre os valores de d_S e d_N (Tabela 4). O cálculo do F_{st} revelou que não há diferenças entre os estados, já que todos os valores são altos e não significativos (Tabela 5).

A análise filogenética foi realizada com base na construção de uma árvore utilizando o método de Neighbor-Joining (Figura 10). Nota-se que não há um padrão na distribuição das amostras por estado. Isso reforça os testes anteriores, onde concluímos que não há diferenças entre as populações de *P. vivax* circulantes em cada estado brasileiro.

5.6 – Análise Interpopulacional

Os mesmos cálculos da análise intrapopulacional foram feitos para comparar as seqüências brasileiras com as seqüências das outras localidades. Para tais análises, o sítio 107 foi excluído, pois esse não está caracterizado nas outras seqüências, e o último sítio incluído foi o 231, pois esse é o último sítio presente nas amostras da China e Tailândia. Assim, o intervalo incluído contém 372 pb. Para esta análise, 320 seqüências foram incluídas, sendo 92 de isolados brasileiros.

Como o intervalo de bases foi alterado sendo menor do que a intervalo utilizado para a análise intrapopulacional, os cálculos referentes às amostras nacionais precisaram ser refeitos. Assim, a diversidade nucleotídica entre os sítios 108 e 231 é $\pi = 0,01632 \pm 0,00069$. A diversidade genotípica é $0,906 \pm 0,00019$. O valor de $d_N = 0,019 \pm 0,0051$ e $d_S = 0,0068 \pm 0,0051$. Foram identificados 20 haplótipos. A comparação entre a diversidade nucleotídica, diversidade genética, d_N e d_S encontra-se na tabela 6, bem como os valores referentes a cada região.

Tabela 3: Análise intrapopulacional: valores da variabilidade nucleotídica, da diversidade genotípica, de d_S e d_N para os isolados brasileiros caracterizados¹

	Variabilidade nucleotídica	Diversidade Genotípica	d_S	d_N
Acre (AC)	0,016 ± 0,009	0,8214 ± 0,1007	0,0123 ± 0,0073	0,0189 ± 0,0058
Amazonas (AM)	0,016 ± 0,009	0,8718 ± 0,0670	0,0111 ± 0,0066	0,0196 ± 0,0056
Mato Grosso (MT)	0,016 ± 0,008	0,8877 ± 0,0384	0,0077 ± 0,0052	0,0200 ± 0,0054
Pará (PA)	0,015 ± 0,008	0,8750 ± 0,0702	0,0098 ± 0,0063	0,0156 ± 0,0045
Rondônia (RO)	0,014 ± 0,008	0,8850 ± 0,0312	0,0084 ± 0,0052	0,0184 ± 0,0051

¹O estado de Roraima não foi incluído pois contém apenas uma amostra

Tabela 4: Análise interpopulacional dos isolados brasileiros caracterizados¹A) valores de d_S (\pm desvio padrão)

	AC	AM	MT	PA
Acre (AC)				
Amazonas (AM)	0.0105 \pm 0,0064			
Mato Grosso (MT)	0.0096 \pm 0,0060	0.0092 \pm 0,0058		
Pará (PA)	0.0108 \pm 0,0063	0.0105 \pm 0,0062	0,0104 \pm 0,0061	
Rondônia (RO)	0.0097 \pm 0,0060	0.0093 \pm 0,0058	0.0078 \pm 0,0053	0.0101 \pm 0,0059

B) valores de d_N (\pm desvio padrão)

	AC	AM	MT	PA
Acre (AC)				
Amazonas (AM)	0,0186 \pm 0,0052			
Mato Grosso (MT)	0,0195 \pm 0,0051	0,0194 \pm 0,0050		
Pará (PA)	0,0196 \pm 0,0053	0,0178 \pm 0,0047	0,0193 \pm 0,0049	
Rondônia (RO)	0,0182 \pm 0,0049	0,0187 \pm 0,0049	0,0191 \pm 0,0050	0,0175 \pm 0,0050

¹O estado de Roraima não foi incluído pois contém apenas uma amostra

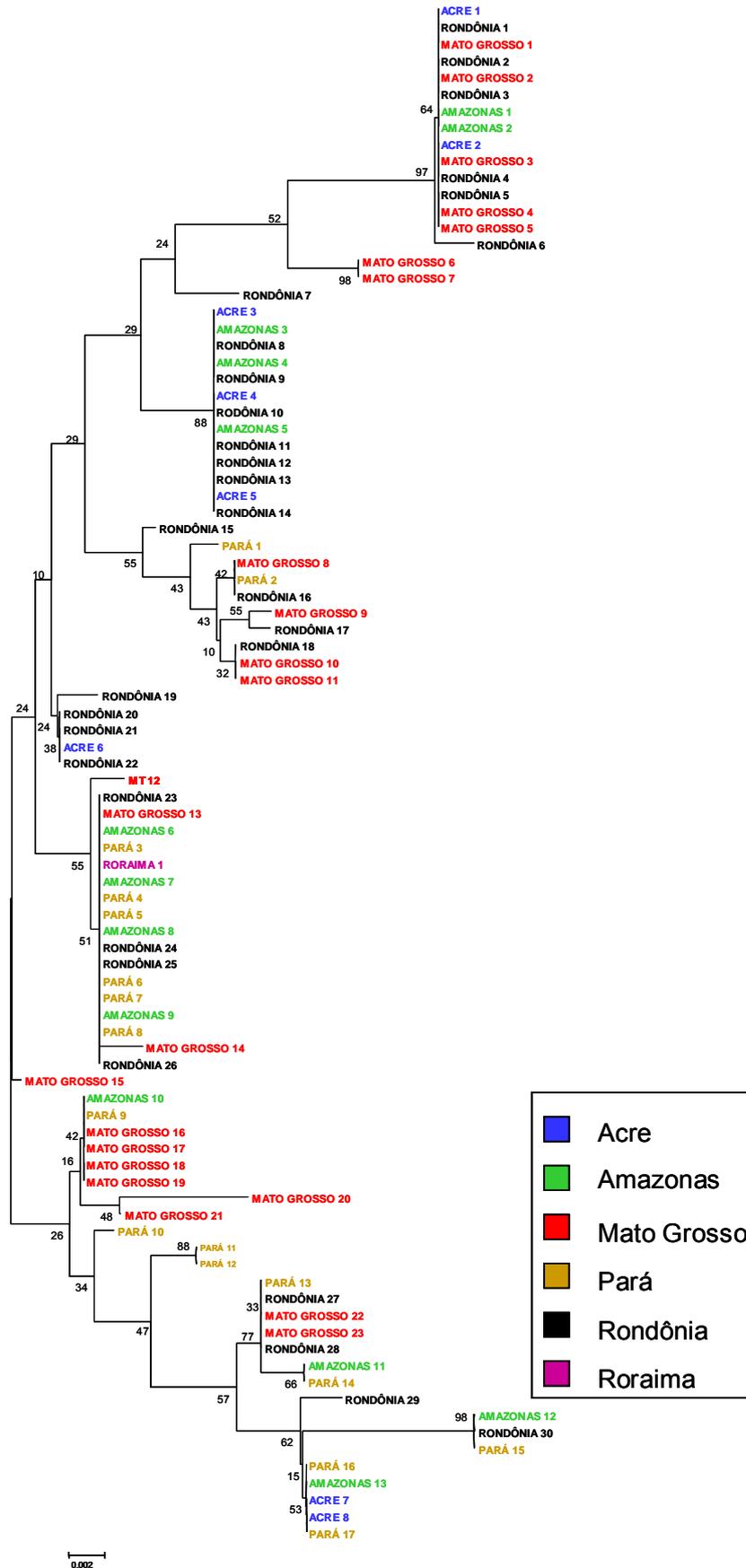


Figura 10: Árvore filogenética das seqüências de *PvAMA-1* obtidas a partir de amostras brasileiras (método: Neighbor-Joining)

Tabela 5: Valores de F_{ST} entre os estados brasileiros¹

	Acre	Amazonas	Mato Grosso	Pará
Acre				
Amazonas	-0.05456			
Mato Grosso	-0.02288	-0.02585		
Pará	0.04294	-0.03933	0.01442	
Rondônia	-0.04181	-0.01707	-0.00730	0.04559

¹O estado de Roraima não foi incluído pois contém apenas uma amostra dessa localidade. Nenhum dos valores de F_{ST} foi significativo ao nível de significância de 5%

Tabela 6: Análise intrapopulacional: valores da variabilidade nucleotídica, da diversidade genotípica, e d_S e d_N para os isolados brasileiros em comparação às seqüências obtidas de isolados oriundos de outros continentes

	Diversidade Nucleotídica	Diversidade Genética	d_S	d_N
Brasil	0,015 ± 0,008	0,9065 ± 0,0136	0.0068 ± 0.0051	0.0190 ± 0.0051
África	0,008 ± 0,005	0,9000 ± 0,1610	0.0026 ± 0.0027	0.0106 ± 0.0045
Índia	0,017 ± 0,009	0,9238 ± 0,0532	0.0097 ± 0.0072	0.0214 ± 0.0062
Sri Lanka	0.024 ± 0,019	1,0000 ± 0.2722	0.0132 ± 0.0100	0.0299 ± 0.0088
Indonésia	0,019 ± 0,012	1,0000 ± 0,0962	0.0111 ± 0.0082	0.0242 ± 0.0068
China	0,017 ± 0,010	0,9643 ± 0,0772	0.0106 ± 0.0080	0.0198 ± 0.0064
Coréia do Sul	0,016 ± 0,001	0,6667 ± 0,2041	0.0000 ± 0.0000	0.0023 ± 0.0021
Tailândia	0,0176 ± 0,010	0,9524 ± 0,0955	0.0228 ± 0.0111	0.0171 ± 0.0062
Morong	0,016 ± 0,008	0,8629 ± 0,0195	0.0119 ± 0.0071	0.0193 ± 0.0055
ADS	0,014 ± 0,007	0,8095 ± 0,0795	0.0091 ± 0.0070	0.0171 ± 0.0052
Palawan	0,016 ± 0,009	0,8235 ± 0,082	0.0084 ± 0.0064	0.0203 ± 0.0054
P.N. Guiné	0,017 ± 0,009	0,9481 ± 0,0362	0.0110 ± 0.0076	0.0205 ± 0.0058
Ilhas Salomão	0,022 ± 0,014	1,000 ± 0,1265	0.0152 ± 0.0085	0.0244 ± 0.0073

A comparação entre d_N e d_S também foi feita entre as regiões, como mostra a tabela 7. Os cálculos de F_{st} (índice de fixação de alelo) foram realizados. Nesse teste, quanto maior o valor de F_{st} (que varia entre 0 e 1), maior a diferenciação entre as populações testadas. Os valores de F_{st} para a população brasileira foram baixos, quando comparados aos valores detectados na análise entre os estados (Tabela 5). Quando o mesmo teste foi realizado com as amostras dos outros locais comparando cada país, percebe-se que existem diferenças significativas entre eles (Tabela 8).

