

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DO AMAZONAS

**ANÁLISE DO PERFIL GENÉTICO DE MARCADORES DE  
RESISTÊNCIA A ANTIMALÁRICOS EM ISOLADOS DE  
CAMPO DE *P. falciparum* E *P. vivax* DE 12 LOCALIDADES  
MALARÍGENAS DO ESTADO DO AMAZONAS**

CYNTHIA DE OLIVEIRA FERREIRA

MANAUS

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DO AMAZONAS

CYNTHIA DE OLIVEIRA FERREIRA

**ANÁLISE DO PERFIL GENÉTICO DE MARCADORES DE  
RESISTÊNCIA A ANTIMALÁRICOS EM ISOLADOS DE  
CAMPO DE *P. falciparum* E *P. vivax* DE 12 LOCALIDADES  
MALARÍGENAS DO ESTADO DO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao  
programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia da Universidade  
Federal Do Amazonas, como  
requisito parcial para a obtenção do  
título de Mestre em Biotecnologia.

ORIENTADOR: Dr. PEDRO PAULO RIBEIRO VIEIRA

COLABORADORES: Dr. MARIA DAS GRAÇAS COSTA ALECRIM  
MONICA REGINA COSTA, Msc.

MANAUS

2007

Ficha Catalográfica  
(Catalogação na fonte realizada pela Biblioteca Central – UFAM)

Ferreira, Cynthia de Oliveira

F383a Análise do perfil genético de marcadores de resistência a antimaláricos em isolados de campo de *P. falciparum* e *P. vivax* de 12 localidades malarígenas do Estado do Amazonas / Cynthia de Oliveira Ferreira. - Manaus: UFAM, 2007.

126 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2007.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Paulo Ribeiro Vieira

1. Malária - Diagnóstico 2. Malária – Resistência - Avaliação I. Vieira, Pedro Paulo Ribeiro II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 614.449(811.3)(043.3)

**BANCA EXAMINADORA:**

**PROF. DR. PEDRO PAULO RIBEIRO VIEIRA (FMTAM)**

**PROF. DR. MARIANO GUSTAVO ZALIS (UFRJ)**

**PROF. DR. WALTER MARTIN ROLAND OELEMANN (UFRJ)**

**PROFESSOR CONVIDADO:**

**PROF. DR. PEDRO VÍTOR CRAVO (UNL/CMDT)**

## **Dedicatória**

A Deus, razão maior de minha existência.

À minha filha amada Beatriz, razão de minha vida e fonte inesgotável de amor e alegria.

À minha mãe Sirley de Oliveira Ferreira, pelo apoio incondicional, incentivo, paciência e compreensão.  
Devo a você minha vida e cada vitória alcançada.

Ao meu pai Mauro Guimarães Ferreira, pelo incentivo e apoio ao longo de minha vida.

Aos meus irmãos Marcelo e Rafael pela amizade, companheirismo e incentivo.

Ao Edson Lira, pelo apoio e incentivo no desenvolver deste trabalho e na vida.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Pedro Paulo Ribeiro Vieira pela orientação, apoio e incentivo constantes na execução deste trabalho.

Às Dras Maria das Graças Costa Alecrim e Monica Regina Costa, pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos Drs. Virgílio E. do Rosário, Pedro Cravo e Axel Martinelli pela hospitalidade e colaboração para realização deste trabalho.

Às amigas Louise A. Rodrigues e Paula Figueiredo pelo apoio técnico, hospitalidade e amizade.

Aos Drs. Mariano Zalis, Walter Oelemann e Pedro Cravo, por aceitarem participar como membros da banca e pelas sugestões ao trabalho.

À Universidade Federal do Amazonas e a Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, pela minha formação profissional.

À aluna de iniciação científica e amiga pessoal Laila Cristina Alves Rojas, pelo suporte técnico, apoio e companheirismo no desenvolver deste trabalho.

Às amigas Janaina Roriz, Janaina Evangelista, Marly Marques de Melo e Raimunda Ericilda S. de Araújo pelo suporte técnico e laboratorial na realização deste trabalho.

Aos amigos Walldelice, Michele e Luiz Francisco pela amizade e palavras de carinho em momentos difíceis.

Ao Edson Fonseca de Lira, pela orientação e auxílio na análise estatística, e por todo apoio, carinho e incentivo ao longo de minha vida.

Aos funcionários do Laboratório de Malária da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, em especial ao Sr. José Eckner Lessa Alves, Sra Raimunda Barreto da Silva, Marinete Lima Quadros e Rosemary Viana.

A todos aqueles que, em algum momento, com uma palavra de carinho e coragem, me incentivaram a concluir este trabalho.

Às fontes financiadoras desse projeto, FAPEAM E CNPq.

## RESUMO

Na Amazônia legal, o estado do Amazonas registrou 180.290 casos de malária no ano de 2006, fato que acarreta em grande impacto econômico e social para a região. O diagnóstico é tradicionalmente realizado pela técnica da gota espessa (G.E.), no entanto fatores como a redução de sensibilidade em baixas parasitemias e dificuldade no diagnóstico de infecções mistas justificam a adoção de metodologias com maior sensibilidade e especificidade. Através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) esses objetivos podem ser alcançados, no entanto, o elevado custo ainda é um fator que impede sua utilização como rotina nas diferentes regiões endêmicas. Alternativamente, para monitoramento da resposta terapêutica, identificação de infecções mistas e estudos de genotipagem, esta técnica já é implementada. Este trabalho teve por objetivo a caracterização molecular de isolados de *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* de 12 localidades endêmicas do estado do Amazonas: Manaus, Careiro, Borba, Autazes, Itacoatira, Presidente Figueiredo, Barcelos, São Gabriel da Cachoeira, Coari, Tefé, Guajará e Humaitá. As amostras foram obtidas segundo diagnóstico da G.E. no entanto foi feito o estudo de infecções mistas, não detectadas, através de PCR, e adicionalmente foi padronizada metodologia em tempo real para agilizar e dar maior confiabilidade aos diagnósticos de amostras utilizadas em estudos desenvolvidos pela gerência de malária da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM). Os genes utilizados para caracterização do *P. falciparum* foram o *pfcr* e *pfatp6*, e para o estudo de *P. vivax* utilizou-se o gene *pvm*. Como metodologia adotou-se o sequenciamento automático e a genotipagem utilizando sondas em sistema de PCR em Tempo Real. Todas as amostras de *P. falciparum* analisadas para o gene *pfcr* demonstraram perfil genético semelhante à cepa 7G8, que contem a mutação K76T, comprovando o fenótipo resistente observado em estudos anteriores. Para o gene *pfatp6* foram descritos 3 haplótipos distintos, com mutações identificadas nas posições 1204, 1888 e 2694. A análise do gene *mdr* de *P. vivax* identificou mutações nos códons 976 e 1076 em 11 amostras de um total de 100 analisadas, distribuídas entre os municípios de Autazes, Coari, Manaus e Tefé. A identificação do perfil genético de populações de *Plasmodium* circulantes na Amazônia é uma importante ferramenta para o entendimento da dinâmica de transmissão da malária e para o constante monitoramento das ações de controle da doença.

Palavras chaves: *Plasmodium*, Amazônia, *pfcr*, *pfatp6*, *pvm*, resistência.

## ABSTRACT

In the legal Amazon, the Amazon state registered 180.290 malaria cases in 2006, that fact carries in huge economic and social impact for the region. The diagnosis is traditionally performed by the method of the giemsa stained thick blood smear, however low-level parasitemias and mixed infections are frequently not detected. These disadvantages justify the use of more sensitive and specific methodologies as the Polimerase Chain Reaction (PCR). The elevated cost of this method is one of the factors that prevent your utilization as routine in the different endemic regions. The PCR method is a technic that has been already implemented alternatively for drug monitoring, detections of mixed infections and genotyping studies. The present work had for goal the molecular characterization of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* field isolates of 12 endemic areas in Amazon state: Manaus, Careiro, Borba, Autazes, Itacoatira, Presidente Figueiredo, Barcelos, São da Cachoeira, Coari, Tefé, Guajará and Humaitá. The samples were obtained by microscopy diagnosis and the study of mixed infections was done through nested-PCR. Additionally was standardized methodology in real time to hasten and to give more reliability to the samples diagnosis used in studies developed by the malaria management of the Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM). The genes used to *P. falciparum*'s characterization were *pfcr*t and *pfatp*6, and for *P. vivax* was used the gene *pvmdr*, using the automatic sequencing and for genotyping assays using Real Time probes detection. All *P. falciparum* samples analyzed for the gene *pfcr*t demonstrated similar genetic profile to 7G8 strain control, which has the mutation K76T, proving the resistant phenotype observed in previous studies. For the gene *pfatp*6 were described 3 distinct haplotypes, with mutations identified in the positions 1204, 1888 and 2694. The analysis of the gene *pvmdr* in *P. vivax* identified mutations in codons 976 and 1076 in 11 samples of 100 total analyzed, distributed among four areas, Autazes, Coari, Manaus and Tefé. The identification of *Plasmodium* population's genetic profile circulating in Amazon region is an important tool to understand the transmission dynamics of malaria and essential for constant monitoring the disease control actions.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ciclo biológico do <i>Plasmodium sp.</i> .....	19
Figura 2 – Mapa do risco de transmissão da malária, Amazônia Legal, 2007.....	22
Figura 3 – Datas aproximadas da introdução de antimaláricos e detecção da falha no tratamento.....	31
Figura 4 – Sítios de coleta das amostras.....	38
Figura 5 – Etapas de coleta das amostras de sangue parasitado em campo.....	39
Figura 6 – Curva de dissociação dos produtos de PCR para as espécies <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> .....	42
Figura 7 – Curva de dissociação dos controles W2, 7G8 e HB3 para comparação e identificação dos perfis genéticos das amostras analisadas para o gene <i>pfcr1</i> .....	44
Figura 8 – Curva de detecção da fluorescência em PCR em tempo real.....	49
Figura 09 – Foto de satélite da cidade de Tefé, com a identificação dos pontos de coleta das amostras.....	51
Figura 10 – Diagnóstico Molecular de monoinfecção pelo <i>P.falciparum</i> .....	53
Figura 11 – Localização das amostras de <i>P. falciparum</i> sequenciadas para o gene <i>ptatp6</i> .....	59
Figura 12 – Foto ge gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador UV, contendo os produtos de amplificação obtidos com diferentes iniciadores.....	60
Figura 13 – Eletroferogramas obtidos utilizando o programa ClustalX, contendo uma amostra com perfil selvagem e uma com perfil mutante para posição T1204G, detectada em amostra do município de Guajará.....	60
Figura 14 – Alinhamento da sequencia do clone 3D7, padrão de perfil molecular selvagem, com a sequencia da amostra 28, coletada no município de Humaitá, com a identificação da mutação 1204G.....	61
Figura 15 – Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, e visualizado em transiluminador UV, contendo amostras de 1 a 18, após digestão enzimática.....	62
Figura 16 – Foto ilustrando gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, e visualizado em transiluminador UV.....	65
Figura 17 – Foto de gel de agarose 2%, contendo as amostras digeridas com a enzima <i>TasI</i> .....	66
Figura 18 – Curva de amplificação de amostras de <i>P. vivax</i> , utilizando iniciadores e sondas para o estudo da mutação Y976F.....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Localidades de coleta das amostras de <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> .....	50
Tabela 02 – Resultados do Diagnóstico Molecular por Nested-PCR.....	53
Tabela 03 – Resultados obtidos pela técnica de PCR Tempo Real.....	54
Tabela 04 – Comparação dos resultados obtidos pelas técnicas de Gota Espessa x Nested-PCR.....	55
Tabela 05 – Comparação dos resultados obtidos pelas três técnicas utilizadas no estudo, G.E. x Nested-PCR x PCR Tempo Real.....	57
Tabela 06 – Resultados totais das amostras analisadas por PCR-RFLP.....	68
Tabela 07 – Resultados de Genotipagem do gene <i>pvmdr</i> , identificando o local de origem das amostras e os aminoácidos presentes.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS

CQ - Cloroquina  
CQR – Cloroquina Resistente  
DNA – Acido Dioxirribonucléico  
dNTP - Deoxinucleotídeos Trifosfatados  
DHPS -Diidrofolatoredutase  
EDTA - **E**thyl**e**ned**i**amine **t**etra**a**cetic **a**cid (ácido etilenodiamino tetra-acético)  
G.E. – Gota Espessa  
G6PD – Glicose 6 Fosfato desidrogenase  
IPA – Índice Parasitário Anual  
kDa – kilo Dalton  
Kb – pares de base  
Mb – pares de base  
MDR1- Multi Drug Resistance  
µl - microlitros  
Pb – pares de base  
PCR – Polimerase Chain Reaction  
PIRA-PCR - Primer-introduced restriction analysis  
Pfcr1 – *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter  
Pfmdr1 - *Plasmodium falciparum* Multi Drug Resistance  
Pvmdr1 - *Plasmodium vivax* Multi Drug Resistance  
RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism  
RII – Resistência à droga do tipo II  
RIII - Resistência à droga do tipo III  
RAVREDA - Rede Amazônica de Vigilância da Resistência às Drogas Antimaláricas  
SNP - Single Nucleotide Polymorphisms  
ssurRNA – Small subunit Ribosomal Ribonucleotide Acid  
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
Tm – Melting Temperature  
UV - Ultravioleta  
µg/ml – microgramas / microlitros  
W2 – Cepa de *P. falciparum* em cultivo, com origem em Indochina  
7G8 - Cepa de *P. falciparum* em cultivo, com origem no Brasil  
3D7 - Cepa de *P. falciparum* em cultivo, com origem na Holanda  
HB3 - Cepa de *P. falciparum* em cultivo, com origem em Honduras

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	12
Aspectos Históricos .....	12
Vetor .....	13
Agente Etiológico – Gênero <i>Plasmodium</i> .....	14
Aspectos Epidemiológicos .....	19
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	24
1.1 Diagnóstico Da Malária.....	24
1.2 Resistência Às Drogas Antimaláricas .....	28
1.3 Marcadores Moleculares De Resistência.....	32
2. OBJETIVOS .....	36
2.1 Objetivo Geral.....	36
2.2 Objetivos Específicos.....	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1 Amostragem E Localidades .....	37
3.2 Georreferenciamento Dos Sítios De Coleta.....	38
3.3 Coleta De Sangue Parasitado Por <i>Plasmodium Sp.</i> .....	39
3.4 Extração De Dna Plasmodial .....	40
3.5 Diagnóstico Molecular De Infecções Mistas .....	40
3.6 Pcr Em Tempo Real.....	41
3.7 Genotipagem De <i>P. Falciparum</i> .....	43
3.7.1 Gene <i>pfprt</i> .....	43
3.7.2 Gene <i>pfATP6</i> .....	44
3.8 Genotipagem - <i>P. Vivax</i> .....	47
3.8.1 Gene <i>pvmr</i> .....	47
4. RESULTADOS .....	50
4.1 Amostragem e Localidades .....	50
4.2 Georreferenciamento Das Localidades.....	51
4.3 Extração De Dna .....	52
4.4 Diagnóstico Molecular.....	52
4.4.1 Nested-PCR .....	52
4.4.2 PCR em Tempo Real .....	53
4.4.3 Comparação Dos Resultados De Diagnóstico Molecular .....	55
4.5 Genotipagem – <i>P. Falciparum</i> .....	58
4.5.1 Gene <i>Pfprt</i> .....	58
4.5.2 Gene <i>pfATP6</i> .....	59
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....	73
6. CONCLUSÃO.....	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	91
ANEXOS .....	105

# INTRODUÇÃO

## ASPECTOS HISTÓRICOS

O homem convive com a malária desde a antiguidade, relatos de esplenomegalia e febre são observados em papiros egípcios antigos e textos médicos escritos há mais de 2.000 anos. Nas Américas não há registros de malária anteriores à chegada dos exploradores Europeus, conquistadores e colonizadores, portanto a hipótese para chegada das espécies *P. vivax* e *P. malarie* data a época pós-Colombo, com a posterior introdução de *P. falciparum* durante a importação de escravos africanos (BRUCE-CHWATT, 1988 apud SHERMAN, 1998).

Análises genéticas de distintas regiões do genoma do *Plasmodium* tentam identificar a origem do ancestral comum para este parasita e a partir daí sua disseminação pelo mundo. As estimativas podem ser discordantes, dependendo das sequencias de DNA utilizadas para a análise (HARTL, 2004). Através do estudo do 10 diferentes genes, dentre eles *dhps*, *mdr1*, *G6PD*, em amostras de *P. falciparum* de diferentes regiões geográficas, acredita-se ter havido uma rápida e recente expansão desse parasita (RICH *et al.*, 1998). A análise do DNA mitocondrial de *P. falciparum* de diferentes regiões do globo sugere uma recente expansão africana desse parasita há, aproximadamente, 10.000 anos (JOY *et al.*, 2003).

A descoberta do agente etiológico da malária ocorreu em 1880, por Louis Alphonse Laveran (1845-1922), enquanto examinava, ao microscópio, uma lâmina com gotas de sangue de um soldado que sofria de febre intermitente, onde

presenciou o processo de formação de microgametas, denominado de exflagelação. Em 1897, Ronald Ross demonstrou, definitivamente, a transmissão da malária aviária através de vetores: mosquitos do gênero *Anopheles*, e descreveu o ciclo biológico desenvolvido no interior do mosquito. Ross propôs a hipótese de transmissão da malária humana de maneira idêntica à descrita para aves, mas coube a Grassi, em 1898, a descrição da transmissão da malária humana, identificação do vetor, *Anopheles claviger* (*A. maculipennis*), e descrição do ciclo biológico no interior do mosquito (SHERMAN, 1998).

## VETOR

O mosquito vetor da malária humana pertence ao gênero *Anopheles* (classe *Insecta*, ordem *Diptera*, família *Culicidae*). Apenas as fêmeas do mosquito *Anopheles* são hematófagas devido à necessidade de nutrientes para maturação dos ovos.

No Brasil existem 54 espécies de *Anopheles* e é possível encontrar 33 dessas espécies na região Amazônica, sendo o *Anopheles darlingi* a espécie de maior prevalência e conseqüentemente maior importância epidemiológica em todo território nacional, devido à elevada antropofilia (TADEI *et al.*, 1998). O *A. darlingi* é capaz de manter a endemia malárica, mesmo em baixa densidade, devido à alta eficiência na transmissão do *P. vivax* e *P. falciparum*, no entanto também é possível encontrar outras espécies como o *A. nuneztovari* e *A. triannulatus* infectadas por espécies de *Plasmodium* (TADEI *et al.*, 2000).

## AGENTE ETIOLÓGICO – GÊNERO *Plasmodium*

Os parasitas da malária estão classificados no filo *Protozoa*, subfilo *Apicomplexa*, classe *Sporozoea*, família *Plasmodeidae*, gênero *Plasmodium*, dos quais quatro espécies são capazes de parasitar o homem: *Plasmodium malariae* (LAVÉLAN, 1881; GRASSI e FELETTI, 1890), *Plasmodium vivax* (GRASSI e FELETTI, 1890; LABBÉ, 1899) *Plasmodium falciparum* (WELCH, 1897; SCHAUDINN, 1902) e *Plasmodium ovale* (STEPHENS, 1922).

Das quatro principais espécies encontradas parasitando o homem, o *Plasmodium vivax* é o de maior prevalência e menor mortalidade. Estima-se um total de 80 milhões de casos anualmente no mundo, 20% ocorrem na África sub-sahara e 15% nas Américas Central e Sul (MENDIS *et al.*, 2001).

São atribuídos ao *Plasmodium falciparum* os casos de malária severa, com complicações clínicas, possivelmente, fatais. O coma, característica da malária cerebral, a acidose metabólica, hipoglicemia, anemia severa, falências renais e pulmonares são algumas das complicações observadas e ocorrem, principalmente, devido à capacidade de citoaderência e roseteamento em capilares profundos de órgãos vitais (KIRCHGATTER *et al.*, 2005).

Apesar do caráter benigno, é possível encontrar relatos na literatura da emergência de casos de malária cerebral causada por infecções isoladas de *Plasmodium vivax* (BEG *et al.*, 2002). Na Índia foram detectados casos de malária

grave causada por esta espécie parasitária, principalmente em crianças (KOCHAR *et al*, 2005; THAPAR *et al.*, 2007).

Fatores relacionados diretamente ao *Plasmodium* como: resistência às drogas, variação e polimorfismo antigênicos, capacidade de roseteamento e citoaderência associados a fatores do próprio homem, tais como imunidade, produção de citocinas inflamatórias, aspectos genéticos, idade e gravidez, também são importantes e responsáveis pelas diferentes respostas clínicas à infecção (WEATHERALL, 2002).