Uma árvore filogenética (Neighbor-Joining) foi construída utilizando os 88 haplótipos determinados a partir das 320 seqüências disponíveis de *PvAMA-1* (Figura 11). O que se pode notar é que não há um padrão de distribuição de haplótipos por continente, resultado semelhante àquele observado para as amostras brasileiras.

Tabela 7: Análise interpopulacional das seqüências brasileiras e de outros continentes.A) Valores de d_S

	Brasil	AFRI	INDI	SL	THAI	INDO	CH	SK	ADS	MOR	PAL	PNG
África (AFRI)	0.0073											
Índia (INDI)	0.0083	0.0081										
Sri Lanka (SL)	0.0118	0.0115	0.0109									
Tailândia (THAI)	0.0158	0.0177	0.0167	0.0193								
China (CH)	0.0114	0.0111	0.0106	0.0091	0.0191							
Coréia do Sul (SK)	0.0043	0.0053	0.0070	0.0132	0.0124	0.0183						
Indonésia (INDO)	0.0106	0.0077	0.0101	0.0107	0.0105	0.0077	0.0164					
Agusan (ADS)	0.0108	0.0073	0.0101	0.0099	0.0099	0.0101	0.0186	0.0141				
Morong (MOR)	0.0165	0.0120	0.0153	0.0171	0.0169	0.0138	0.0205	0.0145	0.0209			
Palawan (PAL)	0.0111	0.0061	0.0101	0.0102	0.0102	0.0090	0.0185	0.0142	0.0084	0.0208		
Papua N. G. (PNG)	0.0108	0.0099	0.0105	0.0112	0.0110	0.0084	0.0169	0.0156	0.0107	0.0105	0.0232	
Ilhas Sal. (SOL)	0.0142	0.0131	0.0128	0.0117	0.0117	0.0123	0.0178	0.0167	0.0122	0.0125	0.0122	0.0211

B) Valores de d_N

	Brasil	AFRI	INDI	SL	THAI	CH	SK	INDO	ADS	MOR	PAL	PNG
África (AFRI)	0.0212											
Índia (INDI)	0.0203	0.0197										
Sri Lanka (SL)	0.0243	0.0232	0.0227									
Tailândia (THAI)	0.0223	0.0200	0.0204	0.0207								
China (CH)	0.0226	0.0188	0.0161	0.0223	0.0150							
Coréia do Sul (SK)	0.0144	0.0193	0.0215	0.0218	0.0224	0.0210						
Indonésia (INDO)	0.0243	0.0181	0.0230	0.0248	0.0216	0.0242	0.0227					
Agusan (ADS)	0.0241	0.0165	0.0224	0.0232	0.0204	0.0218	0.0242	0.0094				
Morong (MOR)	0.0244	0.0171	0.0230	0.0246	0.0217	0.0229	0.0235	0.0090	0.0182			
Palawan (PAL)	0.0246	0.0194	0.0227	0.0250	0.0217	0.0219	0.0208	0.0100	0.0232	0.0220		
Papua N. G. (PNG)	0.0277	0.0230	0.0254	0.0264	0.0249	0.0236	0.0251	0.0118	0.0260	0.0240	0.0256	
Ilhas Sal. (SOL)	0.0215	0.0192	0.0212	0.0242	0.0249	0.0210	0.0174	0.0249	0.0227	0.0234	0.0231	0.0231

Tabela 8: Valores de FST entre os diferentes países analisados.

	Brasil	África	Índia	Sri Lanka	China	Coréia do Sul	Tailândia	Morong	ADS	Palawan	PNG	Ilhas Salomão
África	0.233 **											
Índia	0.012	0.135										
Sri Lanka	0.101	0.230	-0.075									
China	0.124 **	0.194*	-0.040	-0.217								
Coréia do Sul	0.078	0.641 **	0.120	0.393 **	0.278							
Tailândia	0.198 ***	0.311 *	0.102 *	-0.016	0.197 *	0.401 **						
Morong	0.245 ***	0.131 ***	0.147 ***	0.124	0.194 ***	0.345 ***	0.187 **					
ADS	0.249 ***	0.118	0.135 **	0.065	0.115 *	0.450 ***	0.212 ***	0.144 ***				
Palawan	0.173 ***	0.098	0.065	0.009	0.069	0.332 ***	0.171 **	0.121 ***	-0.006			
PNG	0.200 ****	0.147 *	0.070 *	0.042	0.040	0.276 **	0.120 *	0.123 ***	0.176 ***	0.150 ***		
Ilhas Salomão	0.236 **	0.224 *	0.068 *	-0.083	-0.027	0.370 *	0.108	0.114	0.196 *	0.156 *	-0.089	
Indonésia	0.039	0.080	-0.065	-0.102	-0.076	0.170 *	0.165	0.106 *	0.102 *	0.030	0.030	-0.028

Significância de F_{ST} : * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

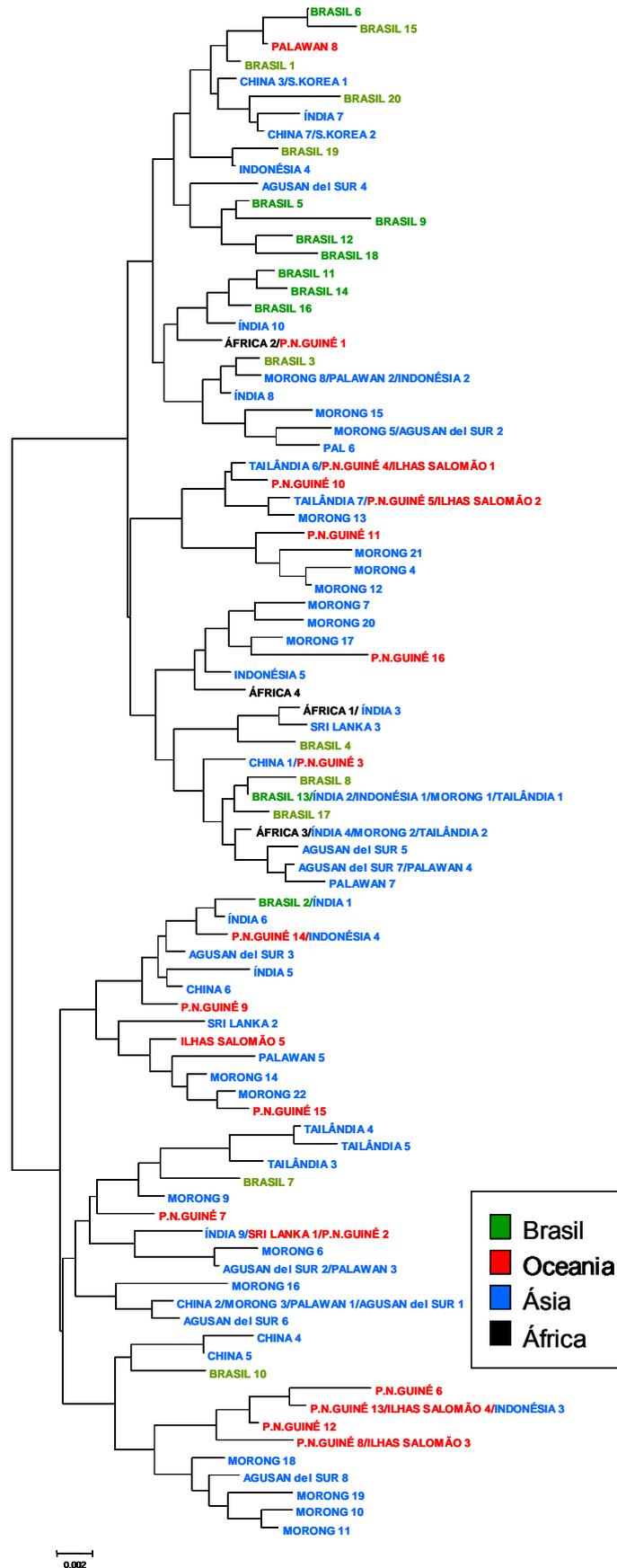


Figura 11: Árvore filogenética dos 88 haplótipos definidos a partir de 320 seqüências de *PvAMA-1* de quatro diferentes continentes (método: Neighbor-Joining)

5.7 – Associação entre resíduos polimórficos, parasitemia e níveis de plaquetas

A associação entre os resíduos polimórficos e aspectos da morbidade foi testado utilizando as amostras da população de Cuiabá. Como já mencionado anteriormente, somente as amostras obtidas de pacientes clinicamente examinados a partir de agosto de 2004 foram incluídas, pois estes apresentavam dados referentes à contagem de plaquetas em seus prontuários médicos.

Os pacientes foram classificados em dois diferentes grupos de acordo com os níveis de parasitos circulantes e a contagem de plaquetas como descritos a seguir. Quatorze pacientes apresentaram parasitemias ≤ 530 parasitos/ μL (média de idade de $40,1 \pm 15,9$ anos) e 42 pacientes apresentavam parasitemias acima de 530 parasitos/ μL (média de idade de $36,7 \pm 13,4$ anos). Com relação ao número de plaquetas, 32 pacientes foram considerados plaquetopênicos (média de idade de $35,5 \pm 15,6$ anos) por apresentarem níveis de plaquetas inferiores a 150.000 plaquetas/ μL e 22 indivíduos foram considerados não-plaquetopênicos apresentando níveis de plaquetas superiores a 150.000 plaquetas/ μL (média de idade de $39,1 \pm 13,3$ anos). Quarenta e nove pacientes apresentaram os dados referentes às duas informações (parasitemia e níveis de plaquetas). Os dados desses pacientes foram utilizados para avaliar o efeito da parasitemia sobre a determinação dos níveis de plaquetas.

A mediana da parasitemia entre os 32 pacientes plaquetopênicos foi 1.850 parasitos/ μL , maior do que a mediana da parasitemia entre os 22 pacientes não-plaquetopênicos, que foi de 560 parasitos/ μL (Figura 12a). Entre os 14 pacientes com parasitemia baixas (< 530 parasitos/ μL), a contagem mediana de plaquetas/ μL foi 161.000, enquanto que a mediana da contagem de plaquetas entre os 42 pacientes com parasitemia mais altas (> 530 parasitos/ μL) foi 107.000 (Figura 12b). Foi observada correlação negativa significativa (Coeficiente $\beta = -7.9$; CI 95%: -12.6 :- 3.6 ; $p=0.001$) entre os níveis de plaquetas e o grau de parasitemia (Figura 13). Não houve associação entre a idade dos pacientes e a parasitemia ou níveis de plaquetas.

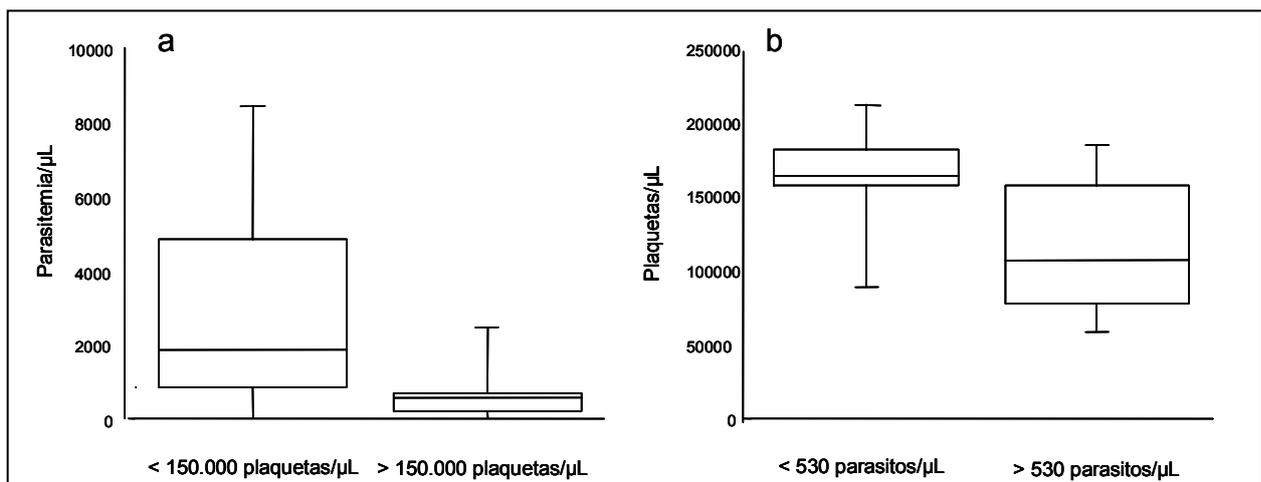


Figura 12: Associação entre parasitemia e níveis de plaquetas em pacientes atendidos no Ambulatório Júlio Muller, Cuiabá, Brasil: a) Medianas das parasitemias de pacientes com (n=32) ou sem plaquetopenia (n=22) e b) medianas dos níveis de plaquetas em pacientes com baixas (n=14) ou altas (n=42) parasitemias.

Utilizou-se o teste de Fisher (Tabela 9) para análise do efeito da presença de determinados resíduos de aminoácidos em sítios polimórficos nos níveis de parasitos circulantes e nos níveis de plaquetas. Apesar de serem 15 os sítios polimórficos, foram realizados 13 testes para cada parâmetro (totalizando 26 testes independentes), já que os sítios 193/210 e 227/228 se apresentam em desequilíbrio de ligação e foram considerados como dois únicos eventos. Uma forte associação foi encontrada entre os resíduos de aminoácidos Y^{193}/S^{210} e níveis normais de plaquetas ($p = 0.0003$). Esse resultado foi confirmado pela correção de Bonferroni para 26 testes independentes ($p < 0,002$). A mesma associação foi encontrada para o sítio 132, onde a presença do aminoácido D^{132} também apresenta associação com níveis normais de plaquetas ($p = 0,025$). Porém, tal associação não foi confirmada após a correção de Bonferroni. É importante notar que para todos os pacientes cujas seqüências de parasitos infectantes possuíam os aminoácidos Y^{193}/S^{210} apresentaram níveis normais de plaquetas. Foi realizada uma análise de regressão linear multivariada para avaliar o efeito da parasitemia na determinação da contagem de plaquetas nas amostras que possuíam os sítios Y^{193}/S^{210} . A forte associação entre o polimorfismo e a

contagem de plaquetas foi mantida, independente do efeito da parasitemia ($\beta = 43,637$; CI95%: 9,439: 77,836, $p=0.001$).

O teste de comparação de medianas Mann-Whitney foi realizado para confirmar a associação entre a parasitemia e os níveis de plaquetas e os resíduos polimórficos dos sítios 193/210. A mediana da parasitemia entre as amostras com os resíduos Y^{193}/S^{210} é 477 parasitos/ μL , significativamente menor que a mediana da parasitemia entre as amostras com os aminoácidos H^{193}/P^{210} (1.164 parasitos/ μL). No entanto, as medianas não foram significativamente diferentes (Figura 14A). Com relação à mediana da contagem de plaquetas, os isolados que apresentaram os resíduos H^{193}/P^{210} apresentaram valores menores (98.500 plaquetas/ μL) quando comparados àqueles com os resíduos Y^{193}/S^{210} (177.000 plaquetas/ μL ($p = 0,0005$)) (Figura 14B).

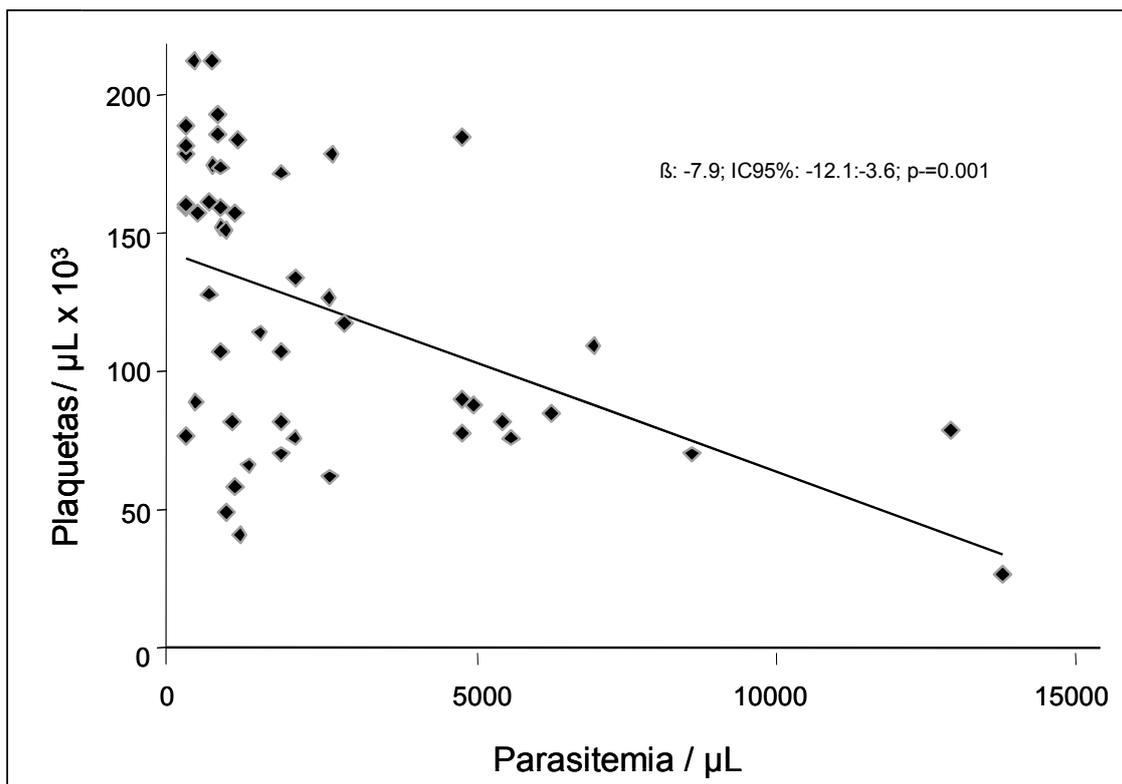


Figura 13: Correlação entre os níveis de plaquetas e o grau de parasitemia entre 49 pacientes com malária *vivax*

Tabela 9: Associação entre os sítios de aminoácidos polimórficos, parasitemia e níveis de plaquetas em pacientes com malária *vivax* no Brasil.