Atualmente é possível o acesso ao genoma completo das espécies de *Plasmodium falciparum* (GARDNER *et al.*, 2002), *P. yoelii yoelii* (CARLTON *et al.*, 2002), *P. berghei* e *P. chabaudi* (HALL *et al*, 2005). A informação contida no genoma dessas espécies permitiu o avanço de inúmeras linhas de pesquisa, principalmente nos campos de transcriptômica e proteômica.

Outro genoma em estudo e prestes a ser liberado para consulta pública é o do *P. vivax*, que teve início no ano de 2002 e continua em atividade, utilizando a cepa padrão Salvador I (CARLTON *et al.*, 2003). Dados preliminares demonstram variação na composição do genoma das diferentes espécies. Para as espécies de *P. vivax* e *P. cynomolgi* a concentração de bases G+C representa aproximadamente 40% de todo o genoma, além disso, é possível prever para cada espécie de *Plasmodium* cerca de 5.000 a 6.000 genes por genoma, 60% deles ortólogos entre as espécies (HALL; CARLTON, 2005).



O genoma nuclear do *Plasmodium falciparum*, cepa 3D7 apresenta o tamanho de 22,8Mb, distribuído em 14 cromossomos lineares, variando de 0.5 - 3.0Mb. A composição de bases A e T é de 80,6%, podendo chegar a aproximadamente 90% em íntrons ou regiões intergênicas. Foram identificados aproximadamente 5.300 genes codificadores de proteínas, o que significa, em média, um gene a cada 4.330 pb. Acredita-se que 54% dos genes representam íntrons, e após exclusão dos mesmos têm-se 2,3kb como tamanho médio dos genes (GARDNER *et al.*, 2002).

## **CICLO EVOLUTIVO**

O ciclo evolutivo do parasito é complexo e apresenta uma fase assexuada, realizada no hospedeiro vertebrado: o homem; e uma fase sexuada de ocorrência no hospedeiro invertebrado: o mosquito.

### **Ciclo Assexuado**

O ciclo assexuado inicia quando a fêmea do mosquito, no momento de sua alimentação, injeta 40 a 100 esporozoítos armazenados em sua glândula salivar no sangue do hospedeiro humano, durante o repasto sanguíneo. Uma vez injetados, os esporozoítos deixam rapidamente o tecido subcutâneo, caem na corrente sanguínea e em cerca de trinta minutos desaparecem da circulação. Há um tropismo pelas células hepáticas, e ao penetrar no hepatócito, ocorre a formação de um vacúolo parasitóforo, composto de colesterol, lipídeo presentes na membrana plasmática do hospedeiro, sugerindo ser essa a origem desse vacúolo (BANO *et al.*, 2007). Através da membrana desse vacúolo ocorre a difusão de diferentes moléculas, fatores de

crescimento, nutrientes, eletrólitos, favorecendo a replicação intracelular do parasita. Nos hepatócitos ocorre a diferenciação dos esporozoítos em trofozoítos hepáticos (ciclo tecidual ou extra-eritrocítico). Cada esporozoíto é capaz de se desenvolver em milhares de merozoítos, através de sucessivas divisões por esquizogonia tecidual. Com o rompimento dos hepatócitos e liberação dos milhares de merozoítos na circulação sanguínea, rapidamente ocorre a invasão dos eritrócitos (ciclo eritrocítico), fato que marca o início da sintomatologia da doença (WEATHERALL, 2002).

Existem diferenças entre as espécies de plasmódio no que diz respeito ao ciclo tecidual: o *P. vivax* e o *P. ovale* apresentam as formas latentes, chamadas de hipnozoítas, capazes de permanecerem inativas no fígado por meses ou anos, responsáveis pelas recaídas tardias da doença (VERONESI, 1998).

A invasão dos eritrócitos pelos merozoítos inicia um novo ciclo de divisões assexuadas, gerando as formas denominadas de trofozoítos jovens, pequenos anéis, que amadurecem e sofrem várias divisões por esquizogonia. Os esquizontes maduros acabam por romper o eritrócito, liberando no sangue novos merozoítos capazes de infectar novos eritrócitos. Existem diferenças biológicas entre as espécies, o que ajuda a explicar a resposta diferenciada à infecção. O *P. falciparum* não discrimina tipos de eritrócito para invasão enquanto o *P. vivax* apresenta preferência por células jovens, conhecidas como reticulócitos, contendo o antígeno de superfície Duffy (WEATHERALL, 2002).

A duração do ciclo eritrocítico é variada entre as espécies, para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* o período cíclico é de 48 horas enquanto que para o *P. malarie* e *P. knowlesi* o período é de 72 e 24 horas respectivamente (ARAVIND *et. al.*,2003).

Após um período de replicação assexuada, alguns merozoítos diferenciam-se em gametócitos machos e fêmeas, que amadurecem sem divisão celular e tornam-se a forma infectante do vetor. Os mecanismos pelos quais há o estímulo para essa diferenciação permanecem em estudo, no entanto, estudos sugerem que gametócitos oriundos de um mesmo esquizonte são sexualmente comprometidos, ou seja, apresentarão o mesmo sexo. Existem evidências de que a determinação do sexo do gametócito ocorre no início do desenvolvimento sexual, ainda nos antecedentes trofozoítas do estágio assexual (TALMAN *et al.*, 2004).

### **Ciclo Sexuado**

O ciclo sexuado inicia-se quando a fêmea do vetor alimenta-se de sangue infectado com gametócitos machos e fêmeas. Durante a passagem até o estômago do mosquito, os gametas completam o desenvolvimento sexual. No estômago do mosquito, devido ao ambiente favorável, isto é, queda da temperatura e modificação do pH, tem início o processo de amadurecimento dos gametas machos (microgametócito) e fêmeas (macrogametócito) e a fertilização (WEATHERALL, 2002). O microgametócito sofre um processo chamado de exflagelação, originando os microgametas, flagelados e móveis, que fecundarão o macrogameta desenvolvido (VERONESI, 1998). Esse processo de reprodução sexuada tem grande utilidade para a biologia do *Plasmodium*, especialmente por promover

diversidade de populações, aptas a adaptação e sobrevivência frente às condições inibitórias, tais quais a imunidade e o uso de drogas antimaláricas (COWMAN; CRABB, 2005). Esta fecundação gera um zigoto e, posteriormente, uma forma invasiva, o oocineto, que pode movimentar-se em direção ao epitélio estomacal do mosquito, atravessando-o e permanecendo entre o mesmo e a lâmina basal, em uma forma vegetativa, chamado de oocisto. Este cresce e sofre divisões (esporogonia) produzindo de 2 a 8000 esporozoítos (AL-OLAYAN *et al.*, 2002). Estes esporozoítos rompem a parede do oocisto e migram para as glândulas salivares, tornando-se a forma infectante para o homem (Figura 1).

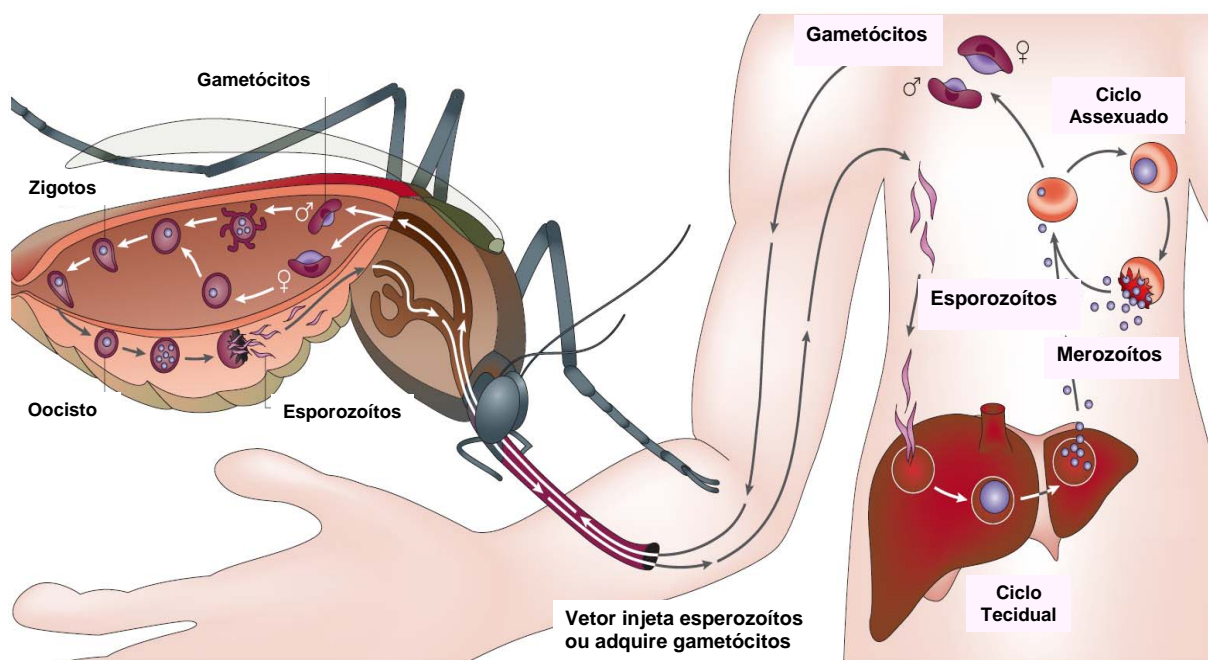


Figura 1. Ciclo biológico do *Plasmodium* sp. Su *et al.*, 2007.

## ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A malária permanece como a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo, particularmente na África, região ao sul do Saara, onde ocorrem cerca de

90% das mortes pela doença (WHO, 2005). Estima-se que a incidência mundial no ano de 2004 foi de 350 a 500 milhões de casos com o número de mortes estimado em 1,1 milhões de pessoas. A doença é considerada endêmica em 107 países e territórios, sendo o continente africano a região mais atingida, com importante entrave ao seu crescimento econômico devido à endemia (WHO, 2005).

No Brasil, a Amazônia Legal Brasileira, composta pelos Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, é responsável por mais de 99% do total de casos de malária, sendo a maioria das notificações realizadas em áreas rurais. O constante fluxo migratório para cidades como Manaus e Porto Velho trouxe como consequência o aumento do número de infecções em área urbana, 14,2% do total de casos de malária ocorridos na região amazônica foram concentrados nesses dois municípios (MS/SVS, 2007).

A grande extensão de seu território, regiões de difícil acesso, baixa densidade demográfica, processo migratório de grupos populacionais, grande número de habitações rudimentares, entre outras, são obstáculos que dificultam as operações de combate e controle da doença nesta região. Também favorece a manutenção e disseminação da doença, nessa área, a expansão de projetos agropecuários, colonização e mineração (MARQUES, 1994; ALECRIM, 1981; ALECRIM *et al.*, 1999).

Várias estratégias de controle e erradicação da doença foram adotadas no passado, com destaque o uso do DDT e a introdução de drogas como a cloroquina para tratamento e profilaxia da doença, responsáveis pela erradicação da

transmissão de malária autóctone em grandes regiões do país a partir de 1979 (LOIOLA, 2002). O mesmo sucesso não foi observado na região amazônica devido, principalmente, às características peculiares da região. A implantação de projetos desenvolvimentistas durante a década de 70 estimulou o deslocamento de grandes contingentes populacionais às áreas endêmicas. Originou-se, então, um processo de ocupação espacial desordenada, observada ainda hoje em cidades como Manaus e Porto Velho, dificultando o planejamento e a execução de operações de controle da malária (SILVEIRA, 2001).

No ano de 1999, foi criado o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal (PIACM) e sua aplicação obteve sucesso, com extensiva redução no número de casos até o ano de 2002. A partir desse ano, houve progressivo incremento, atribuído, principalmente, às epidemias nas cidades de Porto Velho, Manaus e Cruzeiro do Sul no Acre. Em 2004 foram notificados 147.482 casos da doença, seguido por 22.892 no ano de 2005, apenas para o estado do Amazonas. A região Amazônica apresentou um total de 603.532 casos de malária notificados no ano de 2005 (MS/SVS, 2007).

As principais espécies parasitárias encontradas na região são *P. vivax* e *P. falciparum*, mas casos eventuais de *P. malariae* também são notificados. O *P. vivax* é o mais abundante na região Amazônica, representando, aproximadamente, 73,4% das infecções no ano de 2006 (MS/SVS, 2007).

Quanto à malária causada por *P. falciparum*, observou-se um incremento do percentual de casos, fato que pode favorecer a ocorrência de formas mais graves da

doença. No período de 1999 a 2004, houve o aumento da proporção de malária por *P. falciparum* de 18,6% para 23,7%. Os estados que mais contribuíram para esse incremento foram Amapá (272,6%), Maranhão (112,3%), Rondônia (22,5%), Pará (19,2%) e Amazonas (11,5%) (SVS/MS, 2005). Todos os estados apresentaram proporção de *P. falciparum* acima de 20%, exceção ao estado de Mato Grosso que, em 2006, apresentou 16,1% (MS/SVS, 2007).

Cerca de 10% da população da Amazônia Legal, aproximadamente 2,4 milhões de pessoas, vivem em áreas de alto risco de transmissão de malária, correspondendo a 90 municípios, considerados prioritários. Em 2006, os estados do Acre, Rondônia e Amazonas foram classificados como áreas de alto risco de transmissão (IPA>50/1.000 hab.), Roraima, Amapá e Pará de médio risco (IPA entre 10 – 49/1.000 hab.) e os estados do Mato Grosso, Maranhão e Tocantins de baixo risco (IPA<10/1.000 hab.) (MS/SVS, 2007).

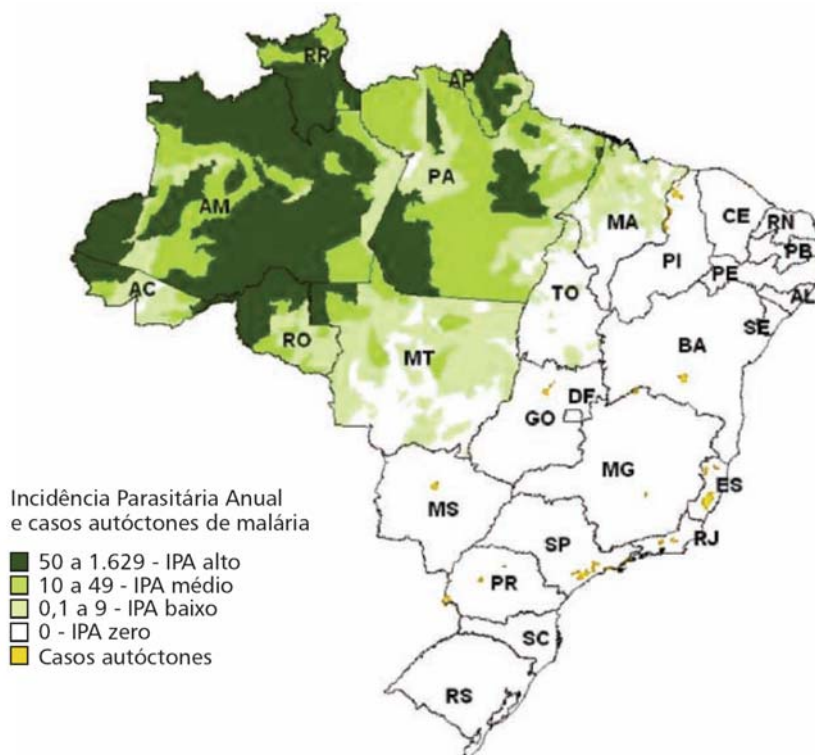


Figura 2. Mapa do risco de transmissão da malária, Amazônia Legal, 2007.

A malária, no estado do Amazonas, apresenta índices elevados não apenas na capital do estado, mas em municípios do interior, classificados, em sua maioria, de médio e alto risco de transmissão (MS/SVS, 2007). Dentre eles podemos citar Autazes, Barcelos, Careiro, Coari, Humaitá, Iranduba, Lábrea, Presidente Figueiredo, São Gabriel da Cachoeira e Tefé como alguns dos responsáveis pelos maiores números de notificações durante os últimos cinco anos.

No ano de 2004, a cidade de Manaus registrou 55.851 casos de malária, com uma redução de aproximadamente 30% no ano de 2006, onde foram notificados 38.796 casos, sendo 16.182 (41,7%) notificados na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, FMTAM, centro de referência para diagnóstico, tratamento e pesquisa da malária na região (SIVEP, 2007). No mesmo período o estado do Amazonas foi responsável por 184.115 casos da doença.

O combate à malária em municípios do interior é diferenciado devido a fatores como a falta de informação sobre a doença, constante exposição em locais de risco por razões profissionais ou lazer, dificuldade de acesso ao pólo de atendimento, má aplicação dos recursos financeiros destinados ao combate da malária, falha do tratamento pela utilização incorreta ou por resistência às drogas utilizadas.

O Estado do Amazonas faz fronteira com cinco estados brasileiros, Acre, Rondônia, Mato Grosso, Pará e Roraima, e com três países, Colômbia, Peru e Venezuela. O fluxo migratório nessas áreas e as diferentes políticas de combate ao vetor e ao parasita são fatores que influenciam de forma seletiva as populações circulantes e dificultam o controle da doença.



## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 DIAGNÓSTICO DA MALÁRIA

O diagnóstico clínico da malária isolado é pouco confiável devido à falta de especificidade dos sintomas da malária, passível de confusão com diferentes doenças (WHO, 2000). O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por diferentes técnicas, porém a técnica de microscopia, gota espessa, permanece como padrão-ouro devido a fatores como boa sensibilidade e especificidade, fácil realização, mesmo em condições de campo e baixo custo (WHO, 2005).

A gota espessa consiste na observação ao microscópio de lâminas de sangue, coletado de polpa digital, corados com Giemsa após desmembramento utilizando azul de metileno. O técnico responsável pela leitura da lâmina deve possuir treinamento específico para diferenciação das formas morfológicas adquiridas pelas espécies de *Plasmodium sp* devido à necessidade de tratamento diferenciado entre as espécies. São analisados 100 campos microscópicos, equivalente a 0,25µl de sangue, e o limite de detecção é de 5-20 parasitas/µl de sangue (HANSCHIED, 1999).

A técnica apresenta como pontos negativos a diminuição da sensibilidade em casos de baixa parasitemia, dificuldade de diagnóstico quando existe mais de uma espécie por infecção e em condições de acondicionamento de reagentes e equipamentos de maneira inadequada (COLEMAN, *et al.*, 2002). Por este motivo tem-se buscado, ao longo dos anos, aprimorar as técnicas de diagnóstico de modo

que se possa detectar, cada vez mais precocemente, a infecção e seu agente etiológico de maneira confiável e rápida.

Como evolução da técnica de microscopia foi desenvolvido o QBC<sup>®</sup>, realizado em capilares contendo um corante fluorescente (laranja de acridina) específicos para detecção de DNA dos plasmódios presentes em eritrócitos maduros, examinados em microscópio de fluorescência. O volume de amostra é consideravelmente maior e, conseqüentemente, sua sensibilidade é maior quando comparada à gota espessa; porém, a diferenciação e quantificação de espécies são prejudicadas, o custo é elevado devido aos equipamentos necessários e não permite estocagem do material para posterior avaliação (HANSCHIED, 1999).

Testes rápidos foram desenvolvidos visando maior praticidade e aplicação em larga escala, principalmente em regiões de difícil acesso. Baseados em técnicas imunocromatográficas para detecção de antígenos do *Plasmodium*, podem ser realizados por pessoas com treinamento mínimo, utilizando kits comerciais, duração média de 15 minutos e não requer eletricidade ou outro equipamento. A sensibilidade é acima de 90% em parasitemia superior a 100 parasitos/ $\mu$ l de sangue, no entanto decai consideravelmente em casos de baixa parasitemia, e possui a desvantagem de não permitir a quantificação da densidade parasitária nem diferenciação entre espécies e formas sexuadas e assexuadas (de MONBRISON *et al.*, 2004, WHO, 2000).

Em estudo feito na cidade de Manaus, Arcanjo *et al.*, 2007 avaliaram a aplicabilidade dos testes rápidos no diagnóstico da malária e comparou os

resultados obtidos na gota espessa, avaliando a concordância entre os métodos. Observou-se que o teste *Optimal-IT* apresentou co-positividade de 72,1% (IC95% 59,0 – 82,5%), co-negatividade de 92,9% (IC95% 87,4 – 96,3%), o índice kappa de 0,67. No teste ICT *P.f./P.v.*, co-positividade de 78,7% (IC95% 66,0 – 87,7%), co-negatividade de 100,0% (IC95% 97,0 – 100,0%) e índice kappa de 0,84.

Com o advento da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), a detecção molecular do *Plasmodium sp* foi desenvolvida e tem se mostrado extremamente útil para estudos das diferentes espécies, detecção de infecção mistas e casos de baixa parasitemia. Desenvolvida inicialmente para o diagnóstico de *P. falciparum* (TIRASOPHON, *et al.*, 1991) e posteriormente para o diagnóstico das quatro espécies de *Plasmodium* capazes de infectar o homem (ARAI, *et al.*, 1994, SNOUNOU *et al.*, 1993, KIMURA *et al.*, 1997), utilizando, principalmente, a técnica de nested-PCR para amplificação de regiões conservadas do gene da subunidade menor do RNA ribossomal (ssurRNA). A técnica demonstrou superior sensibilidade e especificidade quando comparada aos métodos já descritos para malária, no entanto sua utilização como método de diagnóstico em larga escala não é indicada devido ao alto custo dos reagentes e a necessidade de equipamentos especializados e demora para obtenção do resultado, quando comparado à G.E., impossibilitando sua utilização em condições de campo (CICERON *et al.*, 1999; WHO, 2000).

Indiscutível, no entanto é a sua utilidade em estudos epidemiológicos, busca de assintomáticos, genotipagem, monitoramento da eficácia de drogas e da resistência aos antimaláricos, realizados em centros de referencia, além de sua utilização em bancos de sangue de áreas endêmicas, para seleção de doadores.

Em estudo realizado em comunidades próximas ao município de Barcelos, no estado do Amazonas, foram detectados números alarmantes na transmissão da doença, com valores de IPA 708,9 por mil habitantes no rio Padauri. Durante o período de 1992 a 2004, 41,1% (575 / 1.399) dos casos diagnosticados de malária corresponderam à infecção pelo *P. falciparum*, 57,8% (809 / 1.399) ao *P. vivax* e 1% (14/1.399) à infecção mista. A intensa transmissão da doença, a dificuldade de diagnóstico devido à baixa parasitemia observada no local são indicativos da presença de casos assintomáticos, demonstrando a necessidade de técnicas mais sensíveis para correta adoção de medidas de controle da doença no local (SUAREZ-MUTIZ; COURA, 2007).

As técnicas de PCR tradicional descritas, quando comparadas à técnica em tempo real, apresentam desvantagens como demora para obtenção de resultados, impossibilidade de quantificação da parasitemia e problemas de contaminação cruzada durante a manipulação das amostras, gerando resultados falso-positivos (de MONBRISON *et al.*, 2003).

A PCR em tempo real – uma nova metodologia baseada na utilização de corantes fluorescentes que permite monitorar, a cada ciclo de amplificação, os produtos de PCR formados – foi adaptada para diagnóstico da malária e quantificação da parasitemia (HERMSEN *et al.*, 2001, LEE *et al.*, 2002, de MONBRISON *et al.*, 2003, PERADIN *et al.*, 2004). O sistema de foto-detecção presente no equipamento permite a utilização de diferentes tipos de corantes: um intercalante de DNA dupla fita não-específico (*SYBR Green I*) e metodologias de detecção de simples fita, utilizando seqüências específicas, marcados com diferentes corantes (TaqMan

probes, Moléculas beacons) que apresentam a vantagem dos ensaios multiplex (BELL; RANFORD-CARTWRIGHT, 2002).

A sensibilidade e especificidade da técnica em tempo real é comparável a da PCR convencional, mas traz como vantagens o processamento em sistema fechado, completamente automatizado, evitando problemas de contaminação cruzada, o tempo de realização é reduzido, diminuição de problemas de contaminação humana pela utilização de substâncias tóxicas para visualização dos produtos de PCR (etapa de eletroforese), há a possibilidade de ensaios de quantificação precisos, um importante parâmetro de monitoramento da eficácia da terapia com antimaláricos e detecção precoce da resistência (FABRE *et al.*, 2003; ROUGEMONT *et al.*, 2004).

## 1.2 RESISTÊNCIA ÀS DROGAS ANTIMALÁRICAS

A cloroquina (CQ) foi por décadas o principal medicamento utilizado na quimioterapia e controle da malária causada pelo *P. vivax* e *P. falciparum*. O primeiro relato de tratamento de pacientes com malária causada por *P. vivax* utilizando cloroquina ocorreu em 1936, na Alemanha. Em 1946 Loeb et al. descreveram a atividade desse medicamento no tratamento da malária, tem ação esquizonticida de formas sanguíneas em *P. falciparum* e *P. vivax*, gametocida em *P. vivax* e nenhuma ação sobre esporozoítos e formas tissulares (BAIRD, 2004).

A utilização indiscriminada desse antimalárico levou ao surgimento da resistência após uma década de sua introdução em larga escala. Inicialmente detectada para o *P. falciparum*, a resistência à CQ (CQR) foi descrita no início da década de 60, em duas regiões diferentes, sudeste da Ásia e América do Sul. Rapidamente foi

disseminada para outras regiões do globo, com relatos na África no final da década de 70 (BRAY *et al.* 2005).

O primeiro relato de resistência à CQ pelo *P. vivax* foi feito na região de Nova Guiné, mais de duas décadas após o primeiro relato de resistência do *P. falciparum* (SCHUURKAMP *et al.*, 1989). Na América do Sul, o primeiro relato ocorreu em 1996, em cepas provenientes da Guiana e na Amazônia Brasileira, Alecrim *et al.*, 1999 descreveram um caso de resistência *in vivo* do tipo RII.

Atualmente a CQ é contra-indicada para o tratamento das infecções pelo *P. falciparum* em razão do elevado nível de resistência por parte desta espécie parasitária em diferentes regiões do mundo, assim como na Amazônia (OMER, 1978; PAYNE, 1987; SU *et al.*, 1997, WHO, 1997). Apesar dos relatos de casos de resistência *in vivo* desde o final da década de 80, permanece a utilização da CQ no tratamento da malária causada pelo *P. vivax*. Ainda hoje não existe uma droga alternativa tão acessível para o tratamento da malária, com tamanha eficácia e baixa toxicidade (FIDOCK *et al.*, 2002).

Como alternativa à CQ utilizou-se a associação Sulfadoxina-Pirimetamina (SP) como terapia de primeira linha em casos de malária. O mesmo fenômeno observado com o antimalárico CQ foi observado para SP e sua utilização não é recomendada no Brasil e em outros países da América do Sul, Sudeste da Ásia e regiões da África (DELFINO *et al.*, 2002).

Em relação a mefloquina (um 4-quinolinometanol), efetiva contra as cepas multiresistentes de *P. falciparum*, a resistência é relatada também desde a década de 80 no Brasil, em estudos *in vivo* e *in vitro*. Apesar de ter sido relatada resistência do tipo RII e RIII esta droga ainda apresenta eficácia em áreas endêmicas brasileiras maior que 95%. A resistência ao quinino tem sido evidenciada em diferentes áreas no mundo, e no Brasil a diminuição da sensibilidade a esse antimalárico é conhecida (ZALIS *et al.*, 1998). Os mecanismos de resistência a esse antimalárico permanecem em estudo e a hipótese aceita é de que a resposta alterada a esse antimalárico é produto da interação de diferentes genes, dentre eles o *pfcr1* e o *pfmdr1* (FERDIG *et al.*, 2004).

Artemisinina e seus derivados são a classe de antimaláricos mais importante atualmente devido a ação efetiva contra parasitas multiresistentes aos diferentes antimaláricos. Foi descoberta na China, há mais de dois mil anos, utilizada através de infusões/extratos da planta *Artemisia annua*, e na década de 70 teve seu princípio-ativo identificado e purificado. Diversos análogos semi-sintéticos foram obtidos desde então, todos com ação contra estágios sexuais e assexuais das quatro diferentes espécies de *Plasmodium*, meia vida de eliminação curta, podendo variar de cinco minutos a sete horas (DAVIS, *et al.*, 2005).

Sua utilização como monoterapia não é recomendada devido a elevada taxa de recrudescência, cerca de 17% dos casos. Além disso, foi demonstrado que após repetidas doses, a concentração de artemisinina no plasma é reduzida, limitando a sua eficácia como monoterapia (de VRIES *et al.*, 2000).

Apesar de não haver casos comprovados de resistência a essa classe de antimaláricos, acumulam-se evidências do possível surgimento da mesma. Recentemente, foram obtidos, em modelo animal clones de *Plasmodium chabaudi* resistentes à artemisinina, após pressão seletiva da droga, comprovando a viabilidade dessa característica (AFONSO *et al*, 2006).

Jambou *et al.*, 2005 descreveram a diminuição da sensibilidade *in vitro* ao artemether em amostras isoladas de pacientes da Guiana Francesa, Camboja e Senegal. Associada à diminuição da sensibilidade foi identificada a mutação S769N no gene *pfATP6*, cuja proteína é proposta como participante no mecanismo de ação dessa classe de antimaláricos.

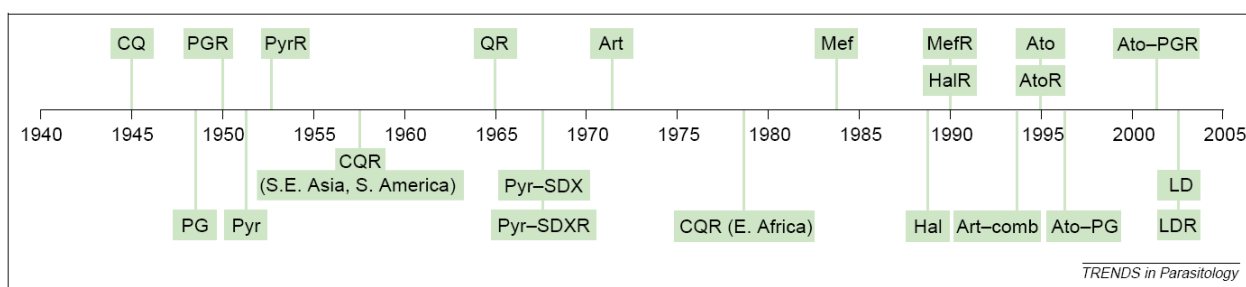


Figura 3. Datas aproximadas da introdução de antimaláricos e detecção da falha no tratamento. A Quinina (Q), utilizada desde o século XVII, teve a resistência observada em 1965, principalmente no sudeste asiático. Apesar da rápida disseminação da resistência a Pyr-SDX também no sudeste asiático no fim dos anos 60, é utilizada com sucesso na África para o tratamento de parasitas CQR desde o início da década de 90. A artemisinina e seus derivados (Art) são utilizados em combinação com outros antimaláricos, para evitar o surgimento da resistência, ainda não detectada até o presente momento. Resistência à Mefloquina (Mef) foi reportada em estudos de campo no início dos anos 80. Abreviações: Ato-PGR: Atovaquona-Proguanil; Pyr-SDX: Sulfadoxina-Pirimetamina; comb, combinações; Hal, halofantrina; LD, LapDap; R, resistência. Figura adaptada de HYDE, 2005.

Neste cenário, a busca por diferentes antimaláricos se faz necessária. No entanto, observa-se que o problema da quimiorresistência é generalizado, ocorre com quase todos os medicamentos disponíveis e nas mais diversas regiões malarígenas do planeta (HYDE, 2005).



A resistência aos antimaláricos ganhou força na Amazônia partir do ano 2000, com o início do Projeto da Rede Amazônica de Vigilância da Resistência às Drogas Antimaláricas (RAVREDA), liderada pela Secretaria de Vigilância em Saúde, em parceria com a Organização Pan-Americana de Saúde. A finalidade é monitorar a resistência às drogas e inseticidas de modo a subsidiar a política de medicamentos do Ministério da Saúde (SVS/MS, 2005).

### 1.3 MARCADORES MOLECULARES DE RESISTÊNCIA

O fenótipo de resistência às drogas antimaláricas ocorre pela interação alterada entre essas moléculas e seus alvos intracelulares nos parasitos. A resistência aos antimaláricos ocorrem, principalmente, de duas maneiras, através da alteração da disponibilidade da droga, devido a mecanismos de efluxo dos parasitas, ou através de mutações nos sítios-alvo da droga, alterando a susceptibilidade (KRISHNA *et al.*, 2006).

Com o surgimento do fenômeno da resistência aos antimaláricos há a necessidade de monitoramento das populações de parasitas circulantes, buscando melhorar as políticas públicas de tratamento e prevenção da doença.

O gene de multiresistência a drogas *pfmdr* é um ortólogo da família de genes de multiresistência a drogas em mamíferos. A proteína codificada por este gene apresenta 12 domínios transmembranares, e tem peso molecular de 162kDa. Localiza-se na membrana do vacúolo digestivo do parasita, alvo de ação do antimalárico CQ (SIDHU *et al.*, 2005). Diversos trabalhos confirmam seu papel na

modulação da resposta a diferentes antimaláricos, cloroquina, quinina, mefloquina, halofantrina e artemisinina (REED *et al.*, 2000; FIDOCK *et al.*, 2000; MU *et al.*, 2003; HYDE, 2005).

As principais mutações observadas nesse gene são N86Y, Y184F, S1034C, N1042D, D1246Y, no entanto, estudos comprovam não só o papel dessas mutações na modulação da resposta aos diferentes antimaláricos, mas também a super-expressão desse gene (MU *et al.*, 2003).

O gene *pfcr*t foi identificado como marcador genético de resistência à cloroquina (CQR) após análise de um cruzamento genético entre uma cepa CQR (Dd2, Indochina) e uma cepa CQS (HB3, Honduras). Esta proteína pertence a uma família, até o momento, desconhecida de transportadores, sendo a mesma localizada no vacúolo digestivo do *P.falciparum* e apresentando 10 domínios transmembranares e um conjunto de mutações pontuais ou SNPs (**S**ingle **N**ucleotide **P**olymorphism) (FIDOCK, *et al.*, 2000) .

As mutações pontuais no gene *pfcr*t são atualmente consideradas os determinantes principais do fenótipo CQR, tem-se um total de 15 posições polimórficas de aminoácidos na molécula em isolados de campo, podendo variar dependendo da posição geográfica dos isolados (COOPER *et al.*, 2005). A principal alteração de aminoácido, na posição 76, troca de uma Lisina (K) por uma Treonina (T), foi encontrada apenas em isolados apresentando o fenótipo CQR em diferentes áreas endêmicas de todo o mundo (WOOTON *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2004).

Segundo Vieira *et al.* (2004), estudos com amostras provenientes do Estado do Amazonas indicam que parasitos com origem geográfica diversa e apresentando variabilidade em genes de resistência, podem ter perfis genéticos similares. Isto implica dizer que as populações de *P. falciparum* e *P. vivax* do Estado do Amazonas, apesar de geneticamente semelhantes, não são idênticas. Devido as grandes distâncias e a descentralização do serviço de diagnóstico e tratamento, é possível o isolamento geográfico de parasitos, o que, conseqüentemente, viabiliza a observação de variações genéticas de relevância epidemiológica no que diz respeito à prevalência, morbidade e quimiorresistência.

Não há relatos de resistência *in vivo* para artemisinina na Amazônia Brasileira, no entanto diversos estudos buscam prever os possíveis mecanismos envolvidos nesse processo. Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003 em estudos de transfecção utilizando o organismo *Xenopus laevis* para expressão do *pfATP6*, confirmaram o papel da proteína codificada por esse gene como alvo da artemisinina, sofrendo a ação seletiva de radicais livres gerados na presença de íons  $Fe^{2+}$ .

Utilizando a mesma metodologia de transfecção e expressão do gene *pfatp6* em *Xenopus laevis*, foi possível a identificação do aminoácido L263 como modulador da sensibilidade à artemisinina. A indução de mutações nesse gene demonstrou aumento ou redução da sensibilidade a artemisinina, dependendo do aminoácido presente. No entanto, foi sugerido que diferentes resíduos participam da modulação da resposta à droga (UHLEMANN *et al.*, 2005).

Além da mutação S769N, descrita em amostras da Guiana Francesa e Senegal, associada à diminuição da sensibilidade *in vitro* ao atesunato, foram encontrados 23

SNPs, silenciosas e não silenciosas, com substancial agrupamento geográfico entre os locais estudados (JAMBOU, *et al.*, 2005).

São escassos os dados a respeito do gene *pfATP6* em amostras brasileiras, apesar da adoção dessa classe de antimaláricos como primeira-linha de tratamento em diferentes regiões malarígenas do país. Recentemente, foram descritas três mutações desse gene em amostras do estado do Pará, nas posições 110, 1916 e 2694. Análises *in vitro* dessas amostras comprovaram a eficácia da artemisinina e seus derivados na região e descrevem a ausência da mutação S769N encontrada na Guiana Francesa, apesar da proximidade geográfica e fluxo migratório entre as duas regiões (FERREIRA *et al.*, 2007).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o perfil genético de marcadores de resistência em populações de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* de 12 regiões malarígenas do Estado do Amazonas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar diagnóstico molecular da malária por nested-PCR, identificando possíveis infecções mistas, não detectadas pela técnica da gota espessa.
- Padronizar metodologia avançada de diagnóstico molecular através de PCR em Tempo Real.
- Comparar a sensibilidade das diferentes técnicas de diagnóstico da malária humana realizadas no estado do Amazonas.
- Caracterizar o perfil genético de isolados de campo de *P. vivax*, recém coletados no estado Amazonas através da busca de mutações no gene *pvmdr*.
- Caracterizar o perfil genético de populações de *P. falciparum* de 12 localidades endêmicas do estado do Amazonas utilizando os genes *pfcr1* e *pfatp6* como marcadores moleculares de resistência.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAGEM E LOCALIDADES

Trata-se de um estudo descritivo de epidemiologia molecular realizado pela análise do DNA e conseqüente caracterização do perfil molecular de populações de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* de 12 localidades malarígenas do estado do Amazonas.

Foram selecionadas para a obtenção das amostras, localidades endêmicas distantes e isoladas geograficamente, ao longo de todo o estado do Amazonas e em regiões próximas a fronteiras com outros estados e países. A programação das viagens de coleta no campo foi realizada após levantamento estatístico do número mensal de casos de malária em diferentes municípios do estado do Amazonas, durante os anos de 1999 a 2004 (Anexo 3). O levantamento teve por objetivo identificar os períodos do ano com maior número de casos ao mês, em cada município, facilitando a obtenção do maior número de amostras em cada município.

Participaram do estudo amostras coletadas durante os anos de 2003 a 2005, nos municípios de **Autazes** (lat. S 03° 34'40,3" e long. W 059° 07'47.9"), **Barcelos** (lat. S 00° 58'13.1" e long. W 062° 55'26.9"), **Borba** (lat. S 04° 23'18.6" e long. W 059° 35'40,4"), **Careiro** (lat. S 03° 49'10.4" e long. W 060° 21'01.7"), **Coari** (lat. S 04° 05'05.4" e long. W 063° 08'26.4"), **Guajará** (lat. S 07° 32'49.8" e long. W 072° 34'50.4"), **Humaitá** (lat. S 07° 30'08.9" e long. W 063° 01'42.4"), **Itacoatiara** (lat. S

03° 08'29.5" e long. W 058° 26'36.3"), **Manaus** (lat. S 03° 05'13.3" e long. W 060° 2'5,13"), **Presidente Figueiredo** (lat. S 02° 02'08.4" e long. W 060° 01'43.9"), **São Gabriel da Cachoeira** (lat. S 00 07'29.2" e long. W 067° 05 74.8") e **Tefé** (lat. S 03° 20'48.2" e long. W 064° 42'29.1") (Figura 4).