Posição (amino- ácido)	Parasitemia (n=56)			Plaquetas (n=54)			P^a	P^b
	No. de seqüências com o aminoácido indicado		P^a	No. de seqüências com o aminoácido indicado		P^a		
	< 530/ μ L (n = 14)	> 530/ μ L (n = 42)		< 150,000/ μ L (n = 32)	> 150,000/ μ L (n = 22)			
107								
A	11	26	0.337	21	15	1.000		
D	3	16		11	7			
111								
F	1	1	0.440	1	2	0.562		
L	13	41		31	20			
112								
K	0	3	0.257	3	1	0.171		
R	1	7		6	1			
T	13	32		23	20			
120								
K	1	17	0.663	6	1	0.220		
R	13	35		26	21			
130								
K	10	16	0.061	11	14	0.052		
N	4	26		21	8			
132								
D	10	17	0.064	11	15	0.025		
N	4	25		21	7			
140								
I	1	13	0.150	10	3	0.198		
L	13	29		22	19			
141								
A	7	19	0.767	18	9	0.406		
E	7	23		14	14			
145								
A	11	34	1.000	23	20	0.167		
E	3	8		9	2			
189								
E	9	25	1.000	20	14	1.000		
K	3	10		9	3			
N	2	7		3	5			
190								
K	11	31	1.000	22	19	0.198		
Q	3	11		10	3			
193/210								
H/P	11	37	0.398	32	14	0.0003*	0.001**	
Y/S	3	5		0	8			
227/228								
E/S	12	34	1.000	27	18	1.000		
V/D	2	8		5	4			

^a Teste exato de Fisher; * $P < 0.002$ após a correção de Bonferroni

^b Análise de regressão linear multivariável para avaliar a contribuição independente da presença dos resíduos polimórficos específicos dos sítios 193 e 210 e a parasitemia nos níveis de plaquetas

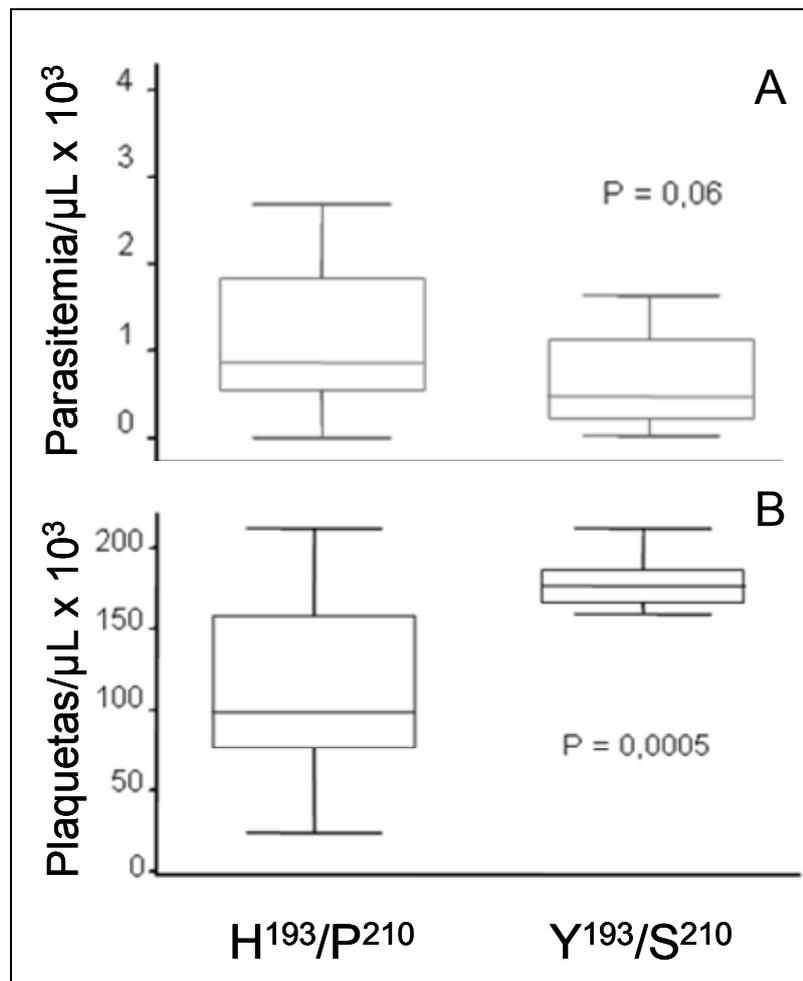


Figura 14: Mediana da parasitemia (A) e dos níveis de plaquetas (B) de acordo com a presença dos resíduos de aminoácidos polimórficos nos sítios 193/210 entre os pacientes com malária *vivax* sintomática. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparar os níveis de parasitemia e de plaquetas entre 49 amostras.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, caracterizou-se o domínio I polimórfico do gene *PvAMA-1* em isolados de *P. vivax* oriundos de pacientes expostos a transmissão de malária na Amazônia Brasileira. A mais completa análise de seqüências de *AMA-1* de *P. vivax* já realizada incluiu 219 amostras originadas de diversos locais de três continentes diferentes: África, Ásia e Oceania (Figtree et al., 2000). No entanto, nenhuma amostra da América do Sul foi incluída. Recentemente, 20 seqüências brasileiras foram descritas (Rodrigues et al., 2004), mas nenhuma análise intrapopulacional ou mesmo comparativa utilizando as seqüências previamente descritas foi realizada. Desta forma, nosso estudo amplia significativamente a descrição das seqüências do gene *PvAMA-1* em isolados brasileiros e faz uma análise comparativa entre essas e aquelas já publicadas em trabalhos anteriores e depositadas no GenBankTM. Assim, descrevemos dez novos polimorfismos em sítios nucleotídicos, gerando sete novas mudanças de aminoácidos (sítios 92, 100, 111, 142, 155, 237 e 241) e duas substituições sinônimas (107 e 241) em isolados brasileiros. Além disso, a análise das seqüências revelou a ausência de cinco mutações anteriormente descritas entre as seqüências brasileiras analisadas, sendo que esses são polimorfismos pouco difundidos entre os locais estudados. A molécula apresenta dois sítios em total desequilíbrio de ligação: 227 e 228. Os nucleotídeos polimórficos A⁶⁸⁰, A⁶⁸², G⁶⁸³, e C⁶⁸⁴ geram os aminoácidos E²²⁷ e S²²⁸, enquanto que os nucleotídeos T⁶⁸⁰, G⁶⁸², A⁶⁸³, e T⁶⁸⁴ geram os aminoácidos V²²⁷ e D²²⁸. As mutações estão presentes em isolados de todos os locais, com exceção dos isolados africanos e sul-coreanos, onde se observa apenas a ocorrência dos aminoácidos E²²⁷S²²⁸. Estes fatos reforçam a idéia de que ainda são necessários mais estudos para se determinar a extensão do polimorfismo do gene *PvAMA-1* que parece apresentar-se distribuído de maneira heterogênea em diferentes regiões do globo. Deve-se considerar a possibilidade de que os polimorfismos encontrados aqui possam existir em isolados de outras regiões que não a América do Sul, e simplesmente não foram descritos em estudos anteriores por razões metodológicas (iniciadores utilizados, fragmentos amplificados, etc). Além disso, existe a possibilidade de que os polimorfismos encontrados nos isolados brasileiros tenham surgido

antes da chegada do *P. vivax* às Américas. Afinal, a história evolutiva do *P. vivax* ainda não foi totalmente elucidada não se conhecendo o período que esta espécie chegou ao nosso continente. Estudos utilizando genes mitocondriais revelaram que a espécie migrou mais recentemente do sudeste asiático para o continente americano (Mu et al., 2005) com estimativas de tempo que variam entre 3.800 (Mu et al., 2005) a 6.900 (Jongwutiwes et al., 2005) anos atrás. No entanto, há evidências arqueológicas que sustentam a hipótese de que tanto *P. vivax* quanto *P. falciparum* não estavam presentes antes da era pré-colombiana, sendo introduzidos após a colonização européia (de Castro & Singer, 2005).

Dentre os sítios polimórficos já descritos e encontrados para os isolados brasileiros, há algumas particularidades que devem ser mencionadas. A primeira se refere ao sítio 107 descrito por Cheng & Saul (1994) no primeiro trabalho publicado com seqüências de origem asiática do gene *PvAMA-1*. A análise das seqüências das amostras brasileiras revelou a existência de uma terceira variação, caracterizada por uma substituição sinônima para o aminoácido D¹⁰⁷. O trabalho de Figtree e colaboradores (2000) utilizando 219 seqüências não incluiu esse sítio em suas análises, portanto, não se conhece nem mesmo a distribuição dos aminoácidos A¹⁰⁷ e D¹⁰⁷ em isolados de outros continentes. Entre as amostras brasileiras, o aminoácido mais frequente é o A¹⁰⁷, e dentre as amostras com o aminoácido D¹⁰⁷, a frequência é semelhante entre os dois possíveis códons. Os nucleotídeos variantes (T³²¹ ou C³²¹) estão em um determinado nível de desequilíbrio de ligação com outros sítios, provavelmente devido à expansão recente dessa espécie na América do Sul (Lim et al., 2005).

A segunda diferença se refere ao sítio 120 cujo polimorfismo no sítio nucleotídico 360 não está presente nos isolados brasileiros caracterizados, ao contrário daqueles da Indonésia, Papua Nova Guiné e Ilhas Salomão, localidades próximas entre si. Assim, não é encontrado nas seqüências brasileiras o aminoácido S¹²⁰. Curiosamente, nesses locais e ainda na China, Coréia do Sul, Agusan del Sur, Morong e Papua Nova Guiné, o sítio 359 é monomórfico, sendo polimórfico para as amostras do Brasil, África, Índia, Sri Lanka e Tailândia.

A Índia é o país que mais se assemelhou ao Brasil com relação ao perfil de polimorfismos. Exceto pelos novos polimorfismos encontrados aqui, e pela diferença entre um dos aminoácidos possíveis para o sítio 190, todos os outros sítios se igualam. Estes isolados são os únicos que possuem exclusivamente a substituição sinônima para o aminoácido K¹³⁰ (AAG), sendo que isolados de outros locais possuem apenas o outro códon (AAA). Para o sítio 190, os dois países são os únicos que apresentam isolados com o aminoácido Q¹⁹⁰. No entanto, para este mesmo sítio, os isolados brasileiros apresentam o aminoácido K¹⁹⁰ enquanto os isolados indianos não apresentam o aminoácido E¹⁹⁰ descrito para nossas amostras brasileiras. Com relação aos sítios 130 e 190, é importante enfatizar que tais sítios não necessariamente estejam relacionados entre si (por desequilíbrio de ligação, por exemplo), mas que estes países/região possuem semelhanças únicas, não encontradas em outros locais.