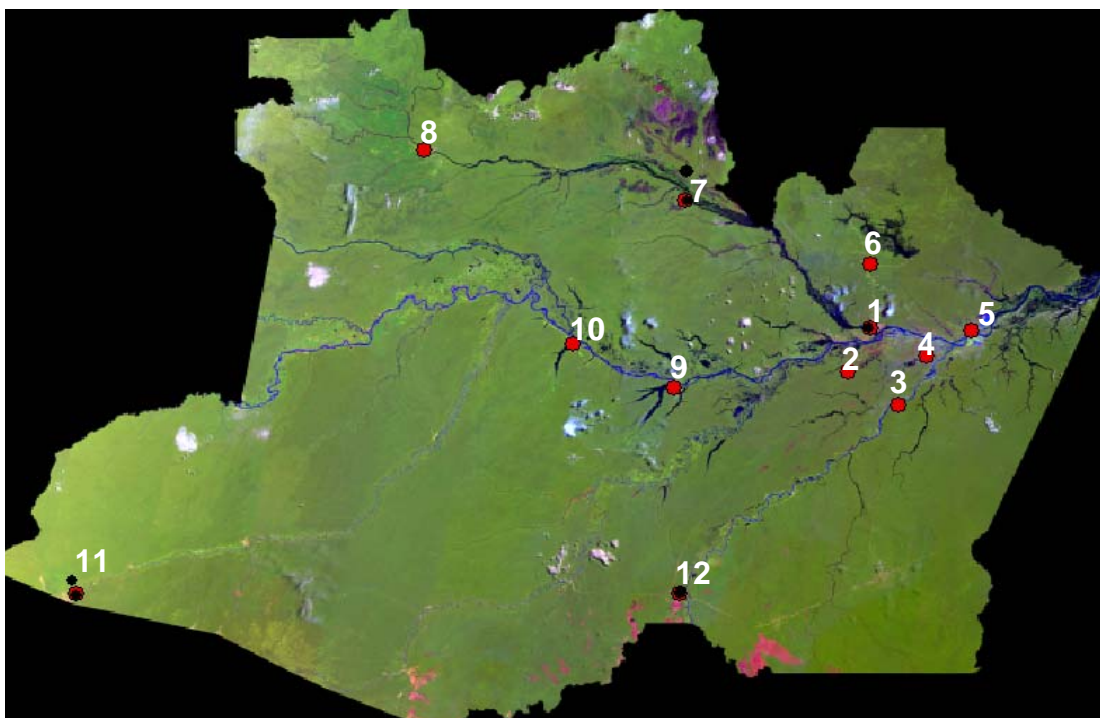


Figura 4: Sítios de coleta das amostras. 1. Manaus, 2. Careiro, 3. Borba, 4. Autazes, 5. Itacoatira, 6. Presidente Figueiredo, 7. Barcelos, 8. São Gabriel da Cachoeira, 9. Coari, 10. Tefé, 11. Guajará, 12. Humaitá.

### 3.2 GEORREFERENCIAMENTO DOS SÍTIOS DE COLETA

Durante as viagens para obtenção das amostras de isolados de *P. falciparum* e *P. vivax*, foi realizado o georreferenciamento dos sítios de coleta, para a confecção de mapas de cada localidade, com as atividades desenvolvidas e o local exato de obtenção de cada isolado de *Plasmodium*.

### 3.3 COLETA DE SANGUE PARASITADO POR *Plasmodium sp*

Os pacientes com mono-infecção pelo *P. falciparum* e *P. vivax*, confirmada pela técnica da gota espessa foram entrevistados e quando houve concordância, assinaram do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Anexo I), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMTAM, protocolo nº 2637/2003 FMT/AM. Foram então encaminhados para coleta de sangue por via endovenosa, 5 a 10mL de sangue total em tubo com anticoagulante (EDTA). O sangue total retirado foi centrifugado a 800g por cinco minutos para a retirada do plasma e do creme leucocitário. Em seguida, a papa de hemácias foi criopreservada em tubos de 2mL e foram feitas aliquotas em papel de filtro para subseqüentes análises. As amostras foram devidamente rotuladas e são parte integrante do criobanco de amostras mantido pela Gerência de Malária, segundo metodologia descrita na literatura (Vieira et al, 2001) (Figura 5).

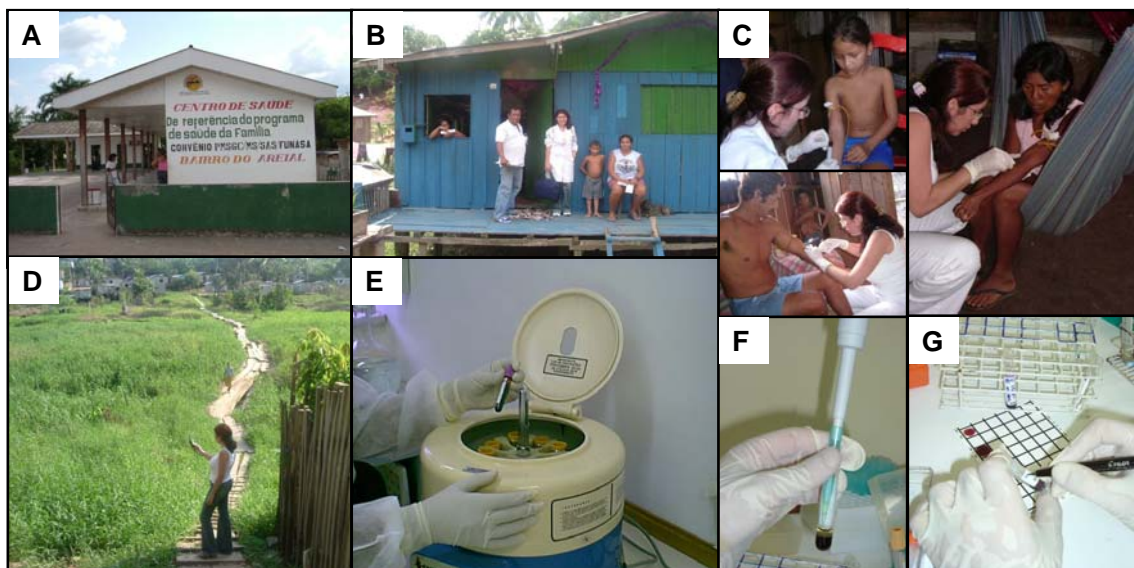


Figura 5: Etapas de coleta em campo das amostras de sangue parasitado. Busca de pacientes com diagnóstico positivo: A) Centro de diagnóstico local (busca passiva); B) Coleta na residência (busca ativa); C) Coleta de sangue após consentimento; D) Georreferenciamento dos locais de coleta; E), F) e G) Processamento das amostras para posterior extração de DNA.



### 3.4 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMODIAL

Foi realizada extração de DNA genômico de parasitos provenientes das amostras de sangue total de pacientes infectados pelo *P. falciparum* e *P. vivax*. O procedimento foi realizado pela utilização kits de extração comercialmente disponíveis (UltraClean DNA BloodSpin Kit) ou através de protocolo utilizando resina Chelex (Biorad).

### 3.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECÇÕES MISTAS

Após a extração do DNA, foi realizada uma técnica de reação em cadeia da polimerase aninhada, (Nested-PCR), para identificação de possíveis infecções mistas não detectadas pelo diagnóstico parasitológico da gota espessa. A técnica consiste na utilização de oligonucleotídeos iniciadores que reconhecem o gene codificante da subunidade menor do RNA ribossomal (ssurRNA) do *Plasmodium*. A reação primária amplifica seqüências gênero-específicas utilizando os primers PLU5 (5' CCTGTTGTTGCCTTAACTTC 3') e PLU6 (5' TTAAAATTGTTGCAGTTAAAA 3'), com amplicons de 1200pb. Na reação secundária, são utilizados, simultaneamente, iniciadores que reconhecem seqüências nucleotídicas espécie-específicas do *P. falciparum*, FAL1 (5' TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT 3') e FAL2 (5' ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC 3') com 205pb e do *P. vivax*, VIV1 (5' CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC 3') e VIV2 (5' ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA 3') com 120pb. A observação das bandas correspondentes aos produtos de PCR foi feita em transiluminador

ultravioleta após eletroforese em géis de agarose a 2% corados com brometo de etídeo (10µg/mL).

A reação primária foi conduzida nas seguintes condições: 95°C por 5 minutos para desnaturação seguida por 29 ciclos (94°C por 1 minuto, 55°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos) e extensão final das fitas a 72°C por 5 minutos. A reação de amplificação secundária foi realizada nas mesmas condições da primária havendo apenas alteração dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados.

### 3.6 PCR EM TEMPO REAL

A reação foi realizada em sistema de PCR em tempo real 7500 Fast, do fabricante Applied Biosystem, utilizando como corante o SYBR Green I e demais reagentes fornecidos pelo fabricante.

A padronização da técnica de diagnóstico molecular da malária por PCR em tempo real foi realizada a partir da utilização de oligoiniciadores desenhados para amplificação de seqüências conservadas do gene da subunidade menor do RNA ribossomal do *Plasmodium spp.* Para identificação das diferentes espécies de *Plasmodium sp.* foram utilizados oligoiniciadores específicos para *P.falciparum* - PfaIF (AGTGTGTATCAATCGAGTTTC) e PfaIR (AGTTCCCCTAGAATAGTTACA) e para *P.vivax* - Pv1 (CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC) e Pv2 - (ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA) (De Monbrison *et al.*, 2003).

Após a reação de PCR, foi adicionada uma etapa de dissociação, que consiste no aumento gradual de temperatura, com a medição simultânea da fluorescência emitida pelas moléculas de Sybr Green ligadas ao DNA dupla-fita presente no meio. Há então a construção de uma curva de dissociação, onde se pode identificar a temperatura de dissociação do produto alvo, além da identificação de possíveis produtos inespecíficos presentes na reação (p. ex. primer-dimer). Um determinado produto de PCR apresenta uma temperatura específica, em função da composição de nucleotídeos e do tamanho da molécula, por esse motivo, é utilizada também para comparação entre diferentes amostras, identificando a presença ou ausência do produto alvo (Figura 6).

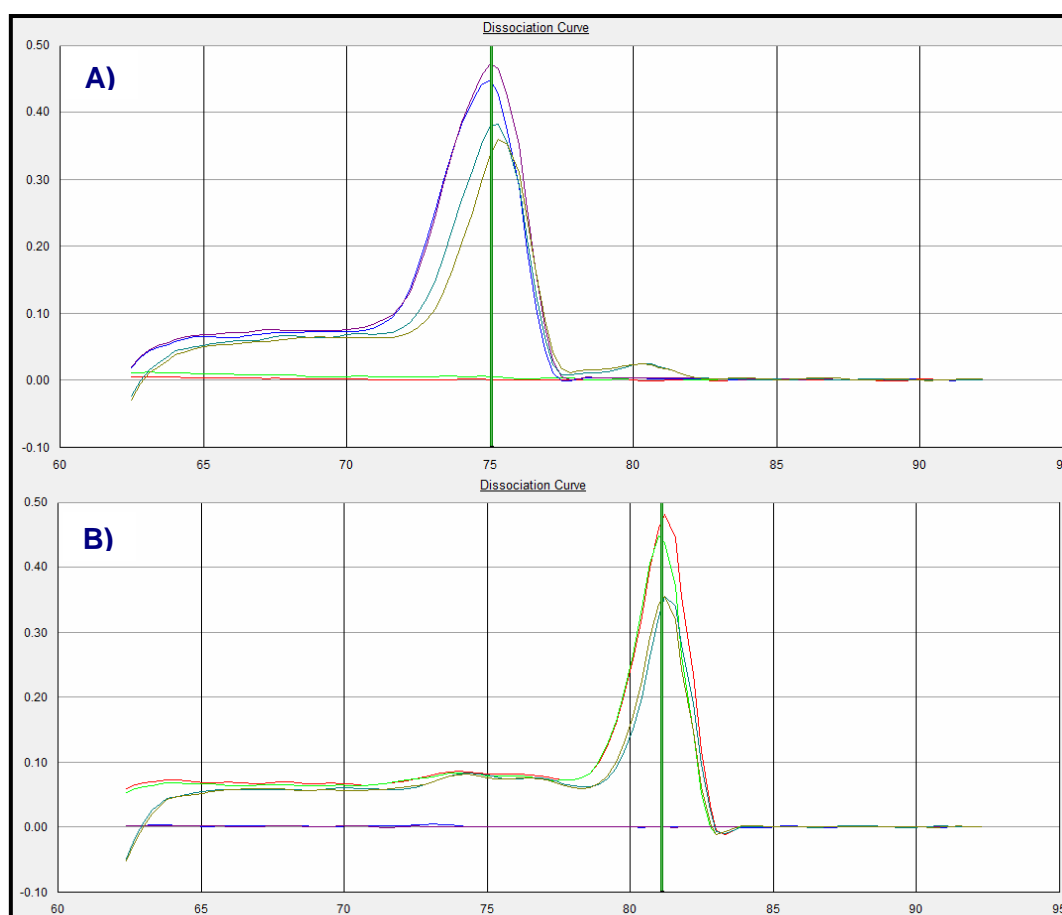


Figura 6: Curva de dissociação demonstrando a temperatura específica dos produtos de PCR. A) Curva de dissociação do *P. vivax*, B) Curva de dissociação do *P. falciparum*.

### 3.7 GENOTIPAGEM DE *P. falciparum*

#### 3.7.1 Gene *pfcr*

Para a genotipagem do gene *pfcr* optou-se pela metodologia de detecção através da utilização de sondas de hibridação, marcadas com corantes fluorescentes, para utilização em sistema de PCR em Tempo Real.

Seguindo a metodologia descrita por de Monbrison *et al.*, 2003b, utilizou-se para o ensaio uma sonda contendo as posições do gene *pfcr* 74, 75 e 76 mutantes, perfil da cepa controle W2. Esta sonda possui o corante fluoresceína na posição 3'. Dois iniciadores foram utilizados para amplificação da sequência-alvo, sendo um deles, o iniciador reverso, também utilizado como uma segunda sonda. Sua localização é adjacente aos pontos de mutação estudados, possui na posição 5' um corante acceptor de fluorescência (LC Red 640) e na posição 3' para evitar a extensão pela *Taq polimerase* encontra-se fosforilado. A sonda e o iniciador reverso hibridizam na mesma fita de DNA, assim a proximidade entre essas moléculas permite a transferência de energia e emissão da fluorescência, medida durante os ciclos.

Após a amplificação, utiliza-se uma etapa de dissociação, com o aumento gradual da temperatura e constante medição da fluorescência. No momento da dissociação das fitas duplas, ocorre a separação física das duas sondas e a consequente queda de emissão da fluorescência. Uma temperatura de dissociação específica é obtida para cada genótipo, uma vez que a sonda é capaz de hibridizar mesmo na presença de diferentes genótipos, no entanto, terá temperatura de dissociação distinta.

Foram utilizados para o ensaio, os controles W2, com mutação nas tres posições estudadas, 7G8, selvagem para as posições 74 e 75 e HB3, selvagem para todas as tres posições (Figura 7).

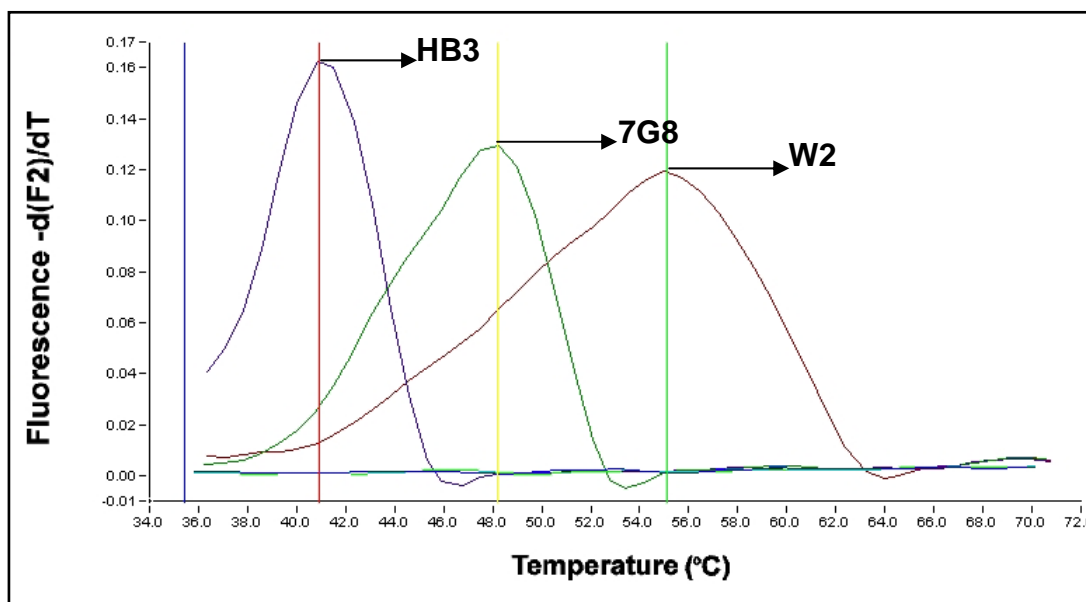


Figura 7: Curva de dissociação dos controles W2, 7G8 e HB3 para comparação e identificação dos perfis genéticos das amostras analisadas.

A reação foi realizada em sistema de PCR em tempo real LightCycler, nas condições: 95°C por 10 min, 95°C por 10s, 45°C por 10s, 65°C por 15s, durante 40 ciclos, com posterior etapa de dissociação consistindo em um ciclo a 95°C por 2 seg, 32°C por 20seg e aquecimento gradual até 75°C, com a medição constante da fluorescência.

### 3.7.2 Gene *pfATP6*

A genotipagem do gene *pfatp6* foi determinada através das metodologias de sequenciamento automático do DNA, para um subgrupo de 12 amostras, e PCR-RFLP

para detecção de mutações já descritas no gene em um total de 70 amostras das 12 diferentes localidades estudadas.

- **Sequenciamento de DNA**

Por tratar-se de um estudo pioneiro em amostras do estado do Amazonas, foi realizado o sequenciamento de um segmento de aproximadamente 3kb do gene *pfatp6* em um subgrupo de amostras para busca de novas mutações. Foi realizada a busca de mutações já descritas, nas posições 110, 1888, 1916, 2306 e 2694. As seqüências das amostras de *P. falciparum* obtidas após sequenciamento foram alinhadas com a seqüência do clone 3D7 para comparação dos perfis genéticos.

Cinco pares de oligoiniciadores foram utilizados para amplificação da região alvo 28 a 3078 (Ferreira *et al*, 2007a). As seqüências dos segmentos amplificados apresentam-se sobrepostas, facilitando, dessa forma, o alinhamento posterior, além de permitir a utilização dos mesmos oligoiniciadores na reação de sequenciamento, sem a perda de seqüências (quadro 01).

<b>PRIMERS pfATP6</b>	<b>Tamamanho do amplicon (pb)</b>
1F - CATACGATG TTGAGGATGTAC 2R - GACCTATTTAGTCTTCATACC	690
3F - GAGAATCCTGTTGAGTTGAC 4R - ATCCTTCTTCTCCATCATCC	744
5F - ACCGTGTTTCATTTGTTTAGAG 6R - CCATTTGTTGTTGCCTGAGC	770
7F - AATCACCAAGGGGTATCAAC 8R - ACGTATACCAGCCATATGG	711
9F - TTCAAAATATGGGAAAAAGAGCA 10R - TGTTGCTGTAATCCGTCAG	805

Quadro 01: Seqüência dos oligoiniciadores utilizados para sequenciamento do gene *pfatp6*, e seus respectivos tamanhos.

Na reação de amplificação dos segmentos do gene *pfatp6* foram utilizados tampão 10X, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTPs, 25pMol de cada oligoiniciador e 3U de Taq polimerase, para um volume final de 50 µL. As condições de amplificação utilizadas foram 94°C por 3min; 94°C por 30s; 53°C por 45s; 72°C por 45s, durante 30 ciclos e extensão final a 72°C por 10min.

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídeo (10mg/ml), por meio de transiluminador UV. A purificação desses produtos de PCR para posterior sequenciamento do DNA foi através da utilização do kit comercial ILLUSTRATE™, GE Healthcare, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o kit Big Dye Terminator v3.1, do fabricante Applied Biosystems, em seqüenciador automático Applied Biosystems, ABI 310. Para cada segmento de DNA gerado, foi realizado o sequenciamento utilizando ambos os oligoiniciadores que flanqueiam a região amplificada, o que permite a identificação de possíveis artefatos, isto é, falsos pontos de mutações, nas seqüências analisadas.

As seqüências do gene *pfatp6* obtidas das amostras de campo utilizadas foram alinhadas à seqüência do clone 3D7, para comparação entre perfis genéticos selvagens e mutantes, utilizando software disponível on-line (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>).

- **PCR RFLP**

Para análise de mutações já descritas no gene *pfatp6*, foram utilizados ensaios de PCR-RFLP para detecção das mutações G2306A, G1916A e A2694T, segundo Ferreira et al., 2007b.

Oligoinciador	SNP	AA	Coordenadas/ Tamanho(pb)	Enzima	Tamanho dos fragmentos após restrição					
PfATP6-1916F TATAGGAGAAAATACATTTGAtCATG	G1916A	G639D	1889 a 2055	<i>PagI</i>	G	166	A	144		
PfATP6-1916R ACATTCATTTCTCCAAGAAGAA									22	
PfATP6-769S-F ACTTAGCCTTTGCTTATAAAAAcTTAA	G2306A	S769N	2279 a 2551	<i>BsPTI</i>	G	250	A	272		
PfATP6-769S-R AATTATCCTTTTCATCATCTCC									22	
PfATP6-2694F GAATTGTTTTCTGTAGAACTGAAC	A2694T	—	2650 A 2832	<i>TasI</i>	A	181	T	142		
PfATP6-2694R ATCTGATGCTTCTTTAGCTACC									1	39
									182	1

Quadro 02: Informações sobre os ensaios de PCR-RFLP para detecção das mutações pontuais no gene *pfatp6*. Quadro adaptado de FERREIRA et. al., 2007b.

### 3.8 GENOTIPAGEM - *P. vivax*

#### 3.8.1 Gene *pvm-dr*

Para genotipagem do *P. vivax* foram desenhados oligoinciadores e sondas utilizando sistema Taqman para detecção de SNPs através de PCR em Tempo Real. A metodologia consiste na amplificação de um segmento de DNA contendo a mutação de interesse, somado a utilização de sondas específicas para cada alelo estudado, cada uma marcada com duas moléculas distintas: o *reporter*, uma molécula emissora de fluorência na posição 5' e o *quencher*, um abafador de sinal na posição 3'. Na sonda, a proximidade do *quencher* ao *reporter* não permite a



emissão da fluorescência. Durante a extensão, a enzima *Taq polimerase* cliva a sonda, que deve estar anelada entre os dois iniciadores, a separação física das moléculas *quencher* e *reporter* permite a emissão da fluorescência, captada então pelo equipamento. Os iniciadores e sondas foram desenhados utilizando o programa Primer Express versão 3.0, da Applied Biosystems.

A região estudada compreende os nucleotídeos das posições 2897 a 3259, contendo as mutações não-silenciosas dos nucleotídeos 2927 e 3226, nos códons 976 e 1076.

Para a análise da mutação presente no codon 976 foi desenhado um ensaio utilizando sistema Taqman, para amplificação de um segmento de DNA de 120pb. Os iniciadores utilizados foram 976F 5' CTATCGTGGCGGCTGTACTG 3' e 976R 5' GCTGTGCCTGGTTGGTTGA 3'. Além dos iniciadores, foram desenhadas duas sondas, 976P1 5' CCGGAACGTTCTT 3' e 976P2 5' CCGGAACGTA CTTC 3', cada uma com a sequência do alelo a ser pesquisado, marcadas com corantes diferentes, FAM e VIC, respectivamente (Figuras 8).

A análise da segunda mutação teve como iniciadores as sequências 1076F 5'GAAAGACGCTAATAAATTCGATGCT 3' e 1076R 5' AACCAAACAGTAGGCA AACTG 3' foram desenhados iniciadores para amplificação de um produto de PCR de aproximadamente 90pb. Semelhante à anterior, foram desenhadas sondas específicas para cada alelo, 1076P1 5' AGAGTGCCCAATTT 3' e 1076P2 5' CAGAGTGCCCAACTT 3' marcadas com corantes diferentes, FAM e VIC, respectivamente.

Para realização da reação foram utilizados 200nM de cada iniciador e 150nM de cada sonda, adicionadas ao mix de reagentes para PCR fornecidos pelo fabricante Applied Biosystems, num volume final de 20µl. As reações foram realizadas em sistema de PCR em Tempo Real 7500Fast, Applied Biosystems, nas seguintes condições, 95°C por 10 min, 92°C por 15seg, 60°C por 90 seg, durante 50 ciclos.

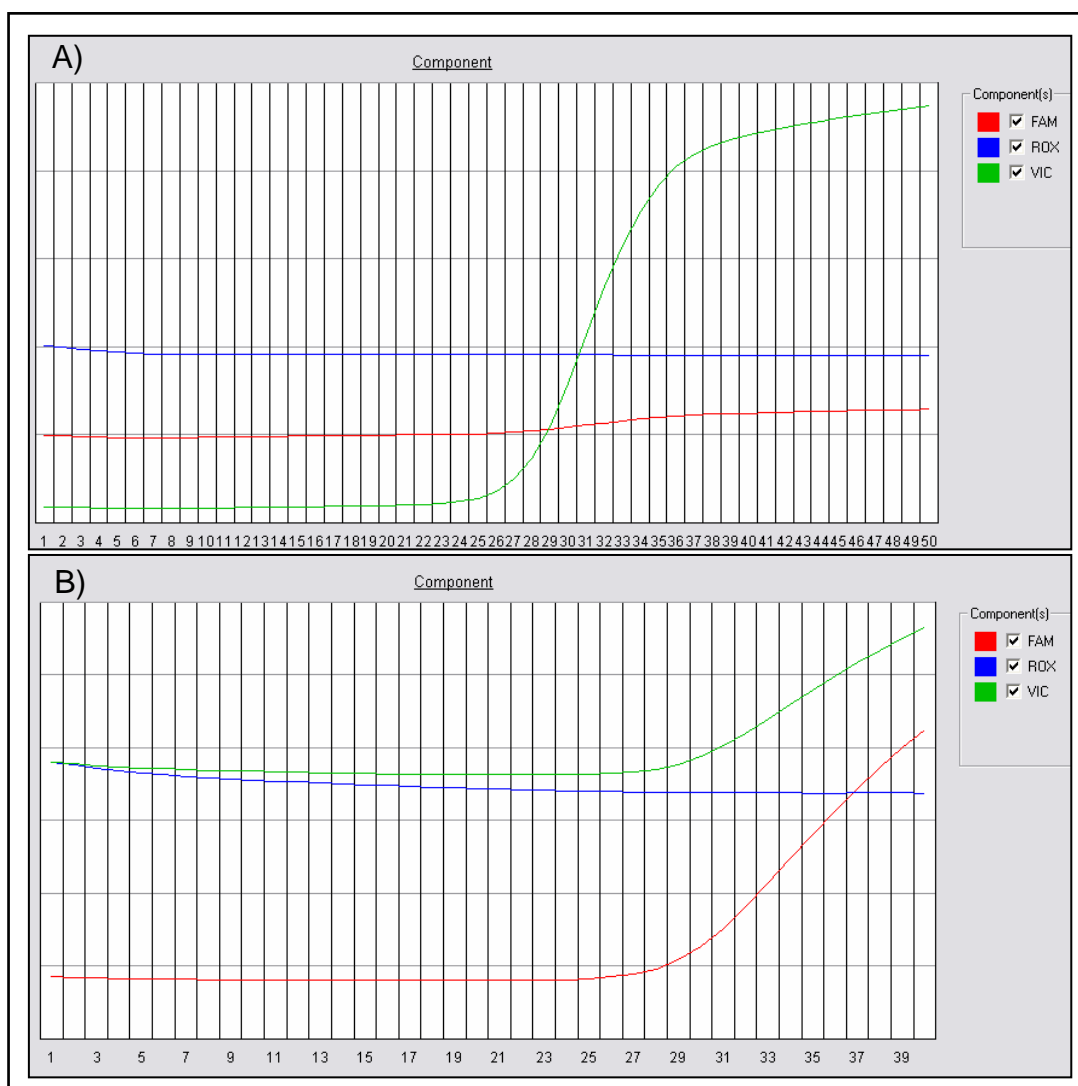


Figura 8: Curva de detecção de fluorescência. A) Apenas a fluorescência do alelo detectado apresenta aumento gradual durante a reação de PCR. B) Aumento gradual das duas fluorescências presentes no meio, identificando ambos os alelos na mesma amostra (multiclinal).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Amostragem e Localidades

Foram incluídas no presente estudo 662 amostras de sangue parasitadas por *P. falciparum* e/ou *P. vivax* de diferentes localidades endêmicas no estado do Amazonas (Tabela 01), coletadas durante os anos de 2004 a 2006. Para obtenção das amostras contou-se com o auxílio das Secretarias municipais de saúde dos respectivos municípios visitados e da FUNASA, órgão responsável pelo diagnóstico e tratamento da doença nos diferentes municípios visitados. As coletas realizadas no município de Manaus foram obtidas de indivíduos atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMTAM.

Após diagnóstico positivo pela técnica da gota espessa (G.E.) para uma das duas espécies de *Plasmodium* já citadas, o paciente foi encaminhado para entrevista, para assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido e coleta de sangue em tubos com anticoagulante, para posterior extração de DNA.

Localidade	Gota Espessa					
	<i>P. falciparum</i>		<i>P. vivax</i>		Total	
	N	% *	N	% *	N	% total
AUTAZES	5	41,7	7	58,3	12	1,8
BARCELOS	3	27,3	8	72,7	11	1,7
BORBA	6	50,0	6	50,0	12	1,8
CAREIRO	17	27,9	44	72,1	61	9,2
COARI	15	53,6	13	46,4	28	4,2
GUAJARÁ	12	70,6	5	29,4	17	2,6
HUMAITÁ	8	30,8	18	69,2	26	3,9
ITACOATIARA	20	80,0	5	20,0	25	3,8
MANAUS	103	24,1	324	75,9	427	64,5
PRESIDENTE FIGUEIREDO	1	11,1	8	88,9	9	1,4
SÃO GABRIEL DA CACHOEIRA	3	21,4	11	78,6	14	2,1
TEFÉ	11	55,0	9	45,0	20	3,0
<b>Total geral</b>	<b>204</b>		<b>458</b>		<b>662</b>	<b>100,0</b>

\* % por Localidade

Tabela 01: Localidades de coleta das amostras de *P. falciparum* e *P. vivax*.

## 4.2 GEORREFERENCIAMENTO DAS LOCALIDADES

Durante a busca de amostras em cada município, foi realizado o georreferenciamento dos pontos visitados, o que permitiu a construção de mapas das atividades realizadas nos diferentes municípios, assim como a exata identificação da procedência das amostras (Figura 9).



Figura 9: Foto de satélite da cidade de Tefé, com a identificação dos pontos de coleta das amostras.

### 4.3 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada através da utilização de kits comerciais disponíveis (Ultraclean, MO BIO) ou através da utilização de resina Chelex (BIORAD), segundo protocolo em anexo.

### 4.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Para confirmação do diagnóstico microscópico e identificação de possíveis infecções mistas não detectadas pela técnica da gota espessa, todas as amostras foram submetidas ao diagnóstico molecular pela técnica de Nested-PCR já empregada na gerência de malária da FMTAM. Em adição, foi realizada a padronização da técnica de diagnóstico molecular em Tempo Real, utilizando, como corante fluorescente, o Sybr Green, de acordo a metodologia descrita por de Monbrison *et al.*, 2003.

#### 4.4.1 Nested-PCR

Após amplificação dos produtos alvo foi realizada a eletroforese em gel de agarose 2%, e visualização em transiluminador UV, com posterior fotodigitalização do gel (figura 10). Foram diagnosticadas como monoinfecção por *P. falciparum* 167 (25,2%) amostras e como monoinfecção por *P. vivax* 343 (51,8%) amostras. Através desta metodologia de diagnóstico molecular foram identificadas 148 (22,4%) infecções mistas, detectadas pela técnica da gota espessa apenas como monoinfecção, sendo 35 diagnósticas como *P. falciparum* e 113 como *P. vivax*. Não

houve amplificação em quatro amostras de DNA testadas, uma do município de Barcelos e três do município de Manaus.

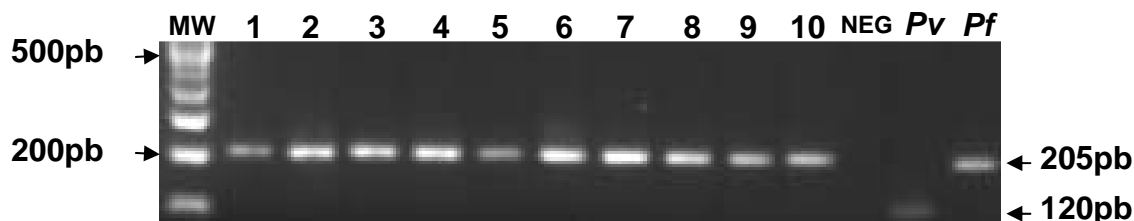


Figura 10. Diagnóstico Molecular de monoinfecção pelo *P.falciparum*. A figura representa um gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo e observado após transiluminação com luz ultravioleta. Todas as amostras testadas (1 a 10) apresentam uma banda de 205pb referentes à amplificação prevista para *P.falciparum*. Nas três últimas raias do gel temos os controles: Negativo (NEG), de *P. vivax* (Pv) e *P. falciparum* (Pf).

Localidade	Nested-PCR								Total N
	<i>P. falciparum</i>		<i>P. vivax</i>		Mista		Negativo		
	N	% *	N	% *	N	% *	N	% *	
AUTAZES	5	41,7	4	33,3	3	25,0			12
BARCELOS	1	9,1	8	72,7	1	9,1	1	9,1	11
BORBA	4	33,3	4	33,3	4	33,3			12
CAREIRO	16	26,2	39	63,9	6	9,8			61
COARI	15	53,6	9	32,1	4	14,3			28
GUAJARÁ	8	47,1	4	23,5	5	29,4			17
HUMAITÁ	5	19,2	19	73,1	2	7,7			26
ITACOATIARA	15	60,0	3	12,0	7	28,0			25
MANAUS	85	19,9	235	55,0	104	24,4	3	0,7	427
PRESIDENTE FIGUEIREDO	1	11,1	5	55,6	3	33,3			9
SÃO GABRIEL DA CACHOEIRA	2	14,3	5	35,7	7	50,0			14
TEFÉ	10	50,0	8	40,0	2	10,0			20
<b>Total</b>	<b>167</b>	<b>25,2</b>	<b>343</b>	<b>51,8</b>	<b>148</b>	<b>22,4</b>	<b>4</b>	<b>0,6</b>	<b>662</b>

\* % por localidade

Tabela 02: Resultados do diagnóstico molecular por Nested-PCR.

#### 4.4.2 PCR em Tempo Real

Foram realizadas as padronizações de diagnóstico molecular das espécies de *P. vivax* e *P. falciparum* através de protocolo de PCR em Tempo Real, utilizando como corante o Sybr Green e metodologia descrita por de Mombrison *et al.*, 2003.

Depois de realizado o ciclo de amplificação das amostras foi adicionada a etapa de dissociação para identificação da temperatura de dissociação ( $T_m$ ) específica do produto de PCR gerado. Para a espécie *P. vivax* o produto de PCR gerado apresentou uma  $T_m$  de  $75^\circ\text{C}$  ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) e o produto de PCR gerado para o *P. falciparum* apresentou a  $T_m$  de  $81^\circ\text{C}$  ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). Produtos inespecíficos (primer-dimer) apresentaram  $T_m$  inferiores às geradas pelos produtos-alvo.

Durante a padronização da técnica, foram analisadas 277 amostras de DNA de pacientes de diferentes localidades, listados na tabela 03. A técnica consiste em duas amplificações separadas, utilizando oligoiniciadores específicos para cada espécie de *Plasmodium*. Foram identificadas como infecção por *P. falciparum* 113 amostras, equivalente a 40,8% das amostras analisadas e 40 (14,4%) das amostras foram identificadas como *P. vivax*. Durante a padronização 103 amostras foram negativas para ambas as espécies e 15 foram identificadas como infecção mista de *P. vivax* e *P. falciparum*.

Localidade	PCR Tempo Real								Total
	<i>P. falciparum</i>		Negativo		<i>P. vivax</i>		Mista		
	N	% *	N	% *	N	% *	N	% *	
AUTAZES	3	30,0	2	20,0	4	40,0	1	10,0	10
BARCELOS	1	33,3	1	33,3	0		1	33,3	3
BORBA	5	41,7	6	50,0	0		1	8,3	12
CAREIRO	5	23,8	15	71,4	1	4,8	0	0,0	21
COARI	6	31,6	11	57,9	0		2	10,5	19
GUAJARÁ	10	76,9	0	0,0	0		3	23,1	13
HUMAITÁ	5	50,0	1	10,0	3	30,0	1	10,0	10
ITACOATIARA	9	37,5	9	37,5	4	16,7	2	8,3	24
MANAUS	59	42,4	51	36,7	26	18,7	3	2,2	139
PRESIDENTE FIGUEIREDO	0	0,0	4	100,0	0		0	0,0	4
SÃO GABRIEL DA CACHOEIRA	2	22,2	6	66,7	1	11,1	0	0,0	9
TEFÉ	8	61,5	3	23,1	1	7,7	1	7,7	13
<b>Total geral</b>	<b>113</b>	<b>40,8</b>	<b>103</b>	<b>37,2</b>	<b>40</b>	<b>14,4</b>	<b>15</b>	<b>5,4</b>	<b>277</b>

\* % por Localidade

Tabela 03: Resultados obtidos pela técnica de PCR Tempo Real.

#### 4.4.3 Comparação Dos Resultados De Diagnóstico Molecular

- **Gota Espessa x Nested-PCR**

Ao comparar os resultados obtidos na técnica da gota espessa e de diagnóstico molecular, observou-se a detecção de *P. falciparum* pela G.E. em 204 (30,8%) amostras analisadas, pela técnica de nested-PCR foram detectados 167 (25,2%) amostras de *P. falciparum*.

Na detecção do *P. vivax*, foram obtidas pela G.E. 458 (69,2%) amostras positivas para esta espécie enquanto pela técnica de nested-PCR foram detectadas 343 (51,8%) amostras.

Através da nested-PCR foi possível a identificação de 148 (22,3%) de infecções mistas não diagnosticadas na G:E. Em quatro amostras (0,6%) analisadas pela nested-PCR não houve amplificação para nenhuma das espécies de *Plasmodium* estudadas.

Nested-PCR	Gota espessa					
	<i>P. falciparum</i>		<i>P. vivax</i>		Total	
	N	%	N	%	N	%
<i>P. falciparum</i>	160	24,2	7	1,1	167	25,2
Negativo	4	0,6		0,0	4	0,6
<i>P. vivax</i>	5	0,8	338	51,1	343	51,8
Infecção Mista	35	5,3	113	17,1	148	22,4
<b>Total</b>	<b>204</b>	<b>30,8</b>	<b>458</b>	<b>69,2</b>	<b>662</b>	<b>100,0</b>

Tabela 04: Comparação dos resultados obtidos pelas técnicas GE x Nested-PCR.

O cálculo da co-positividade e co-negatividade da nested-PCR em relação à G.E., padrão-ouro no diagnóstico da malária, foi calculado utilizando o programa EpiInfo



6.0. Para a espécie *P. falciparum* a co-positividade obtida foi de 78,4% e a co-negatividade de 98,5%, para a espécie *P. vivax* foram obtidos os valores de 73,8% e 97,5% para co-positividade e co-negatividade respectivamente.

#### G.E. x Nested-PCR – *P. falciparum*

		Gota Espessa	
		Positivo	Negativo
Nested PCR	Positivo	160	7
	Negativo	44	451

Co-positividade: 78,4% (72% - 83,7%) intervalo de confiança: 95%

Co-negatividade: 98,5% (96,7% - 99,3%) intervalo de confiança: 95%

#### G.E. x Nested-PCR – *P. vivax*

		Gota Espessa	
		Positivo	Negativo
Nested PCR	Positivo	338	5
	Negativo	120	199

Co-positividade: 73,8% (69,5% - 77,7%) intervalo de confiança: 95%

Co-negatividade: 97,5% (94,1% - 99,1%) intervalo de confiança: 95%

- **GE x Nested-PCR x PCR em Tempo Real**

Para melhor visualização de todos os experimentos realizados foram agrupados os resultados obtidos pelas três técnicas de diagnóstico empregadas neste estudo (Tabela 05). Através da comparação dos resultados é possível identificar total

concordância entre as técnicas em 91 (32,9%) amostras, diagnosticadas como *P. falciparum*, 7 (2,5%) amostras identificadas como *P. vivax*. Além desses resultados houve concordância também entre as duas técnicas de diagnóstico molecular em 15 (5,5%) amostras identificadas como infecção mista, 1 (0,4%) amostra identificada como *P. vivax* e 2 (0,7%) identificadas como negativas.