O Brasil divide outra particularidade com Palawan, uma região das Filipinas localizada a 500 km de Manila. A troca do aminoácido H¹⁹³ por Y¹⁹³ só foi encontrada em isolados destes dois locais. Em Palawan, entre as 17 seqüências disponíveis, apenas duas possuem o aminoácido Y¹⁹³, e elas são idênticas entre si (mesmo haplótipo). No Brasil, são dez as seqüências que o possui, constituindo seis haplótipos diferentes. No Brasil, os dois sítios estão em total desequilíbrio de ligação. Em todas as seqüências, o H¹⁹³ está associado ao aminoácido P²¹⁰, enquanto que o aminoácido Y¹⁹³ está associado ao aminoácido S²¹⁰. Em isolados de Palawan, Y¹⁹³ vem acompanhado de P²¹⁰, mas o segundo aminoácido está presente também em seqüências que contém H¹⁹³. De fato, o aminoácido H¹⁹³ vem acompanhado de P¹⁹³ ou S²¹⁰ em todos os isolados de outros locais onde ambos estão presentes. Novamente, é importante reforçar que isso é mais um indício da expansão recente da espécie no Novo Mundo (Lim et al., 2005).

Para as semelhanças genéticas observadas entre o Brasil, Índia e Palawan citadas acima, não é possível dizer se estas mutações são recentes ou não por se tratarem de substituições raras em isolados de outros países. Existe uma grande possibilidade de serem mutações antigas, considerando a origem asiática de *P. vivax*. No entanto, deve-se considerar a hipótese de elas

terem surgido independentemente, em função da pressão do sistema imune. Entretanto, essa é uma questão difícil de ser respondida.

A análise das seqüências brasileiras revelou que a variabilidade nucleotídica é muito baixa. A diferença de nucleotídeos comparando todas as seqüências par a par não passa de 1,6%. Em todos os locais já previamente estudados, a diversidade nucleotídica variou de 0,8% a 2,4%. Se compararmos as seqüências brasileiras com as de Morong, nas Filipinas (111 seqüências), percebemos que os valores são semelhantes, quase idênticos. Isso mostra que independente do local, a variabilidade nucleotídica é baixa.

A mesma análise (par a par) mostrou, no entanto, que a diversidade genética (haplotípica) é muito alta, da ordem de 91,8%. Essa é uma característica do antígeno AMA-1 onde a maioria das mutações gera mudança de aminoácidos, ou seja, substituições não-sinônimas. As exceções descritas são observadas em amostras da Coreia do Sul onde se observa um evento recente de “bottleneck”, com a reintrodução de malária *vivax* causada por duas populações provenientes da China em 1993 (66%), e isolados de Sri Lanka, Indonésia e Ilhas Salomão, onde cada seqüência determinou um haplótipo diferente (100%). Nos outros locais essa taxa variou de 80% a 96%.

Na maioria dos genes codificadores de proteínas, a taxa de substituições sinônimas (silenciosas) é bem maior que a taxa de substituições não-sinônimas (alteração de aminoácidos), uma condição conhecida como seleção purificadora (Verra & Hughes, 2000). O padrão oposto presente em AMA-1 e em outras proteínas de superfícies de esporozoítos e merozoítos, como a CSP (Proteína Circum-esporozóita), TRAP (Proteína de Superfície de Esporozoíto 2) e MSA-2 (Antígeno de Superfície de Merozoíto 2) (Hughes e Hughes, 1995) é mais um indicativo de que há uma pressão seletiva nos epitopos para reconhecimento dos anticorpos, gerando uma seleção diversificadora positiva (Hughes & Nei, 1988; Verra & Hughes, 2000). Um estudo utilizando o gene *PfAMA-1* evidenciou que a diferença entre os valores de d_N e d_S foi significativa (Hughes e Hughes, 1995). Além disso, percebeu-se que a maioria das substituições não-sinônimas envolvia a troca de carga do aminoácido e conservação da polaridade, principalmente no domínio extracelular fortalecendo as evidências da existência de uma seleção diversificadora positiva necessária para a evasão do sistema imune nas

infecções por *P. falciparum* (Hughes e Hughes, 1995). No entanto, para o gene *PvAMA-1*, o valor de d_N não é significativamente maior que d_S . Isso não significa que não exista nenhuma força atuando sobre esse gene, afinal, o número de substituições não-sinônimas é visivelmente maior que o número de substituições sinônimas no domínio I. Infelizmente, não foi possível através de nosso e outros estudos (Figtree et al., 2000) determinar qual tipo de seleção está atuando sobre esse gene.

As análises realizadas para isolados de cada estado brasileiro e a comparação entre eles revelaram extensa similaridade entre os mesmos. Isso significa que possivelmente há grande fluxo gênico entre as populações de *P. vivax* no território brasileiro, já que não há barreiras geográficas isolando grupos de populações em determinadas regiões. Este fato é visível através da análise filogenética, onde não é possível agrupar as seqüências por local de origem. Esse resultado foi confirmado pelos cálculos de *Fst*, onde se observou que não há diferenças significativas entre os estados. A comparação entre as amostras brasileiras e as amostras dos três outros continentes revelou que há menos diversidade no Brasil que para os isolados de outros continentes. Quando a diversidade entre os estados brasileiros foi comparada à diversidade entre os países, esta mostrou-se baixa sendo este resultado confirmado pelo cálculo de *Fst*. Nossos resultados indicam que o *P. vivax* é menos diverso na América do Sul quando comparado aos outros continentes. A baixa diversidade do gene *PvAMA-1* vista nos isolados brasileiros e a semelhança entre os estados incluídos neste estudo suportam as evidências de que *P. vivax* se dispersou recentemente no continente americano. A diferenciação entre isolados de diferentes regiões requer um tempo evolutivo considerável para fixação de alelos. Por esta razão, a diversidade genética verificada para as populações asiáticas de *P. vivax* é significativamente maior do que a diversidade verificada no Brasil.

Associação entre resíduos polimórficos e aspectos da morbidade

Tem sido observado que a maioria dos pacientes infectados tanto por *P. vivax* quanto por *P. falciparum* desenvolvem plaquetopenia durante a infecção malárica (Wickramasinghe et al., 2000). Sabe-se que a plaquetopenia está

associada a uma hiperdestruição periférica de plaquetas, já que a produção de megacariócitos na medula óssea permanece normal ou ligeiramente estimulada, com o aumento no número dessas células liberadas e a presença de promegacariócitos (Beale et al., 1972; Horstmann et al., 1981; Wilson et al., 1982). No entanto, as plaquetas, ainda jovens, são destruídas. O aumento dessa destruição periférica pode ser justificado por vários mecanismos, que podemos classificar como imunes ou não imunes.

Os mecanismos não imunes incluem, dentre outros, o consumo de plaquetas pela coagulação intravascular disseminada (CID) (Devakul et al., 1966; Dennis et al., 1966). A CID é definida como uma síndrome adquirida, caracterizada pela ativação difusa da coagulação intravascular, levando à formação e deposição de fibrina na microvasculatura, podendo levar à oclusão dos vasos e conseqüente comprometimento da irrigação sangüínea de diversos órgãos (Kasper et al., 2006). Porém, essa hipótese não é aceita para explicar a plaquetopenia na malária tendo sido, então, descartada (Beale et al., 1972).

Outras hipóteses não imunes incluem o estresse oxidativo, onde os radicais livres do oxigênio poderiam ter um papel importante nos danos estruturais e funcionais das plaquetas (Erel et al., 2001) bem como na morte das plaquetas mediada por caspase (Piguet et al., 2002).

Mecanismos imunes potencialmente aptos a destruir plaquetas incluem a participação de imunocomplexos formados na membrana da plaqueta (Kelton et al., 1983). Foi descrito que antígenos maláricos ligam-se à superfície das plaquetas, deslocando os sítios de ligação dos anticorpos específicos PAIgG (receptores Fc) de forma competitiva (Kelton et al., 1983). Em seguida, anticorpos IgG se ligam a antígenos que se encontram na superfície das plaquetas, formando imunocomplexos. Dessa forma, as plaquetas perdem a sua função e são fagocitadas. As mudanças ultra-estruturais frequentemente observadas incluem centralização dos grânulos, interação plaqueta-plaqueta e agregação espontânea; algumas plaquetas ainda apresentam degranulação (Monhanty et al., 1982). Além disso, anticorpos anti-plaquetas (PAIgG) apresentam níveis aumentados durante a infecção, e podem participar desta destruição (Kelton et al., 1983).

Alguns estudos mostram que não há correlação entre o grau de parasitemia e a contagem de plaquetas em pacientes com infecção aguda (Beale et al., 1972; Skudowitz et al., 1973; Monhanty et al., 1882). Entretanto, este ainda é um assunto controverso que merece atenção e melhor caracterização. Neste trabalho, níveis normais de plaquetas estiveram fortemente correlacionados à baixas parasitemias por *P. vivax*. Essa correlação pode ser explicada se consideramos a resposta de anticorpos dirigida contra componentes do parasito com conseqüente formação de imunocomplexos na superfície da plaqueta. Em outras palavras, quanto maior o nível de parasitos circulantes, maior seria a presença de antígenos maláricos circulantes e a produção de anticorpos específicos e, dessa forma, maior dano plaquetário seria observado. Entretanto, até o momento nenhum trabalho havia definido a participação de polimorfismos do parasito na determinação da plaquetopenia.

A presença dos aminoácidos Y¹⁹³/S²¹⁰ mostrou-se associada a níveis normais de plaquetas, independentemente do efeito da parasitemia. Como estes resíduos estão em desequilíbrio de ligação, não é possível determinar qual aminoácido, Y¹⁹³ ou S²¹⁰, está verdadeiramente associado aos níveis normais de plaquetas, ou se ambos estão. De fato, é também difícil determinar um efeito direto do antígeno AMA-1 contendo os dois resíduos já que a associação com outros antígenos maláricos pode contribuir para essa característica clínica.