<b>N (277)</b>	<b>G.E.</b>	<b>Nested-PCR</b>	<b>PCR Tempo Real</b>
<b>91 (32,9%)</b>	<b><i>pf</i></b>	<b><i>pf</i></b>	<b><i>pf</i></b>
69 (24,9%)	<i>pf</i>	<i>pf</i>	Ng
2 (0,7%)	<i>pf</i>	Ng	<i>pf</i>
2 (0,7%)	<i>pf</i>	Ng	Ng
3 (1,1%)	<i>pf</i>	<i>pv</i>	Ng
17 (6,1%)	<i>pf</i>	<i>pv+pf</i>	<i>pf</i>
7 (2,5%)	<i>pf</i>	<i>pf+pv</i>	Ng
1 (0,4%)	<i>pf</i>	<i>pv</i>	<i>pf</i>
1 (0,4%)	<i>pf</i>	<i>pv</i>	<i>pv</i>
<b>9 (3,2%)</b>	<b><i>pf</i></b>	<b><i>pv+pf</i></b>	<b><i>pv+pf</i></b>
2 (0,7%)	<i>pf</i>	<i>pv+pf</i>	<i>pv</i>
2 (0,7%)	<i>pv</i>	<i>pf</i>	<i>pv+pf</i>
3 (1,1%)	<i>pv</i>	<i>pv</i>	Ng
25 (9%)	<i>pv</i>	<i>pv+pf</i>	Ng
<b>7 (2,5%)</b>	<b><i>pv</i></b>	<b><i>pv</i></b>	<b><i>pv</i></b>
30 (10,8%)	<i>pv</i>	<i>pv+pf</i>	<i>pv</i>
<b>6 (2,2%)</b>	<b><i>pv</i></b>	<b><i>pv+pf</i></b>	<b><i>pv+pf</i></b>

Tabela 05: Comparação dos resultados obtidos pelas três técnicas utilizadas no estudo, G.E. x Nested-PCR x PCR Tempo Real.

Após comparação dos resultados obtidos por ambos os métodos, realizou-se a seleção das amostras utilizadas na genotipagem de *P. falciparum* e *P. vivax*. Para o presente estudo foram consideradas apenas as amostras que obtiveram total concordância nos métodos de diagnóstico empregados.

## 4.5 GENOTIPAGEM – *P. falciparum*

### 4.5.1 Gene *pfcr*t

Para o estudo de mutações pontuais no gene *pfcr*t, marcador de resistência à CQ, foram utilizadas sondas de hibridação, contendo corantes fluorescentes, cujas sequências reconhecem os alelos mutantes M74I, N75E e K76T. A detecção foi por meio de sistema de PCR em tempo real, utilizando curva de dissociação para obtenção dos perfis genéticos, segundo metodologia descrita por de Monbrison *et al.*, 2003.

Treze amostras de DNA de *P. falciparum*, dos municípios de Manaus (8), Careiro (3), Humaitá (1) e Tefé (1) foram analisadas, utilizando como controles das reações os clones, HB3, sensível à cloroquina e com perfil selvagem, 7G8, clone sul-americano com a mutação K76T e W2, mutante para as três posições citadas. Das oito amostras analisadas da cidade de Manaus, duas não apresentaram o perfil 7G8, mutante 76T. Uma amostra apresentou o perfil semelhante ao observado na cepa W2 e a outra um perfil intermediário entre os controles HB3 e 7G8, indicando um híbrido desses dois genótipos. Todas as demais amostras demonstraram perfil semelhante ao do clone 7G8, mutante 76T (Figura 10).

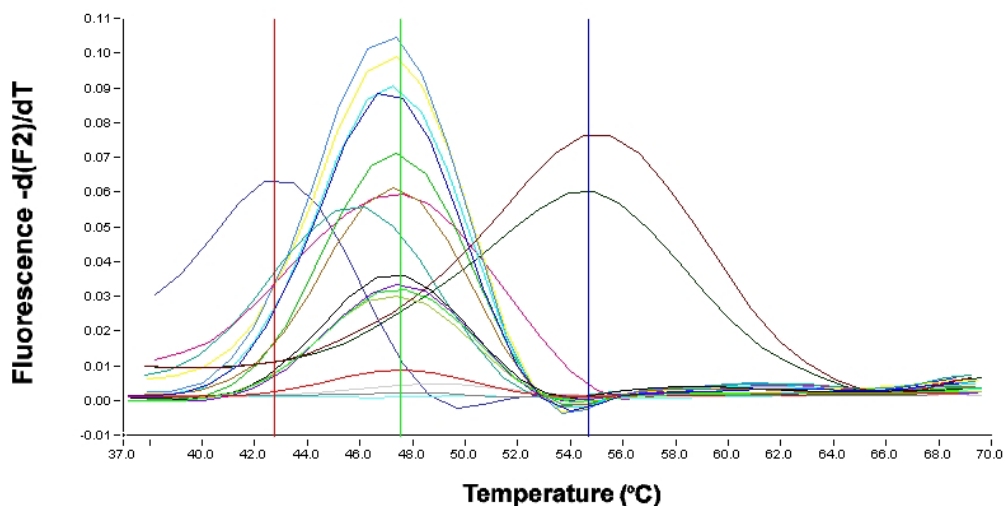


Figura 11: Gráfico das curvas de dissociação das amostras de *P. falciparum* analisadas por meio de sondas de hibridação. Linha vermelha indica a temperatura de dissociação ( $T_m$ ) do controle HB3, Linha verde indica a  $T_m$  do controle 7G8 e a linha azul indica a  $T_m$  do controle W2.

#### 4.5.2 Gene *pfATP6*

- SEQUENCIAMENTO DE DNA

Para obtenção do segmento de DNA de aproximadamente 3kb do gene *pfatp6* e busca de novas mutações foram selecionadas 12 amostras de DNA de 10 diferentes localidades (**Autazes** lat. S 03° 34'40,3" e long. O 059° 07'47,9", **Barcelos** lat. S 00° 28'59,7" e long. O 062° 55'24,6", **Borba** lat. S 04° 23'18,6" e long. O 059° 35'40,4", **Coari** lat. S 04° 05'05,4" e long. O 063° 08'26,4", **Guajará** lat. S 07° 17'46,5" e long. O 072° 38'19,3"), **Humaitá** lat. S 07° 31'17,5" e long. O 063° 01'45,7", **Itacoatiara** lat. S 03° 08'29,5" e long. O 058° 26'36,3", **Manaus** lat. S 03° 05'13,3" e long. O 060° 2'5,13", **São Gabriel da Cachoeira** lat. S 00 07'29,2" e long. O 067° 05 74,8" e **Tefé** lat. S 03° 20'48,2" e long. O 064° 42'29,1") (Figura 11).

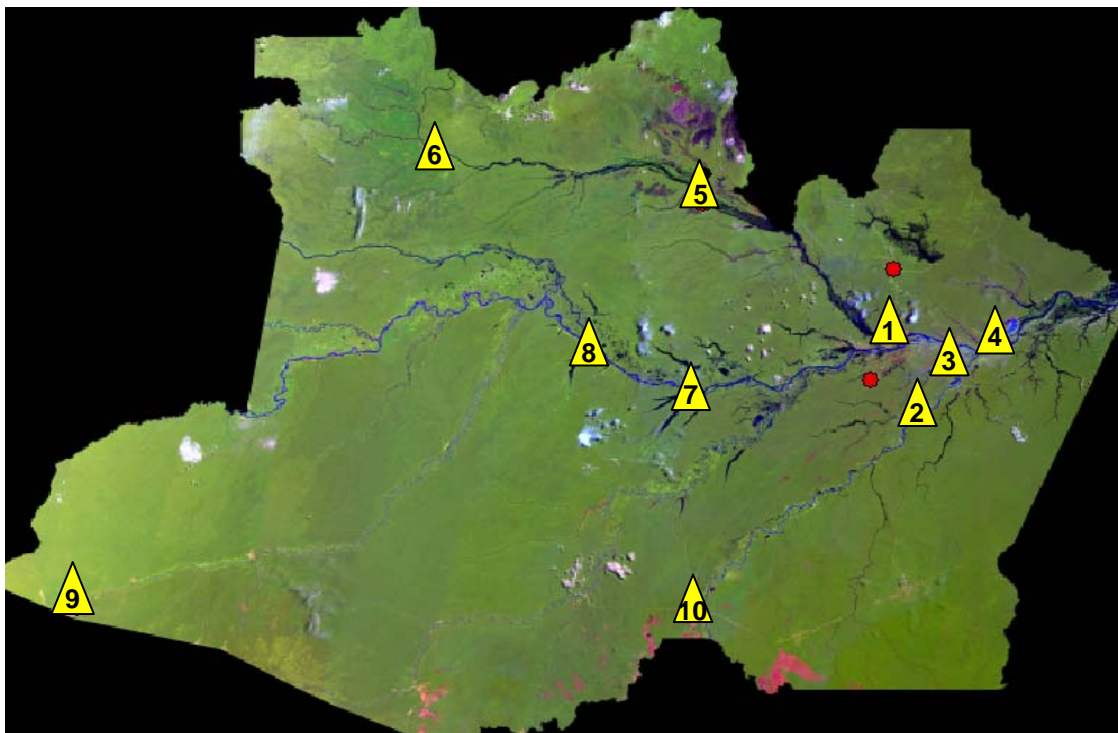


Figura 12: Localização das amostras sequenciadas. 1. Manaus, 2. Borba, 3. Autazes, 4. Itacoatira, 5. Barcelos, 6. São Gabriel da Cachoeira, 7. Coari, 8. Tefé, 9. Guajará, 10. Humaitá

Utilizando cinco pares de oligoiniciadores descritos por Ferreira et al., 2007, foram amplificados para cada amostra de DNA os cinco produtos de PCR contendo a região de interesse, gene *pfatp6* (Figura 12).

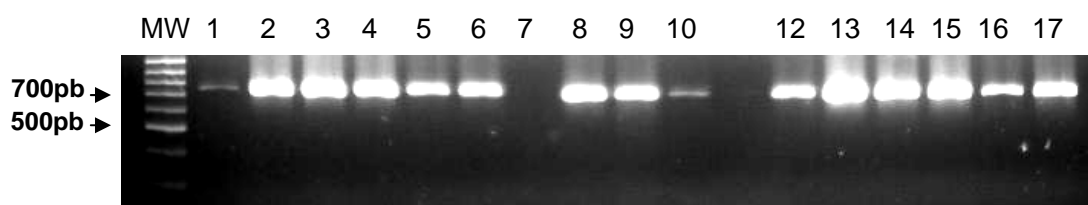


Figura 13: Foto ge gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador UV, contendo os produtos de amplificação obtidos com diferentes primers. Raias 1 a 10: Amplicons gerados pelos primers 3F/4R; Raias 12 a 19: Amplicons gerados pelos primers 7F/8R.

Após visualização em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, foi realizada a purificação dos produtos de pcr para realização da reação de sequenciamento. A purificação foi realizada utilizando o kit comercial ILLUSTRATE<sup>TM</sup>, GE Healthcare. Os produtos de PCR foram sequenciados diretamente, sem a etapa de clonagem, utilizando corantes Big Dye Terminator, Applied Biosystems, v.3.1. Foram utilizados no sequenciamento ambos os oligoiniciadores, obtendo-se, assim, duas seqüências para cada produto de PCR em cada amostra analisada (Figura 13).

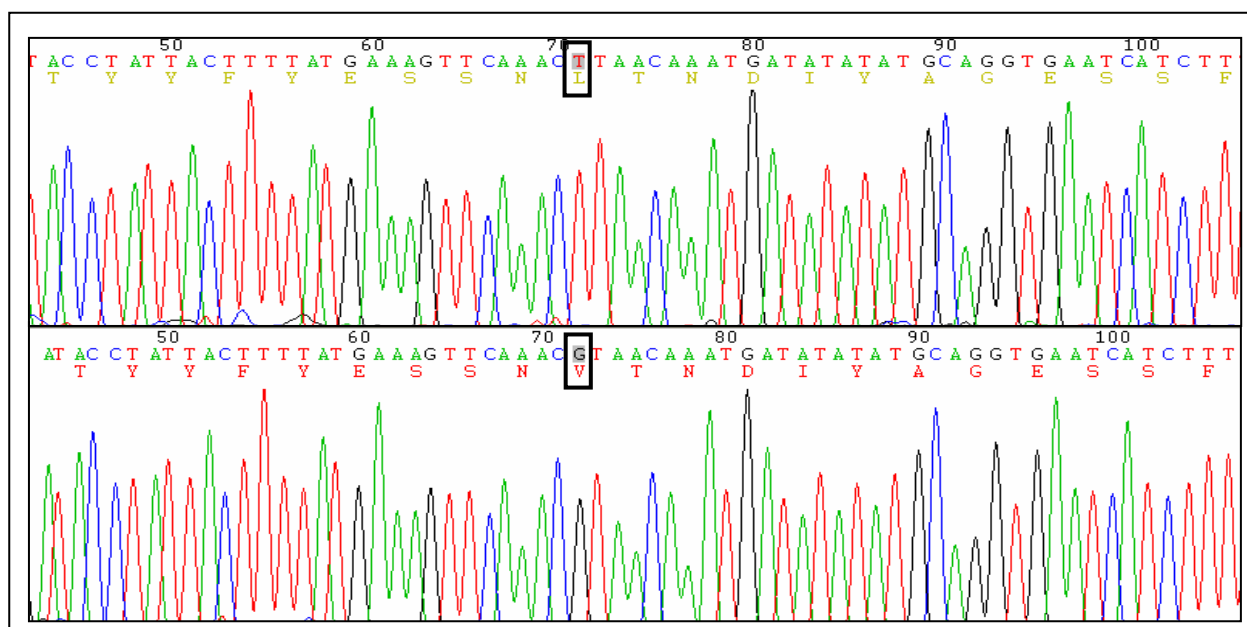


Figura 14: Eletroferogramas obtidos utilizando o programa ClustalX, contendo uma amostra com perfil selvagem e uma com perfil mutante para posição T1204G, detectada em amostra do município de Guajar.

As seqüências obtidas, utilizando o oligoiniciador reverso, foram editadas utilizando software disponvel on line (<http://www.bioinformatics.org/sms/>) para obteno da sequencia complementar e reversa. As sequencias editadas foram alinhadas  obtida pelo primeiro oligoiniciador e  seqncia do clone 3D7 para confirmao dos pontos de mutao. Os alinhamentos foram realizados utilizando software disponvel on line (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>) (Figura 14).

	1051					1100
p.f. 3D7	GATGTACAAC	GGTTATATGT	TCTGATAAAA	CAGGTACCCT	TACAACAAAT	
pf. AM28	GATGTACAAC	GGTTATATGT	TCTGATAAAA	CAGGTACCCT	TACAACAAAT	
	1101					1150
p.f. 3D7	CAAATGACAA	CAACCGTGTT	TCATTTGTTT	AGAGAATCTG	ATTCTTTAAC	
pf. AM28	CAAATGACAA	CAACCGTGTT	TCATTTGTTT	AGAGAATCTG	ATTCTTTAAC	
	1151					1200
p.f. 3D7	AGAATACCAA	CTATGTCAAA	AAGGGGATAC	CTATTACTTT	TATGAAAGTT	
pf. AM28	AGAATACCAA	CTATGTCAAA	AAGGGGATAC	CTATTACTTT	TATGAAAGTT	
	1201					1250
p.f. 3D7	CAAAC <del>T</del> TAAC	AAATGATATA	TATGCAGGTG	AATCATCTTT	TTTTAATAAA	
pf. AM28	CAAAC <del>G</del> TAAC	AAATGATATA	TATGCAGGTG	AATCATCTTT	TTTTAATAAA	
	1251					1300
p.f. 3D7	TTAAAAGATG	AAGGAAATGT	TGAAGCTTTA	ACGGATGATG	GAGAAGAAGG	
pf. AM28	TTAAAAGATG	AAGGAAATGT	TGAAGCTTTA	ACGGATGATG	GAGAAGAAGG	
	1301					1350
p.f. 3D7	ATCAATTGAT	GAAGCTGATC	CATATAGTGA	TTATTTTCT	AGTGATAGTA	
pf. AM28	ATCAATTGAT	GAAGCTGATC	CATATAGTGA	TTATTTTCT	AGTGATAGTA	
	1351					1400
p.f. 3D7	AGAAAATGAA	AAATGATTTA	AACAACAACA	ATAATAATAA	TAATAATAGT	
pf. AM28	AGAAAATGAA	AAATGATTTA	AACAACAACA	ATAATAATAA	TAATAATAGT	

Figura 15: Alinhamento da sequencia do clone 3D7, padrão de perfil molecular selvagem, com a sequencia da amostra 28, coletada no município de Humaitá, com a identificação da mutação 1204G.

Foram detectados perfis mutantes em todas as amostras analisadas, e os pontos de mutações localizados nos nucleotídeos 1204, 1888 e 2694. A primeira mutação, na posição 1204 onde houve a troca do nucleotídeo T→G e consequente alteração do aminoácido transcrito, Leucina (TTA) → Valina (GTA), foi observada em três amostras analisadas, duas do município de Guajará e uma do município de Humaitá.

A segunda mutação analisada, na posição 1888, apresentou a troca do nucleotídeo G→T e consequente alteração do aminoácido transcrito, Alanina (GCT) → Serina (TCT). Esta mutação foi encontrada nas mesmas amostras que apresentaram a mutação da posição 1204 e em mais seis amostras, duas do

município de Manaus e quatro distribuídas nos municípios de Tefé, São Gabriel da Cachoeira, Coari e Borba.

A terceira mutação detectada localiza-se na posição 2694, onde se pode observar a troca de nucleotídeos T→A, sem alteração na transcrição do aminoácido (Isoleucina) e foi encontrada em todas as 12 amostras analisadas (Quadro 3).

	NS	NS	NS	NS	NS	Sin
Amostra	110	1204	1888	1916	2306	2694
3D7	G	T	G	G	G	T
AM60	G	T	G	G	G	A
AM70	G	T	G	G	G	A
AM84	G	T	G	G	G	A
AM13	G	T	T	G	G	A
AM24	ND	T	T	G	G	A
AM88	G	T	T	G	G	A
AM116	G	T	T	G	G	A
AM123	G	T	T	G	G	A
AM222	G	T	T	G	G	A
AM28	G	G	T	G	G	A
AM103	G	G	T	G	G	A
AM106	G	G	T	G	G	A

Quadro 03: Haplótipos das amostras analisadas por sequenciamento automático.

#### • PCR-RFLP

A busca de mutações conhecidas no gene *pfATP6* foi realizada através de ensaios de PCR-RFLP e PIRA-PCR (*Primer-introduced restriction analysis*), desenhados especificamente para a detecção das mutações anteriormente encontradas em amostras brasileiras. Foram analisados três pontos de mutação no gene *pfatp6*: G1916A, G2306A e T2694A, em 54 amostras de *P. falciparum*



coletadas nos municípios de Autazes, Barcelos, Borba, Coari, Guajará, Humaitá, Itacoatiara, Manaus, São Gabriel da Cachoeira e Tefé (Tabela 6).

### **Mutação G1916A**

Através da técnica de PIRA-PCR foi criado o sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *PagI*, devido à ausência de sítio de restrição natural na sequência a ser estudada. Houve a inserção do nucleotídeo “T” na posição 22 do oligoiniciador utilizado para criar o sítio de restrição da enzima *PagI* (**T↓CATGA**) e a consequente diferenciação das amostras com perfil selvagem, produto de PCR com o tamanho de 170pb e perfil mutante, com 2 fragmentos, um de 144pb e outro de 22pb.

Na presença do alelo mutante “A”, a enzima reconhece o sítio-alvo e corta o produto de PCR em dois fragmentos. Na presença do alelo selvagem “G” não há o reconhecimento do gene o produto de PCR não sofre digestão enzimática, permanecendo com o tamanho inicial.

<b>N</b>	<b>Fragmentos</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>Tamanho (bp)</b>
1	<i>PagI</i> -(Direita)	23-166	144
2	(Esquerda)- <i>PagI</i>	01 - 22	22

Foram analisadas 54 amostras de *P. falciparum* estudadas, em 5 amostras não houve amplificação do produto-alvo. As 49 amostras amplificadas apresentaram o

alelo selvagem no nucleotídeo 1916, mantendo o mesmo perfil observado no clone 3D7 (Figura 15).

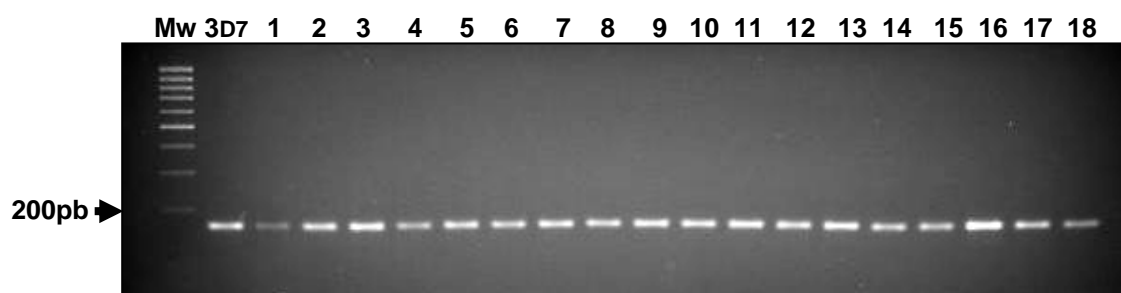


Figura 16: Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, e visualizado em transiluminador UV, contendo amostras de 1 a 18, após digestão enzimática.

### Mutação G 2306A

Devido a ausência de sítios de restrição naturais assim como observado na mutação anterior, foi adicionado ao iniciador o nucleotídeo “C” na posição 22, o que permitiu a criação do sítio de restrição artificial para a enzima *BsPTI – AfIII* ( $C^{\downarrow}TTAAG$ ).

Na presença do alelo selvagem G, a enzima de restrição reconhece o sítio-alvo de digestão e obtêm-se, como produto, dois fragmentos de DNA. Na presença do alelo mutante a enzima é incapaz de exercer sua função, não ocorre a digestão enzimática e o produto de PCR permanece inalterado.

N	Fragmentos	Coordenadas	Tamanho (bp)
1	BspTI-(Direita)	23-272	250
2	(Esquerda)-BspTI	01 - 22	22

Das 54 amostras analisadas 8 não amplificaram o produto alvo, 44 foram analisadas e nenhuma dessas amostras apresentou o alelo mutante no nucleotídeo 2306, apenas o perfil selvagem, semelhante ao perfil do clone 3D7, utilizado como controle da reação (Figura 16).

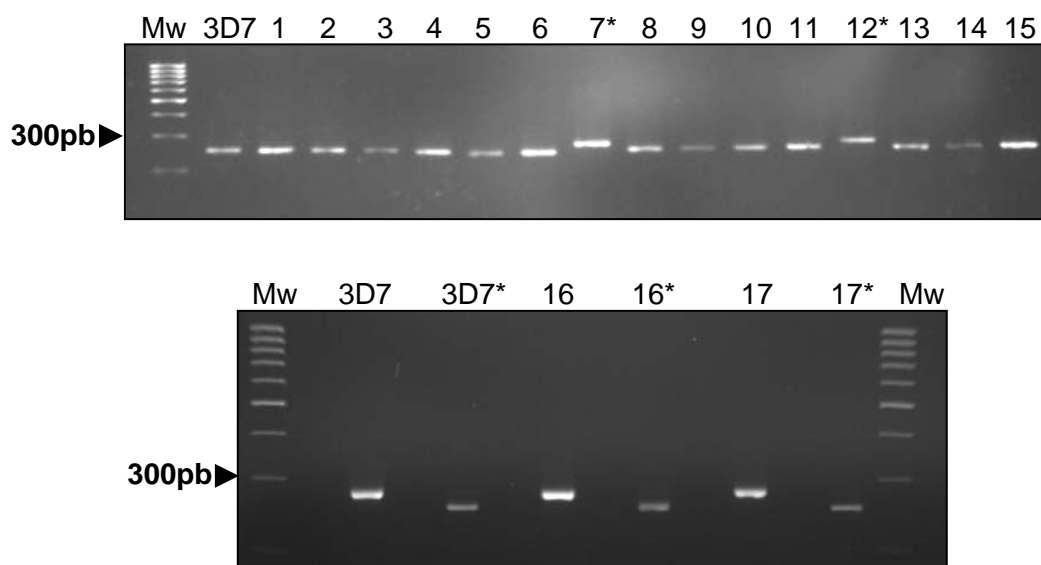


Figura 17: Foto ilustrando gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, e visualizado em transiluminador UV. \* Amostras não digeridas incluídas no gel para facilitar a visualização da restrição.

### Mutação T2694A

Na sequência de DNA próxima ao ponto de mutação 2694 foram reconhecidos dois sítios de restrição para a enzima *Tas I* ( $\downarrow$ AATT). Dessa forma, foram desenhados oligoiniciadores para amplificação de um produto de aproximadamente 270pb. Na presença do alelo selvagem T, a enzima reconhece dois sítios de restrição, gerando três fragmentos de DNA de tamanhos 142pb, 39pb e 1pb.

N	Fragmentos	Coordenadas	Tamanho (bp)
1	TasI-(Direita)	41 - 182	142
2	TasI - TasI	2 - 40	39
3	(Esquerda)-TasI	1 - 1	1

Na presença do alelo mutante, apenas um sítio de restrição é reconhecido pela enzima, gerando dois fragmentos com 181pb e 1pb, tamanhos distintos aos observados na presença do alelo selvagem.

N	Fragmentos	Coordenadas	Tamanho (bp)
1	TasI-(Direita)	2 - 182	181
2	(Esquerda)-TasI	1 - 1	1

Foram analisadas 54 amostras de *P. falciparum*, apenas 1 amostra não amplificou o produto-alvo. Observou-se a presença do alelo mutante em 100% das amostras analisadas, diferenciando-as do perfil exibido pelo clone 3D7, perfil selvagem (Figura 17).

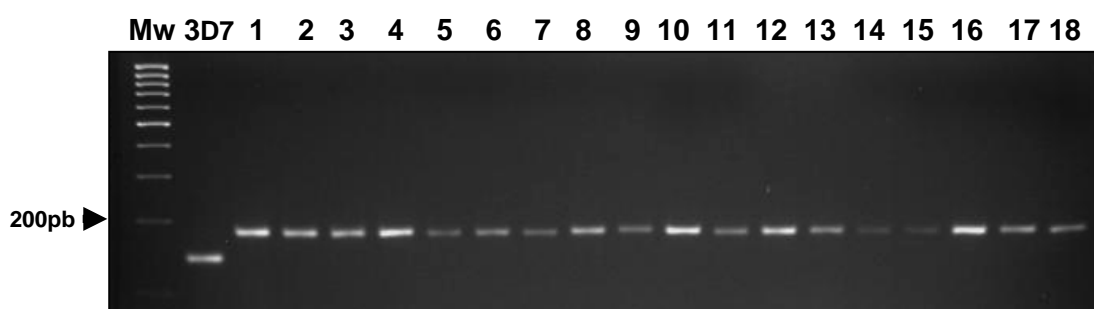


Figura 18: Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, e visualizado em transiluminador UV. Amostras digeridas com a enzima *Tas I*.

Localidade	Amostra	1916	2306	2694
Holanda	3D7*	G	G	T
TF	AM12	G	G	A
TF	AM13	G	G	A
TF	AM15	G	G	A
TF	AM16	G	G	A
TF	AM17	G	G	A
TF	AM18	G	G	A
TF	AM21	G	G	A
SGC	AM24	G	G	A
SGC	AM25	G	G	A
HT	AM26	G	G	A
HT	AM28	G	G	ND
HT	AM29	G	G	A
HT	AM30	G	G	A
HT	AM31	G	G	A
BC	AM60	G	G	A
ITA	AM68	ND	ND	A
ITA	AM70	G	G	A
ITA	AM71	G	G	A
ITA	AM73	G	G	A
ITA	AM75	G	G	A
ITA	AM77	G	G	A
ITA	AM78	G	ND	A
AUT	AM82	G	G	A
AUT	AM84	G	G	A
AUT	AM85	G	G	A
COA	AM88	G	G	A
COA	AM94	G	G	A
COA	AM97	G	G	A
COA	AM99	G	G	A
COA	AM100	G	G	A
COA	AM102	G	G	A
GJR	AM103	G	G	A
GJR	AM105	ND	ND	A
GJR	AM106	G	G	A
GJR	AM108	G	ND	A
GJR	AM109	G	ND	A
GJR	AM110	G	G	A
GJR	AM113	ND	ND	A
GJR	AM114	G	G	A
BOR	AM116	G	G	A
BOR	AM118	G	G	A
BOR	AM120	G	G	A
MAN	AM123	G	G	A
MAN	AM128	G	G	A
MAN	AM129	G	G	A
MAN	AM133	ND	ND	A
MAN	AM153	ND	ND	A
MAN	AM155	G	G	A
MAN	AM156	G	G	A
MAN	AM157	G	G	A
MAN	AM161	G	G	A
MAN	AM211	G	G	A
MAN	AM212	G	G	A
MAN	AM222	G	G	A

Tabela 06: Resultados totais das amostras analisadas por PCR-RFLP. Legenda: TF: Tefé, SGC: São Gabriel da Cachoeira, HT: Humaitá, BC: Barcelos, ITA: Itacoatiara, AUT: Autazes, COA: Coari, GJR: Guajará, BOR: Borba, MAN: Manaus. ND: Não determinado. \* Cepa padrão do experimento.

## GENOTIPAGEM – *P. vivax*

Para genotipagem de 100 amostras de *P. vivax* utilizando o gene *pvm-dr* foram utilizadas sondas Taqman® MGB especialmente desenhadas para detecção de mutações pontuais nos códons 976 e 1076, através de sistema de PCR em Tempo Real (Gráfico 1).

A análise da primeira mutação pontual, no codon 976, onde há a alteração do segundo nucleotídeo do codon (TAC→TTC) conferindo a troca do aminoácido transcrito de Tirosina para Fenilalanina demonstrou a presença do alelo mutante em 11 amostras analisadas (Figura 18). As amostras estão distribuídas entre quatro municípios estudados: Manaus, Autazes, Coari e Tefé. Adicionalmente à detecção do alelo mutante pode-se observar também a identificação do alelo selvagem nas amostras citadas, caracterizando infecção por múltiplos clones em uma mesma amostra.

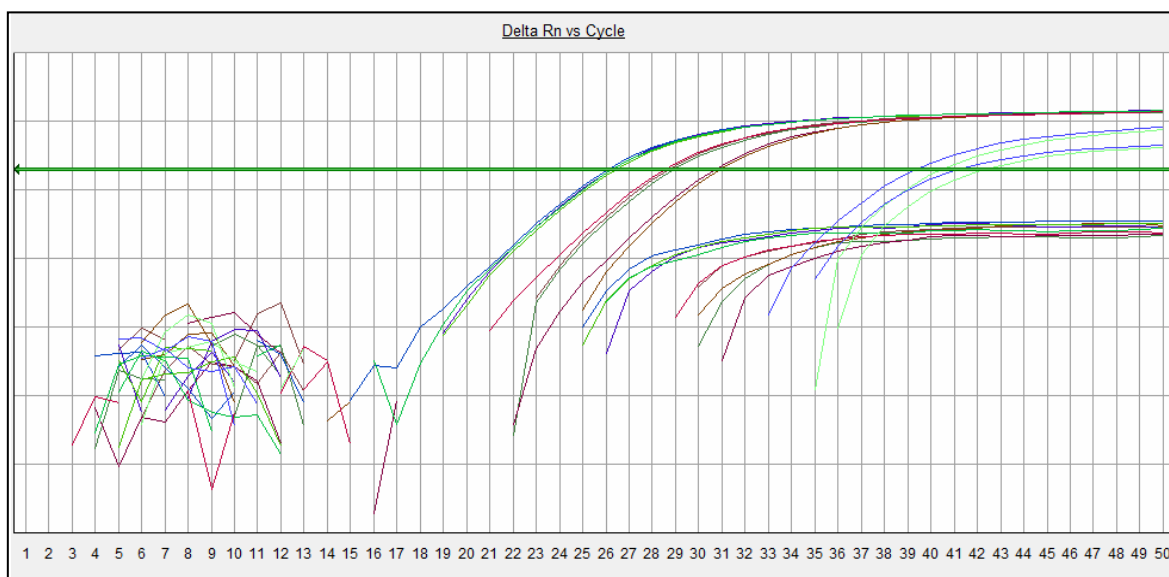


Figura 19: Curva de amplificação de amostras de *P. vivax*, utilizando iniciadores e sondas para o estudo da mutação Y976F. Amostras em duplicata, com diferentes concentrações de DNA, e diferentes genótipos, três Y976 e uma Y976F (infecção mista).

A análise da segunda mutação pontual, no códon 1076, houve a alteração do primeiro nucleotídeo do codon (TTT→CTT), também de caráter não sinônimo, alterando o aminoácido transcrito, Fenilalanina para Leucina. O alelo mutante foi observado em 11 amostras analisadas, exatamente as mesmas 11 amostras mutantes para o codon anterior. Todas as amostras que apresentaram o alelo mutante para a primeira mutação, apresentaram mutação também no segundo ponto analisado (Tabela 7).

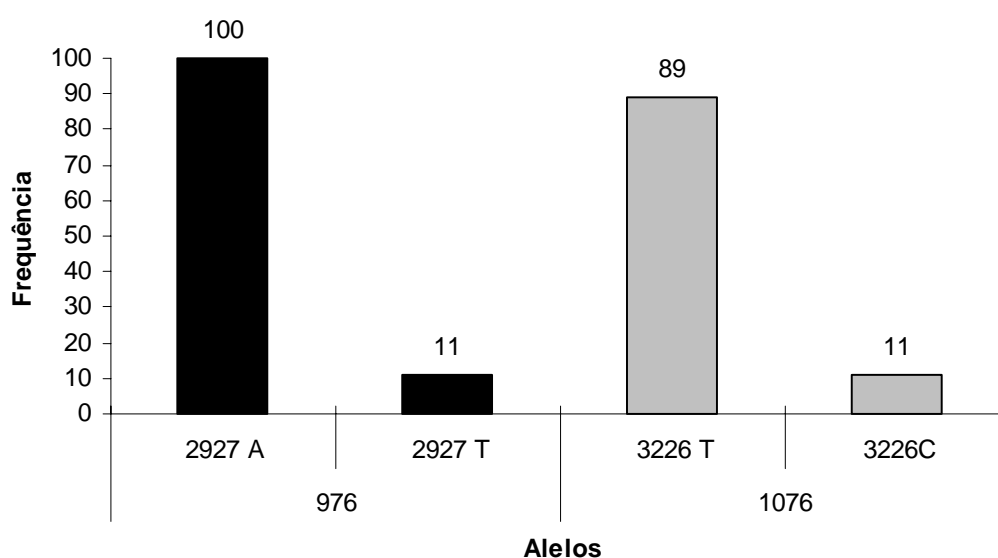


Gráfico 1: Distribuição da frequência das mutações estudadas no gene *pvMDR*, codons 976 e 1076.

Nº	LOCALIDADE	976	1076
<b>Sall</b>	<b>El Salvador</b>	<b>Y</b>	<b>F</b>
AM234	TEFÉ	Y	F
AM235	TEFÉ	Y	F
AM236	TEFÉ	Y	F
AM237	TEFÉ	Y	F
AM238	TEFÉ	Y	F
AM239	TEFÉ	Y / F	L
AM240	TEFÉ	Y	F
AM241	TEFÉ	Y	F
AM242	TEFÉ	Y	F
AM245	SÃO GABRIEL	Y	F
AM248	SÃO GABRIEL	Y	F
AM250	SÃO GABRIEL	Y	F
AM252	SÃO GABRIEL	Y	F
AM254	HUMAITÁ	Y	F
AM255	HUMAITÁ	Y	F
AM256	HUMAITÁ	Y	F
AM257	HUMAITÁ	Y	F
AM258	HUMAITÁ	Y	F
AM259	HUMAITÁ	Y	F
AM260	HUMAITÁ	Y	F
AM261	HUMAITÁ	Y	F
AM262	HUMAITÁ	Y	F
AM263	HUMAITÁ	Y	F
AM264	HUMAITÁ	Y	F
AM265	HUMAITÁ	Y	F
AM266	HUMAITÁ	Y	F
AM267	HUMAITÁ	Y	F
AM268	HUMAITÁ	Y	F
AM269	HUMAITÁ	Y	F
AM270	HUMAITÁ	Y	F
AM271	HUMAITÁ	Y	F
AM272	CAREIRO	Y	F
AM273	CAREIRO	Y	F
AM274	CAREIRO	Y	F
AM275	CAREIRO	Y	F
AM276	CAREIRO	Y	F
AM278	CAREIRO	Y	F
AM280	CAREIRO	Y	F
AM281	CAREIRO	Y	F
AM282	CAREIRO	Y	F
AM289	CAREIRO	Y	F
AM290	CAREIRO	Y	F
AM291	CAREIRO	Y	F
AM294	CAREIRO	Y	F
AM295	CAREIRO	Y	F
AM296	CAREIRO	Y	F
AM322	BARCELOS	Y	F
AM323	BARCELOS	Y	F
AM324	BARCELOS	Y	F
AM325	BARCELOS	Y	F
AM326	BARCELOS	Y	F

Tabela 7: Resultados de Genotipagem do gene *pvmdr*, identificando o local de origem das amostras e os aminoácidos presentes. Legenda: Y: Treonina, F: Fenilalanina, L: Leucina.



Nº	LOCALIDADE	976	1076
AM327	BARCELOS	Y	F
AM328	BARCELOS	Y	F
AM329	BARCELOS	Y	F
AM331	GUAJARÁ	Y	F
AM332	GUAJARÁ	Y	F
AM333	GUAJARÁ	Y	F
AM334	GUAJARÁ	Y	F
AM336	ITACOATIARA	Y	F
AM337	ITACOATIARA	Y	F
AM338	ITACOATIARA	Y	F
AM341	AUTAZES	Y / F	L
AM342	AUTAZES	Y / F	L
AM343	AUTAZES	Y / F	L
AM344	AUTAZES	Y	F
AM347	PRES. FIGUEIREDO	Y	F
AM348	PRES. FIGUEIREDO	Y	F
AM349	PRES. FIGUEIREDO	Y	F
AM356	COARI	Y / F	L
AM357	COARI	Y	F
AM359	COARI	Y	F
AM360	COARI	Y	F
AM361	COARI	Y	F
AM362	COARI	Y / F	L
AM363	COARI	Y	F
AM364	COARI	Y	F
AM365	COARI	Y	F
AM366	COARI	Y	F
AM369	BORBA	Y	F
AM370	BORBA	Y	F
AM371	BORBA	Y	F
AM375	MANAUS	Y	F
AM373	MANAUS	Y / F	L
AM385	MANAUS	Y	F
AM386	MANAUS	Y	F
AM387	MANAUS	Y	F
AM388	MANAUS	Y / F	L
AM390	MANAUS	Y	F
AM391	MANAUS	Y / F	L
AM392	MANAUS	Y	F
AM394	MANAUS	Y	F
AM395	MANAUS	Y	F
AM397	MANAUS	Y / F	L
AM398	MANAUS	Y	F
AM404	MANAUS	Y	F
AM406	MANAUS	Y	F
AM409	MANAUS	Y / F	L
AM411	MANAUS	Y	F
AM412	MANAUS	Y	F
AM414	MANAUS	Y	F
AM419	MANAUS	Y	F

Tabela 7: Resultados de Genotipagem do gene *pvm<sub>dr</sub>*, identificando o local de origem das amostras e os aminoácidos presentes. Legenda: Y: Treonina, F: Fenilalanina, L: Leucina (continuação).

## 5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Segundo recomendações da Organização Mundial de Saúde, o diagnóstico precoce e o imediato tratamento da malária são direitos fundamentais das populações residentes em áreas de risco e constituem as bases para o controle da endemia. O tratamento precoce e efetivo é capaz de reduzir a duração da doença e prevenir seu agravamento clínico da doença, com a consequente diminuição da mortalidade (WHO, 2005).

O diagnóstico da malária em regiões endêmicas permanece sendo realizado através da tradicional técnica da gota espessa, que apresenta como vantagens baixo-custo, a possibilidade de diferenciação entre espécies e identificação de formas sexuais responsáveis por manter o ciclo de transmissão da doença (WHO, 2001). Dentre as desvantagens dessa técnica tem-se a necessidade de pessoal técnico experiente, com acesso a bons equipamentos e corantes, reduzida sensibilidade em baixas parasitemias, dificuldade para diferenciação entre formas jovens de diferentes espécies, gerando subnotificação dos casos de infecções mistas ou erro no diagnóstico da espécie (COLEMAN *et al.*, 2002).

A busca por técnicas diagnósticas com maior sensibilidade e especificidade se faz necessária por diferentes razões, seja na confirmação do diagnóstico em casos de malária grave, para eficaz identificação de assintomáticos ou para o monitoramento da resposta terapêutica.

O emprego de técnicas de diagnóstico molecular por amplificação genômica por PCR é uma alternativa cada vez mais utilizada, dada a elevada sensibilidade e

especificidade da técnica, que são superiores a observada nos demais testes diagnósticos. Porém, a utilização em larga escala como rotina laboratorial não é aconselhada devido principalmente ao elevado custo, necessidade de área e pessoal habilitados e em virtude da demora para obtenção do resultado (HANSCHIED, T., 1999).

Inúmeros protocolos de PCR para a detecção de uma ou mais espécies estão disponíveis na literatura, e baseiam-se, principalmente, na detecção de sequências do gene da subunidade menor do RNA ribossomal do *Plasmodium sp* (ssurRNA) (SNOUNOU *et al.*, 1993, TIRASOPHON *et al.*, 1994).