Desta forma, nosso trabalho propõe um mecanismo cepa-dependente, relacionado ao polimorfismo no gene *PvAMA-1* na determinação de parâmetros associados à morbidade. Parasitos que apresentariam os resíduos Y¹⁹³/S²¹⁰ seriam menos imunogênicos e desencadeariam uma resposta de anticorpos menos pronunciada do que aquela que se observaria em infecções causadas por parasitos que apresentariam os resíduos H¹⁹³/P²¹⁰. A diminuição da resposta de anticorpos levaria à baixa formação de imunocomplexos. Assim, um menor número de plaquetas seria destruído por fagocitose. Contrariamente, indivíduos infectados com populações contendo os resíduos H¹⁹³/P²¹⁰ apresentariam uma resposta maior de anticorpos, formando um número maior de imunocomplexos e, conseqüentemente, um alto número de plaquetas seria destruído, causando a plaquetopenia.

Concluindo, o gene *PvAMA-1* possui resíduos específicos de aminoácidos que poderiam estar associados a níveis normais de plaquetas provavelmente devido a um decréscimo na formação de imunocomplexos pela falta de reconhecimento específico desses resíduos pelos anticorpos. Dessa forma, um mecanismo cepa específico para a plaquetopenia poderia estar envolvido. De fato, um estudo recente mostrou que a diferença em um único aminoácido em um sítio polimórfico específico é suficiente para que o sistema imune perca a capacidade de reconhecimento antigênico (Coley et al., 2006).

Este é o primeiro estudo que demonstrou a possibilidade da participação do polimorfismo do parasito na plaquetopenia em infecções agudas por *P. vivax*. Substituições específicas em dois sítios polimórficos dentro do domínio I estariam associadas à proteção corroborando a idéia de que os polimorfismos de AMA-1 podem diminuir a eficácia de uma vacina anti-malárica baseada nesta molécula (Coley et al., 2006). Estudos ainda são necessários para confirmar esta correlação em outras áreas e também para confirmar o mecanismo proposto a partir de estudos *in vitro* utilizando plaquetas e anticorpos com diferentes especificidades.

7. CONCLUSÕES

- As amostras brasileiras apresentaram 10 novos sítios nucleotídicos polimórficos, incluindo duas mutações sinônimas, que geraram 7 mudanças de aminoácidos.
- Os sítios polimórficos 193 e 210 apresentaram-se em total desequilíbrio de ligação, característica não encontrada nos outros continentes.
- As populações de *P. vivax* circulantes no Brasil apresentam baixa diversidade genética quando comparada à diversidade de populações africanas, asiática e da Oceania.
- Foi vista uma correlação negativa entre a parasitemia e contagem de plaquetas nas amostras brasileiras.
- Determinados resíduos de aminoácidos polimórficos mostraram-se fortemente associados à contagem de plaquetas circulantes em pacientes com malária vivax, indicando que PvAMA-1 pode ser um indicador molecular de morbidade.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Anders, RF, McColl, DJ, Coppel, RL. Molecular variation in *Plasmodium falciparum*: polymorphic antigens of asexual erythrocytic stages. **Acta Trop.**, 1993, 53:239-53

Anders RF, Crewther PE, Edwards S, Margetts M, Matthew ML, Pollock B, Pye D. Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. **Vaccine**, 1998, 16(2-3):240-247.

Bannister LH, Hopkins JM, Dluzewski AR, Margos G, Williams IT, Blackman MJ, Kocken CH, Thomas AW, Mitchell GH. *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (PfAMA-1) is translocated within micronemes along subpellicular microtubules during merozoite development. **J. Cell Sci.**, 2003, 116(18):3825-3834

Beale PJ, Cormack JD, Oldrey TBN. Thrombocytopenia in malaria with immunoglobulin (IgM) changes. **Brit. Med. J.**, 1972; 1:345-349

Carlini ME, White AC Jr, Atmar RL. *Vivax* malaria complicated by adult respiratory distress syndrome. **Clin. Infect. Dis.**, 1999, 28(5):1182-83

Carter R, Mendis KN. Evolutionary and historical aspects of the burden of malária. **Clin. Microbiol. Rev.**, 2002, 15(4):564-94

Carter R. Speculations on the origins of *Plasmodium vivax* malaria. **Trends Parasitol.**, 2003, 19(5):214-19

Cheng Q, Saul A. Sequence analysis of the apical membrane antigen I (AMA-1) of *Plasmodium vivax*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 1994, 65:183-7

Chung, JY, Chun EH, Chun JH, Kho WG. Analysis of the *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 gene from re-emerging Korean isolates. **Parasitol. Res.**, 2003, 90:325-329

Cogswell FB. The hypnozoite and relapse in primate malaria. **Clin. Microbiol. Rev.**, 1992, 5(1):26-35

Coley AM, Parisi K, Masciantonio R, Hoeck J, Casey JL, Murphy VJ, Harris KS, Batchelor AH, Andres RF, Foley M. The most polymorphic residue on *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 determines binding of an invasion-inhibitory antibody. **Infect. Immun.**, 2006; 74:2628-2636

- Contamin H, Behr C, Mercereau-Puijalon O, Michel J. *Plasmodium falciparum* in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*): infection of non-splenectomised animals as a model for exploring clinical manifestations of malaria. **Microbes Infect.**, 2000, 2(8):945-54
- Cornejo OE, Escalante AA. The origin and age of *Plasmodium vivax*. **Trends Parasitol.**, 2006, 22(12):558-63
- Cortés A, Mellombo M, Mueller I, Benet A, Reeder JC, Anders RF. Geographical structure of diversity and differences between symptomatic and asymptomatic infections for *Plasmodium falciparum* vaccine candidate AMA1. **Infec. Immun.**, 2003, 71(3):1416-1426
- Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**, 2006, 124:755-766
- Craig, AA, Kain, KC, Molecular Analysis of Strains of *Plasmodium vivax* from Paired Primary and Relapse Infections. **J. Infec. Dis.**, 1996, 174:373-9
- Crewther PE, Culvenor JG, Silva A, Cooper JA, Anders RF. *Plasmodium falciparum*: two antigens of similar size are located in different compartments of the rhoptry. **Exp. Parasitol.**, 1990, 70:193-206
- Crewther PE, Matthew MLSM, Flegg, RH, Anders RF. Protective immune response to apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* involve recognition of strain-specific epitopes. **Infec. Immun.**, 1996, 64(8):3310-3317
- Cui, L, Escalante AA, Imwong M, Snounou G. The genetic diversity of *Plasmodium vivax* populations. **Trends Parasitol.**, 2003, 19(5):220-226
- De Castro, MC, Singer BH. Was malaria present in the Amazon before the European conquest? Available evidence and future research agenda. **J. Archaeol. Sci.**, 2005, 32:337-340
- Deans JÁ, Alderson T, Thomas AW, Mitchell GH, Lennox ES, Cohen S. Rat monoclonal antibodies which inhibit the *in vitro* multiplication of *Plasmodium knowlesi*. **Clin. Exp. Immunol.**, 1982, 49:297-309
- Deans JA, Knight AM, Jean WC, Waters AP, Cohen S, Mitchell GH. Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, *Plasmodium knowlesi* 66 kD merozoite antigen. **Parasite Immunol.**, 1988, 10(5):535-552.
- Dennis LH, Eichelberger JW Jr, Conrad ME, Von Doenhoff AE Jr. A coagulation defect and its treatment with heparin in *Plasmodium knowlesi* malaria in rhesus monkeys. **Mil. Med.**, 1966, 131(9):1107-10.
- Devakul K, Harinasuta T, Reid HA. 125-I-labelled fibrinogen in cerebral malaria. **Lancet**, 1966, 2:886-8

Dyer M, Day KP. Commitment to gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. **Parasitol. Today**, 2000, 16(3):102-107

Dutta S, Malhotra P, Chauhan VS. Sequence analyses of apical membrane antigen-1 (AMA-1) of *Plasmodium cinomolgi bastianelli*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 1995, 73:267-70

Erel O, Vural H, Aksoy N, Aslan G, Ulukanligil M. Oxidative stress of platelets and thrombocytopenia in patients with *vivax* malaria. **Clin. Biochem.**, 2001; 34:341-344

Escalante AA, Cornejo OE, Freeland DE, Poe AC, Durrego E, Collins WE, Lal AA. A monkey's tale: the origin of *Plasmodium vivax* as a human malaria parasite. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 2005, 102(6):1980-1985

Ewing B, Hillier L, Wendl M, Green P: Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Gen. Res.**, 1998, 8:175-185

Feng ZP, Keizer DW, Stevenson RA, Yao S, Babon JJ, Murphy VJ, Anders RF, Norton RS. Structure and inter-domain interactions of domain II from the blood-stage malarial protein, apical membrane antigen 1. **J. Mol. Biol.**, 2005, 350:641-656

Figtree M, Pasay, CJ, Slade, R, Cheng Q, Cloonan N, Walker J, Saul A. *Plasmodium vivax* synonymous substitution frequencies, evolution and population structure deduced from diversity in AMA1 and MSP1 genes. **Mol. Bio. Parasitol.**, 2000,108:53-66

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

Gaffar, FR, Yatsuda, AP, Franssen FFJ, de Vries, E. Erythrocyte invasion by *Babesia bovis* merozoites is inhibited by polyclonal antisera directed against peptides derived from a homologue of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. **Infec. Immun.**, 2004, 72(5):2947-2955

Galinski MR, Barnwell JW. *Plasmodium vivax*: merozoítos, invasion of reticulocytes and considerations for malaria vaccine development. **Parasitol. Today**, 1996, 12:20-9

Garnham, PCC. Malaria Parasites and Other Haemosporidia. 1966. Blackwell Scientific, Oxford

Gordon D, Abajian C, Green P: Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Gen. Res.**, 1998, 8:195-202

Green, P. Phrap sequence assembly program. Version 0.96073.1. University of Washington, Seattle, 1998.

Gupta A, Bai T, Murphy V, Strike P, Anders RF, Batchelor, AH. Refolding, purification, and crystallization of apical membrane antigen 1 from *Plasmodium falciparum*. **Prot. Exp. Purif.**, 2005, 41:186-198

Han ET, Park JH, Shin EH, Choi MH, Oh MD, Chai JY. Apical membrane antigen-1 (AMA-1) gene sequences of re-emerging *Plasmodium vivax* in South Korea. **Kor. J. Parasitol.**, 2002, 40(3):157-162

Hay SI, Guerra, CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW. The global distribution at risk of malaria: past, present and future. **Infec. Dis.**, 2004, 4:327-36

Healer J, Murphy V, Hodder AN, Masciantonio R, Gemmil AW, Anders, RF, Cowman AF, Batchelor A. Allelic polymorphism in apical membrane antigen-1 are responsible for evasion of antibody-mediated inhibition in *Plasmodium falciparum*. **Mol. Microbiol.**, 2004, 52(1):159-68

Hehl AB, Lekutis, C, Grigg ME, Bradley PJ, Drubemetz JF, Ortega-Barria E, Boothroyd, JC. *Toxoplasma gondii* homologue of *Plasmodium* apical membrane antigen 1 is involved in invasion of host cells. **Infec. Immun.**, 2000, 68(12):7078-7086

Hodder AN, Crewther PE, Mattew MLSM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Anders, RF. The disulphide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. **J. Biol. Chem.**, 1996, 271:29446-52

Hodder AN, Crewther PE, Andres RF. Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1. **Infec. Immun.**, 2001, 69:3286-94

Horstmann RD, Dietrich M, Bienzle U, Rasche H. Malaria-induced thrombocytopenia. **Blut.**, 1981,42(3):157-64.

Howell, SA, Withers-Martinez C, Kocken CHM, Thomas AW, Blackman MJ. Proteolytic processing and primary structure of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1. **J. Biol. Chem.**, 2001, 276(33):31311-31320

Hughes MK, Hughes AL. Natural selection on *Plasmodium* surface proteins. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 1995, 71(1):99-113

Hughes, AL, Nei, M. Pattern of nucleotide substitution at MHC class I loci reveals overdominant selection. **Nature**, 1988, 335:167-70

Jongwutiwes S, Putaporntip C, Iwasaki T, Ferreira MU, Kanbara H, Hughes AL. Mitochondrial genome sequences support ancient population expansion in *Plasmodium vivax*. **Mol. Biol. Evol.**, 2005, 22(8):1733-9

Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules. In H. N. Munro, ed., *Mammalian Protein Metabolism*, 1969, pp. 21-132, Academic Press, New York. Kappe SHI, Adams JH. Sequence analyses of the apical membrane antigen-1 genes (AMA-1) of *Plasmodium yoelli yoelli* and *Plasmodium berghei*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 1996, 78:279-83

Karunaweera ND, Grau GE, Gamage P, Carter R, Mendis KN. Dynamics of fever and serum levels of tumor necrosis factor are closely associated during clinical paroxysms in *Plasmodium vivax* malaria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1992, 89(8):3200-3.

Kasper, DL, Braunwald, E, Fauci, AS, Hauser, SL, Longo, DL, Jamerson, L, Isselbacher, KJ. Harrison: Medicina Interna, 2006, 16^a edição. Editora: McGraw-Hill

Kato K, Mayer DCG, Singh S, Reid M, Miller LH. Domain III of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 binds to the erythrocyte membrane protein Kx. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 2005, 102(15):5552-5557

Kelton JG, Keystone J, Moore J, Denomme ET, Glynn M, Neame PB, Gauldie J, Jensen J. Immune-mediated thrombocytopenia of malaria. **J. Clin. Invest.**, 1983; 71:832-836

Kimura M, Kaneko O, Liu Q, Zhou M, Kawamoto F, Wataya Y, Otani S, Yamaguchi Y, Tanabe K. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. **Parasitol. Intern.**, 1997,46:91-5

Kirchgatter K. and del Portilho HA. Molecular Analyses of *Plasmodium vivax* Relapses Using the MSP1 Molecule as a Genetic Marker. **J. Infect. Dis.**, 1998, 177:511-5

Kocken CH, Narum DL, Massougboji A, Ayivi B, Dubbeld MA, van der Wel A, Conway DJ, Sanni A, Thomas AW. Molecular characterization of *Plasmodium reichenowi* apical membrane antigen-1 (AMA-1), comparison with *P. falciparum* AMA-1, and antibody-mediated inhibition of red cell invasion. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 2000, 109(2):147-56.

Kocken CH, Withers-Martinez C, Dubbeld MA, van der Wel A, Hackett F, Valderrama A, Blackman MJ, Thomas AW. High-level expression of the malaria blood-stage vaccine candidate *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and induction of antibodies that inhibit erythrocyte invasion. **Infect. Immun.**, 2002, 70(8):4471-4476.

Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3.1. Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Brief. Bioinform.**, 2004, 5:150-163.

Leclerc MC, Hugot JP, Durand P, Renaud F. Evolutionary relationships between 15 *Plasmodium* species from new and old world primates (including humans): an 18S rDNA cladistic analysis. **Parasitol.**, 2004, 129(6):677-84

Leclerc Y, Verreault J, Bisson G. Diffuse lung uptake of technetium-99m sulfur colloid in malaria. **J. Nucl. Med.**, 1989, 30(1):117-9..

- Lim CS, Tazi L, Ayala FJ. *Plasmodium vivax*: recent world expansion and genetic identity to *Plasmodium simium*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 2005, 102(43):15523-8.
- Livingstone FB. The Duffy blood groups, *vivax* malaria, and malaria selection in human populations: a review. **Hum. Biol.**, 1984, 56(3):413-425
- Marshall VM, Peterson MG, Lew AM, Kemp, DJ. Structure of the apical membrane antigen-1 (AMA-1) of *Plasmodium chabaudi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 1989, 37:281-284
- Marshall VM, Zhang L, Anders RF, Coppel RL. Diversity of the vaccine candidate AMA-1 of *Plasmodium falciparum*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 1996, 77:109-13
- Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 2001, 64(1-2 Suppl):97-106.
- Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. **Nature**. 2002, 415(6872):673-9.
- Mitchell GH, Thomas AW, Margos G, Dluzewski AR, Bannister LH. Apical Membrane Antigen 1, a Major Malaria Vaccine Candidate, Mediates the Close Attachment of Invasive Merozoites to Host Blood Cells. **Infect. Immun.**, 2004, 72:154-8
- Monhanty D, Marwaha N, Ghosh K, Sharma S, Garewal G, Shah S, Devi S, Dasa, KC. Functional and ultrastructural changes of platelets on malaria infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 1988; 82:369-375
- Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Rodrigues A. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. **Science**, 2001, 291 (5501):141-4
- Mu J, Joy DA, Duan J, Huang Y, Carlton J, Walker J, Barnwell J, Beerli P, Charleston MA, Pybus OG, Su XZ. Host switch leads to emergence of *Plasmodium vivax* malaria in humans. **Mol. Biol. Evol.**, 2005, 22(8):1686-93.
- Nair M, Hinds MG, Coley AM, Hodder AN, Foley M, Anders RF, Norton RS. Structure of domain III of the blood-stage malaria vaccine candidate, *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1). **J. Mol. Bio.**, 2002, 322:741-753
- Narum DL, Thomas AW. Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1: an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 1994, 67:59-68

Narum DL, Ogun SA, Thomas AW, Holder AA. Immunization with parasite-derived apical membrane antigen 1 or passive immunization with a specific monoclonal antibody protects BALB/c mice against lethal *Plasmodium yoelii yoelii* YM blood-stage infection. **Infec. Immun.**, 2000, 68(5):2899-906.

Nei M, Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. **Mol. Biol. Evol.**, 1986, 3:418-426

Oh M, Shin H, Shin D, Kim U, Lee S, Kim N, Choi M, Chai J, Choe K. Clinical features of *vivax* malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 2001; 65:143-146

Oliveira DA, Udhayakumar V, Bloland P, Shi YP, Nahlen, BL, Oloo AJ, Hawley WE, Altaf AL. Genetic conservation of the *Plasmodium falciparum* membrane antigen-1 (AMA-1). **Mol. Biochem. Parasitol.**, 1996, 76:333-36

Peterson MG, Marshall VM, Smythe JA, Crewther PE, Lew A, Silva A, Andres RF, Kemp, DJ. Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. **Mol. Cell. Biol.**, 1989, 9(7):3151-3154

Peterson MG, Nguyen-Dinh P, Marshall VM, Elliot JF, Collins WE, Andres RF, Kemp DJ. Apical membrane antigen of *Plasmodium fragile*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 1990, 39:279-84

Piguet PF, Kan CD, Vesin C. Thrombocytopenia in an animal model of malaria is associated with an increased caspase-mediated death of thrombocytes. **Apoptosis**, 2002, 7:91-98

Pizarro JC, Normand BV, Chesne-Seck ML, Collins CR, Withers-Martinez C, Hackett F, Blackman MJ, Faber BW, Remarque EJ, Kocken CHM, Thomas AW, Bentley GA. Crystal Structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. **Science**, 2005, 308:408-411

Polley SD, Chokejindachai W, Conway DJ. Allele frequency-based analysis robustly map sequences sites under balancing selection in malaria vaccine candidate antigen. **Genetics**, 2003, 165:555-561

Renia L, Ling IT, Marussig M, Miltgen F, Holder AA, Mazier D. Immunization with a recombinant C-terminal fragment of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein I protects mice against homologous but not heterologous *P. yoelii* sporozoite challenge. **Infec. Immun.**, 1997, 65:4419-4423

Riley EM, Wagner GE, Ofori MF, Wheeler JG, Akanmori BD, Tetteh K, McGuinness D, Bennett S, Nkrumah FK, Anders RF, Koram KA. Lack of association between maternal antibody and protection of African infants from malaria infection. **Infec. Immun.**, 2000, 68:5856-5863

Rodrigues MH, Rodrigues KM, Oliveira TR, Comodo AN, Rodrigues MM, Kocken CH, Thomas AW, Soares IS. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. **Intern. J. Parasitol.**, 2005, 35:185-192

- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinf.**, 2003, 19: 2496-2497
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, 1987, 4:406-425.
- Sanders PR, Gilson PE, Canti GT, Greenbaum DC, Nebl T, Carucci DJ, McConville MJ, Schofield L, Hodder AN, Yates JR, III, Crabb BS. Distinct protein classes including novel merozoite surface antigens in Raft-like membranes of *Plasmodium falciparum*. **J. Biol. Chem.**, 2005, 280:40169-40175
- Sanguinetti, CJ, Neto, ED, and Simpson, AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. **Biotech.**, 1994, 17:915-9
- Scopel, KKG. Infecção assintomática por *Plasmodium* sp. na amazônia brasileira: detecção por PCR e resposta de anticorpos anti-proteína 1 de merozoítos de *Plasmodium falciparum*. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2003, T2036
- Silvie O, Franetich JF, Charrin S, Mueller MS, Siau A, Bodescot M, Rubinstein E, Hannoun L, Charoenvit Y, Kocken CH, Thomas AW, Van Gemert GJ, Sauerwein RW, Blackman MJ, Anders RF, Pluschke G, Mazier D. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. **J. Biol. Chem.**, 2004, 279(10):9490-9496
- Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica em Malária (SIVEP), 2005. <http://portal.saude.gov.br/saude>
- Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica em Malária (SIVEP), 2006. <http://portal.saude.gov.br/saude>
- Skudowitz RB, Katz J, Lirie A, Levin J, Metz J. Mechanisms of thrombocytopenia in malignant tertian malaria. **Brit. Med. J.**, 1973; 2:515-517
- Stowers AW, Kennedy MC, Keegan BP, Saul A, Long CA, Miller LH. Vaccination of monkeys with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 confers protection against blood-stage malaria. **Infect. Immun.**, 2002, 70(12):6961-6967.
- Sturm A, Amino R, Van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok J, Menard R, Heussler VT. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, 2006, 313:1287-1290
- Svenson JE, MacLean JD, Gyorkos TW, Keystone J. Imported malaria clinical presentation and examination of symptomatic travelers. **Arch. Intern. Med.**, 1995, 155:861-8

Thomas AW, Deans JA, Mitchell GH, Alderson T, Cohen, S. The Fab fragments of monoclonal IgG to a merozoite surface antigen inhibit *Plasmodium knowlesi* invasion of erythrocytes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 1984, 13:187-99.

Thomas AW, Waters AP, Carr D. Analyses of variation in PF83, an erythrocytic merozoite vaccine candidate antigen of *Plasmodium falciparum*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 1990, 42:285-88

Thompson JD, Higgins DG, Gibson, TJ. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, 1994, 22:4680

Torres JR, Perez H, Postigo MM, Silva JR. Acute non-cardiogenic lung injury in benign tertian malaria. **Lancet**, 1997, 350(9070):31-2.

Triglia, T, Healer, J, Caruana, SR, Hodder, NA, Anders, RF, Crabb, BS, Cowman, AF. Apical Membrane Antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. **Mol. Microbiol.**, 2000, 38(4):706-18

Verra F, Hughes AL. Evidence for ancient polymorphism at the Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1) locus of *Plasmodium falciparum*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 2000, 105:149-53

Waters AP, Thomas AW, Deans JA, Mitchell GH, Hudson DE, Miller LH, McCutchan TF, Cohen S. A merozoite receptor protein from *Plasmodium knowlesi* is highly conserved and distributed throughout *Plasmodium*. **J. Biol. Chem.**, 1990, 265(29):17974-17979

Wickramasinghe SN, Abdalla SH. Blood and bone marrow changes in malaria. **Best Pract. Res. Clin. Haematol.**, 2000; 13:277-299

Wilson JJ, Neame PB, Kelton JG. Infection-induced thrombocytopenia. **Semin. Thromb. Hemost.**, 1982, 8(3):217-33.

World Healthy Organization (WHO), 2005. www.who.org

9. Anexos

Questionário padrão aplicados aos pacientes atendidos no Hospital Júlio Müller da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

PROTOCOLO DE ACOMPANHAMENTO DE TRATAMENTO DE PACIENTES COM MALÁRIA - HUJM			
Número:	Data: ___/___/___	Nome:	
Endereço de residência (colocar 3 pontos de referência):			
Rua:			
Bairro	<input type="checkbox"/> Cuiabá <input type="checkbox"/> V. Grande <input type="checkbox"/> Outro		
Fone 1:	Fone 2:	Fone 3:	Fone 4:
Solicitar outros nomes e endereços de pessoas para facilitar a localização:			
Idade:	Sexo: 1 <input type="checkbox"/> M 2 <input type="checkbox"/> F	Cor: 1 <input type="checkbox"/> Branca 2 <input type="checkbox"/> Negra 3 <input type="checkbox"/> Amarela 4 <input type="checkbox"/> Parda	
Escolaridade: 1 <input type="checkbox"/> analfabeto 2 <input type="checkbox"/> 1º grau 3 <input type="checkbox"/> 2º grau 4 <input type="checkbox"/> 3º grau			Ocupação:
Se mulher, possibilidade de gestação? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Pretende viajar nos próximos 30 dias? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Pretende viajar nos próximos 6 meses? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N		Quantas malárias já teve na vida?	
Idade da primeira malária:	Há quanto tempo teve a última malária (em meses)?		
Viajou para área endêmica após o último tratamento? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Tomou corretamente a medicação da última malária? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Teve diarreia ou vômito durante o tratamento? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Espécie da última malária: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> V 3 <input type="checkbox"/> Mista			
Espécies que já teve já vida: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> V 3 <input type="checkbox"/> Mista 4 <input type="checkbox"/> Não sabe			
Quanto tempo você viveu em área endêmica (especificar de foi permanente ou esporádica) (em dias):			
Usou algum medicamento nos últimos 10 dias? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N		Quais?	
Há quantos dias está com sintomas?		<input type="checkbox"/> Febre <input type="checkbox"/> Calafrio <input type="checkbox"/> Sudorese <input type="checkbox"/> Cefaléia <input type="checkbox"/> Mialgia <input type="checkbox"/> Artralgia <input type="checkbox"/> Epigastralgia <input type="checkbox"/> Tontura <input type="checkbox"/> Náusea <input type="checkbox"/> Vômito <input type="checkbox"/> Fraqueza <input type="checkbox"/> Hiporexia <input type="checkbox"/> Colúria	
Febre nos últimos 7 dias? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N		Temperatura axilar se tiver com febre hoje:	
Febre nos últimos 30 dias? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Em qual município pegou malária?			UF:
Deixou de fazer atividades por causa da malária? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Principais achados físicos:			

Peso (Kg):		Baço palpável: 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N – a _____ cm do RCE	
Resultado da gota: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> V 3 <input type="checkbox"/> Mista 4 <input type="checkbox"/> Neg		Parasitemia/200 campos:	
Optimal: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> NF 3 <input type="checkbox"/> Neg		Outro TDR: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> NF 3 <input type="checkbox"/> Neg	Hemograma: 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N
Papel-Filtro 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N	Guanidina: 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N	DNA: 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N	Soro: 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N
Fezes: 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Tratamento: <input type="checkbox"/> Cloroquina <input type="checkbox"/> Mefloquina <input type="checkbox"/> Primaquina <input type="checkbox"/> Doxicilina <input type="checkbox"/> Quinina <input type="checkbox"/> Artesunato Esquemas (dose e tempo):			
Conclusão do caso: 1 <input type="checkbox"/> Primoinfecção 2 <input type="checkbox"/> Recrudescência 3 <input type="checkbox"/> Reacaída 4 <input type="checkbox"/> Reinfecção			

AValiação DO TRATAMENTO APÓS 7 DIAS (D7)

Resultado gota: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> V 3 <input type="checkbox"/> Mista 4 <input type="checkbox"/> Neg		Parasitemia/200 campos:	
Outro exame:		Viajou para área endêmica? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N	
Diarréia ou vômito até a 1ª hora de medicação? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N		Houve melhora dos sintomas acima: <input type="checkbox"/> Completa <input type="checkbox"/> Parcial <input type="checkbox"/> Nenhuma <input type="checkbox"/> Piora	

AValiação DO TRATAMENTO APÓS 14 DIAS (D14)

Resultado gota: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> V 3 <input type="checkbox"/> Mista 4 <input type="checkbox"/> Neg		Parasitemia/200 campos:	
Outro exame:		Viajou para área endêmica? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N	
Diarréia ou vômito até a 1ª hora de medicação? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N		Houve melhora dos sintomas acima: <input type="checkbox"/> Completa <input type="checkbox"/> Parcial <input type="checkbox"/> Nenhuma <input type="checkbox"/> Piora	

AValiação DO TRATAMENTO APÓS 21 DIAS (D21)

Resultado gota: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> V 3 <input type="checkbox"/> Mista 4 <input type="checkbox"/> Neg		Parasitemia/200 campos:	
Outro exame:		Viajou para área endêmica? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N	
Diarréia ou vômito até a 1ª hora de medicação? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N		Houve melhora dos sintomas acima: <input type="checkbox"/> Completa <input type="checkbox"/> Parcial <input type="checkbox"/> Nenhuma <input type="checkbox"/> Piora	

AValiação DO TRATAMENTO APÓS 28 DIAS (D28)

Resultado gota: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> V 3 <input type="checkbox"/> Mista 4 <input type="checkbox"/> Neg		Parasitemia/200 campos:	
Outro exame:		Viajou para área endêmica? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N	
Diarréia ou vômito até a 1ª hora de medicação? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N		Houve melhora dos sintomas acima: <input type="checkbox"/> Completa <input type="checkbox"/> Parcial <input type="checkbox"/> Nenhuma <input type="checkbox"/> Piora	