Através da utilização de substâncias fluorescentes capazes de ligarem-se ao DNA alvo, permitindo a sua detecção, foi possível o desenvolvimento da metodologia de PCR em Tempo Real. Esta técnica realiza o monitoramento da fluorescência emitida a cada ciclo de amplificação, permitindo não só a identificação da espécie, como também a quantificação da amostra (de MONBRISON *et al.*, 2003, MANGOLD *et al.*, 2005). Há técnicas descritas na literatura para a detecção de uma ou todas as quatro espécies capazes de parasitar o homem, utilizando a molécula fluorescente Sybr green (HERMSEN *et al.*, 2001, FABRE *et al.*, 2003) ou através da utilização de sondas marcadas com diferentes moléculas (Taqman®), específicas para a identificação das espécies presente (ROUGEMONT *et al.*, 2004), ambos com grande redução no tempo de diagnóstico, em média 3 horas, e diminuição da contaminação devido a maior automação do processo.

No presente trabalho, foram utilizadas duas tecnologias de diagnóstico molecular: a Nested-PCR descrita por Snounou *et al.*, 1993 e a PCR em tempo real (de MONBRISON *et al.*, 2003), padronizada para aplicação na Gerência de Malária da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, centro de referência na pesquisa da malária na região. Objetivou-se a confirmação do diagnóstico obtido pela técnica da gota espessa e identificação de infecções mistas não detectadas em projetos de investigações científicas.

Através da técnica da gota espessa foram obtidas 458 (69,2%) amostras de *P. vivax* e 204 (30,8%) de *P. falciparum* nas 12 diferentes localidades estudadas. Ao utilizar a técnica de nested-PCR foram detectadas 343 (51,8%) amostras de *P. vivax*, 167 (25,2%) amostras de *P. falciparum* e 148 (22,3%) infecções mistas. Do total de infecções mistas 35 foram identificadas apenas como *P. falciparum* e 113 apenas como *P. vivax* no diagnóstico pela G.E. Em quatro amostras de DNA testadas, todas com diagnóstico de *P. falciparum* pela G.E., não houve amplificação para nenhuma das espécies de *Plasmodium*.

Resultados falso-negativos na técnica da PCR são conhecidos e podem ser causados por perda de DNA durante o processo de extração, baixa concentração de DNA na amostra, ou devido à presença de inibidores da reação de PCR (BARKER *et al.* 1994).

Foram calculadas a co-positividade e a co-negatividade da nested-PCR em relação à G.E. e obteve-se para espécie *P. falciparum* co-positividade de 78,4% (com intervalo de confiança de 95%, obtivemos como limite inferior 72% e como

limite superior 83,7%) e co-negatividade de 98,5% (intervalo de confiança de 95%, limite inferior de 96,7% e limite superior de 99,3%). Para a espécie *P. vivax* foram obtidos como valor de co-positividade 73,8% (intervalo de confiança de 95%, limite inferior de 69,5% e limite superior de 77,7%), e co-negatividade 97,5% (limite inferior 94,1% e limite superior 99,1%, intervalo de confiança de 95%). Em estudo realizado na Tailândia comparando resultados de microscopia e PCR em tempo real foram encontrados valores de co-positividade de 97% e co-negatividade de 100% (SWAN *et al.*, 2005).

Em estudo anterior realizado na Gerência de Malária da FMTAM foram comparadas as técnicas da PCR e gota espessa e foram obtidas resultados de co-positividade de 96,7% e co-negatividade de 62,2% para o *P.falciparum*, co-positividade de 100% e co-negatividade de 78,1% para o *P. vivax* (MANSO, 2004).

Foi realizada a padronização da metodologia de detecção do *Plasmodium sp* por PCR em Tempo Real utilizando como corante fluorescente o Sybr green. De um total de 277 amostras testadas durante a padronização 113 (40,1%) foram positivas para *P. falciparum*, 40 (14,4%) para *P. vivax*, 15 (5,4%) como infecção mista e 109 (39,4%) negativas.

Das infecções mistas analisadas, confirmadas em ambas as técnicas, 9 (3,2%) foram diagnosticadas como *P. falciparum* e 6 (2,2%) como *P. vivax* quando analisadas pela técnica da G.E.

Através da técnica de nested-PCR obteve-se, como resultado para as mesmas 277, amostras o total de 160 (57,8%) identificadas como *P. falciparum*, 15 (5,4%) como *P. vivax*, 98 (35,4%) como infecção mista e 4 (1,4%) como negativas. A concordância entre as técnicas para detecção do *P. falciparum* foi observada em 91 (32,9%) amostras, houve falha na amplificação de 69 (24,9%) amostras, consideradas como negativas na PCR em tempo real. Para amostras de *P. vivax*, houve concordância entre os resultados para 8 (2,9%) amostras, 1 (0,4%) amostra foi discordante em relação à espécie identificada, diagnosticada como *P. falciparum* na G.E. e PCR em tempo real porém *P. vivax* na nested-PCR. Para 6 (2,2%) amostras o resultado foi negativo.

Quatro amostras diagnosticadas como *P. falciparum* na G.E. foram consideradas negativas na nested-PCR. Após análise por PCR em Tempo Real, duas foram positivas para *P. falciparum* e duas permaneceram com resultado negativo. Apesar da sensibilidade superior das técnicas de PCR em relação à microscopia, é possível a obtenção de resultados negativos, mesmo em grandes parasitemias, devido a fatores como degradação do DNA na amostra, presença de inibidores da reação de PCR ou em alguns casos devido a polimorfismos na região de análise do DNA (BARKER *et al.*, 1994, TIRASOPHON *et al.*, 1994).

Das 98 amostras consideradas infecções mistas na nested-PCR, apenas 15 (5,4%) também foram identificadas como infecção mista no PCR em tempo real, 19 (6,9%) foram consideradas apenas infecções por *P. falciparum*, 32 (11,6%) por *P. vivax* e 32 (11,6%) negativas. Não foi possível dar seguimento à evolução desses pacientes diagnosticados como infecções mistas, assim, não se pode afirmar a

viabilidade dos parasitas detectados ou confirmar o desenvolvimento de infecção por ambas as espécies no mesmo paciente.

Em 109 (39,4%) amostras de DNA houve falha na amplificação e identificação da espécie de *Plasmodium* presente. Observou-se para essas amostras a amplificação de produtos inespecíficos, identificados pela presença de curvas de dissociação com temperatura distinta à dos produtos-alvo. Possivelmente tais produtos são dímeros de iniciadores (primer-dimer), causados pela presença de sequências complementares entre os iniciadores utilizados, diminuindo assim a eficiência da reação. Através do programa Primer Express, Applied biosystems, foi possível observar a ligação entre os iniciadores (self-dimer e cross-dimer), sendo este um possível fator inibidor da reação para essas amostras.

Além da diminuição da especificidade por formação de dímeros de iniciadores, o anelamento inespecífico desses iniciadores é outro fator que pode contribuir para a queda da eficiência de reação. Foi realizada uma busca por regiões complementares ao iniciador (*blast*) e pode-se observar total a complementariedade à sequência presente no cromossomo 6 de DNA humano. Apesar do processamento prévio da amostra, com a retirada do creme leucocitário, fonte de DNA humano, ainda permanece na amostra DNA humano contaminante, permitindo a competição pelos iniciadores presentes no meio.

Como alternativa ao protocolo utilizado neste trabalho, foi descrito recentemente um protocolo de PCR em tempo real para diagnóstico da malária, com a vantagem de contar com apenas um par de iniciadores, para identificação das quatro espécies.

Utiliza como região alvo também o gene *ssurRNA*, que contém sequências comuns entre o gênero e distintas entre as espécies. Através da curva de dissociação, necessária para as análises com a molécula Sybr green, pode-se identificar a presença de uma ou mais amostras, devido as diferenças de tamanho e concentração de bases ser diferentes para cada espécie, alterando assim a temperatura de dissociação das mesmas (MANGOLD, *et al.*, 2005).

Boonman *et al.*, 2007 realizaram um estudo comparando três metodologias de PCR para detecção de *Plasmodium sp.*, uma nested-PCR, uma PCR multiplex e PCR em tempo real. Comparando com os resultados obtidos pela gota espessa, foi observada co-positividade de 96,6% e co-negatividade de 89,4%. Houve discordância em 13 (9,6%) diagnósticos e a PCR permitiu a identificação de dois casos negativos na microscopia. Segundo o autor, a utilização da a gota espessa como padrão ouro para comparação entre técnicas reduz a efetividade das novas metodologias, sendo necessária a adoção de diferentes padrões para melhor interpretação dos resultados.

Após comparar os resultados obtidos por ambas as técnicas utilizadas para diagnóstico da malária, foi realizada a seleção das amostras concordantes para posterior utilização em estudos de genotipagem do *P. falciparum* e *P. vivax*. As amostras que obtiveram resultados de infecção mista em qualquer uma das técnicas utilizadas ou que tiveram resultados divergentes quanto à espécie parasitária, foram excluídas do presente estudo, mas permanecem no banco de amostras da FMTAM.



## GENOTIPAGEM – *P. falciparum*

### *pfCRT*

A disseminação de parasitas resistentes aos diferentes antimaláricos pode ser observada em todas as regiões do globo e é este um dos grandes desafios para o controle da malária. A identificação de marcadores moleculares de resistência, com a consequente identificação do perfil molecular de *Plasmodium* circulante são ferramentas de grande importância para o uso efetivo dos antimaláricos (SHARMA, 2005).

A resistência à cloroquina pelo *P. falciparum* foi descrita há mais de quatro décadas, entando maiores esclarecimento a respeito dos mecanismos de ação dessa droga, juntamente com a identificação das moléculas envolvidas nos mecanismos de resistência são recentes. O gene *pfCRT*, responsável pela codificação de uma proteína de membrana presente no vacúolo digestivo do *P. falciparum*, foi proposto como gene responsável pela resistência à CQ - CQR. Estudos clínicos e com amostras de campo de diferentes regiões confirmaram a associação de pontos de mutação, especialmente na posição K76T, ao fenótipo CQR (FIDOCK *et al.*, 2000).

Além do papel na resistência a CQ, mutações no gene *pfCRT*, domínios 1, 4 e 9 podem conferir alterações da susceptibilidade a diferentes antimaláricos, como Quinina e Quinidina (COOPER *et al.*, 2007).

A análise de diferentes haplótipos do gene *pfcr*t permite também a diferenciação geográfica das amostras, uma vez que tais mutações surgiram de forma independente nas diferentes regiões (WOOTON, et al., 2002). Uma investigação em larga escala realizada com amostras da região Amazônica revelou a presença de 5 diferentes haplótipos, S(tct)MNT, S(agt)MNT, CMNT, CIET, e CMET, encontrados nos codons 72 a 76 do gene *pfcr*t. Todas as amostras foram mutantes para a posição K76T, confirmando a presença de parasitas resistentes à CQ. Duas observações foram importantes: a presença do alelo Africano/Asiático CIET em amostras de Manaus e Porto Velho e a presença do haplótipo CMNT em amostras de Tabatinga, haplótipo nunca reportado em amostras brasileiras (VIEIRA *et al.*, 2004).

Através de um ensaio para detecção de mutações por PCR em tempo real descrito por de MONBRISON *et al.*, 2003 foram determinados os perfis genéticos do gene *pfcr*t para treze amostras de DNA de *P. falciparum*, de diferentes localidades. Das amostras analisadas, exceto duas apresentaram o perfil mutante da cepa controle 7G8, mutante para a posição K76T. Mesmo com um menor número de amostras foi possível identificar um isolado de campo com perfil genotípico semelhante ao da cepa W2, confirmando os resultados obtidos em estudos anteriores (VIEIRA *et al.*, 2004). A metodologia empregada não permite a identificação de mutações diferentes às encontradas nos controles utilizados, mas indica a presença das mesmas sob a forma de alteração da temperatura de dissociação, como observado em uma amostra da cidade de Manaus, híbrido entre os perfis HB3 e 7G8.

A genotipagem de marcadores moleculares de resistência a drogas, *pfcr1*, *pfmdr1* e *cg2*, utilizando amostras da Amazônia (Rondônia) demonstrou a presença da mutação K76T em todas as 40 amostras testadas, confirmando os resultados obtidos pelo presente estudo (VIANA et al., 2006).

### ***pfATP6***

Artemisinina e seus derivados são atualmente a classe de antimaláricos mais importante devido a ação efetiva contra parasitas multiresistentes aos diferentes antimaláricos. Os mecanismos de ação desse antimalárico permanecem indefinidos; no entanto, a hipótese aceita recentemente, traz como alvo da droga o gene *pfATP6*, sequência codificante do retículo sarco/endoplasmático ATPase-Ca<sup>2+</sup> (ECKSTEIN-LUDWIG et al., 2003).

Através do sequenciamento de parte do gene *pfATP6* das amostras de *P. falciparum* incluídas nesse estudo foi possível a identificação de perfis mutantes em todas as amostras analisadas. O clone 3D7 foi utilizado como padrão para comparação dos diferentes perfis genéticos.

A mutação 2306, responsável pela alteração S769N, foi observada, inicialmente, em amostras da Guiana Francesa e mostrou associação à diminuição de sensibilidade *in vitro* de amostras isoladas de campo ao artemether. Neste estudo foram identificadas 23 mutações pontuais em amostras da Guiana Francesa, Camboja e Senegal, sendo possível identificar 8 tipos diferentes de proteínas *pfATPase6* (JAMBOU et al., 2005).

Em estudo da susceptibilidade à artemisinina e seus derivados e análise de SNPs associadas a resistência a antimaláricos de amostras africanas foi detectada apenas a mutação silenciosa T2694A em amostras de São Tomé e Príncipe (FERREIRA et al., 2007a).

Até o presente momento apenas um trabalho foi publicado utilizando amostras brasileiras para caracterização do perfil genético do gene *pfATP6* na região amazônica (FERREIRA et al., 2007b). Neste trabalho foram descritos os resultados da análise de 4 SNPs em amostras do estado do Pará, nos nucleotídeos das posições 110, 1916, 2306 e 2694. Não houve a detecção da mutação no nucleotídeo 2306, porém nos demais nucleotídeos as frequências observadas foram 11%, 10% e 83% para as mutações 110A, 1916A e 2694A. Foram realizados ensaios *in vitro* para susceptibilidade do *P. falciparum* a artemisinina e derivados e ficou demonstrada a sensibilidade dos parasitas a estas drogas.

Nas 12 amostras do estado do Amazonas sequenciadas neste presente estudo foram identificadas mutações nos nucleotídeos das posições T1204G, G1888T e T2694A. A mutação no nucleotídeo 1204, não silenciosa, com a alteração do aminoácido transcrito, leucina para uma valina, não havia sido identificada anteriormente em amostras brasileiras, apenas em amostras africanas (dado não publicado/ CRAVO, P. comunicação pessoal).

Agrupando as mutações encontradas com as demais mutações descritas para este gene foram obtidos três haplótipos distintos do gene *pfATP6*. Utilizando os nucleotídeos das posições 1204, 1888, 2306 e 2694 pode-se agrupar os haplótipos da seguinte maneira: TGGA, TTGA e GTGA sendo a frequência observada 25%,

50% e 25% respectivamente. Não houve mutação no nucleotídeo da posição 2306, confirmando os resultados obtidos em amostras do estado do Pará.

Para estudo das mutações 1916, 2306 e 2694 foram utilizados ensaios de PCR-RFLP descritos na literatura (FERREIRA *et al*, 2007b). A análise de 53 isolados de *P. falciparum* de 12 diferentes localidades evidenciou a presença de um único haplótipo quando agrupamos os nucleotídeos das posições 1916, 2306 e 2694: GGA, sendo apenas o último nucleotídeo mutado para 100% das amostras analisadas. Os demais nucleotídeos apresentaram perfil semelhante ao do controle 3D7.

Não é possível verificar a importância das mutações encontradas na resposta à artemisinina e seus derivados, pois não há dados da susceptibilidade *in vitro* ou *in vivo* das amostras utilizadas, no entanto a importância da descrição de tais mutantes é justificada pela ausência de dados a respeito do perfil genético do gene *pfATP6* em amostras da Amazônia.

Recentemente a OPAS iniciou um estudo multicêntrico para avaliação do efeito da administração do Coartem (artemether+lumefantrine) no tratamento de malária por *P. falciparum* nos estados do Amazonas e Pará. A identificação do perfil genético desse gene, principal alvo de ação da artemisinina e seus derivados, permitirá o posterior monitoramento genético para identificação de mutações que possam estar associadas a mecanismos de resistência, antecipando as ações de controle da doença.

## GENOTIPAGEM – *P. vivax*

O *P. vivax* é a espécie predominante na região Amazônica, foi responsável por 396.000 (73,4%) casos da doença apenas no ano de 2006. No mesmo ano foram diagnosticados aproximadamente 134.000 (24,9%) casos de *P. falciparum* e 8.650 (1,6%) casos de infecção mista (SVS/MS).

A malária causada por *P. vivax* apresenta-se de uma forma geral como malária não-grave, há o desenvolvimento da forma branda da doença, quando comparado ao *P. falciparum*. Recentemente, há relatos, na literatura, de casos de malária grave por *P. vivax*, demonstrando mudanças nas manifestações clínicas da doença. (KOCHAR *et al.*, 2005).

A droga utilizada como primeira linha de tratamento permanece sendo a cloroquina e a primaquina apesar de haver relatos de resistência dessa espécie desde o final da década de 80, na Papua Nova Guiné e desde então em diferentes regiões de globo (RIECKMAN *et al.*, 1989).

Estudos moleculares envolvendo mecanismos de ação e resistência a antimaláricos em *P. vivax* são escassos, diferente do observado para *P. falciparum*, onde há um grande número de trabalhos *explorando diferentes moléculas e mecanismos de resistência a drogas* (REED *et al.*, 2000, FIDOCK *et al.*, 2000, PEEL, 2001, MU *et al.*, 2003).

Recentemente dois trabalhos independentes descreveram, simultaneamente, a sequência do gene de multiresistência a drogas, *mdr*, em amostras de *P. vivax* (BREGA et al., 2005, SA et al., 2005). O gene *mdr* de *P. falciparum* apresenta-se como modulador da resposta a diferentes antimaláricos. Pontos de mutações em diferentes regiões do gene têm sido associados a fenótipos de resistência a diferentes antimaláricos, dentre eles a cloroquina (REED et al., 2000).

Brega et al., 2005 descreveram dois pontos de mutações no gene *pvmdr* de amostras de diferentes regiões endêmicas. A análise de pontos de mutação em nucleotídeos ortólogos aos do *P. falciparum* foi realizada, mas não houve detecção de mutações nessas posições, no entanto, foram detectadas as mutações não silenciosas nos codons 976 e 1076, localizadas nos segmentos hidrofóbicos X e XI respectivamente. O estudo não pode relacionar a presença da mutação à resposta à droga pois não foi realizado o monitoramento da resposta terapêutica das amostras utilizadas. No entanto, não se pode descartar a importância dessas mutações uma vez que as mesmas foram observadas em amostras da Tailândia e Indonésia, áreas de elevada endemicidade, cuja resistência à cloroquina foi descrita a mais de uma década.

No presente trabalho 100 amostras de *P. vivax* foram genotipadas para identificação de pontos de mutação no gene *pvmdr*, através de sondas Taqman® MGB em sistema de PCR em Tempo Real. Em 11 amostras de diferentes municípios (Manaus, Autazes, Coari e Tefé) pode-se observar a presença do duplo mutante, Y976F e F1076L. Às mesmas 11 amostras foi possível identificar a presença de populações mutantes apenas para o codon 1076, devido a presença de múltiplos

clones em uma mesma amostra, detectados pela presença de duas curvas de amplificação, uma para cada fluorescência utilizada.

As frequências de mutações foram idênticas para o duplo mutante e para o mutante isolado, 11% das amostras, enquanto 89% apresentaram alelos selvagens, ou seja, perfil genético do clone Sall. As frequências observadas por Brega et al., 2005 foram 43% para o tipo selvagem, 32% para o mutante 1076L e 25% para o duplo mutante, o que demonstra menor variação genética em amostras locais.

SA et al., 2005 analisaram a sequência do gene *pvmdr* de 10 isolados de diferentes regiões endêmicas do globo, com respostas terapêuticas diferenciadas à cloroquina, cinco resistentes e cinco sensíveis. Participaram desse estudo 3 amostras brasileiras, do estado de Rondonia, sensíveis à cloroquina. Neste estudo não houve correlação entre alelos do gene *pvmdr* e o fenótipo de resistência a cloroquina. Adicionalmente a análise dos pontos de mutação foi possível através do gene *pvmdr* agrupar geograficamente as amostras. o que permitiu observar dentre as diferentes regiões geográficas o surgimento isolado dos clones resistentes à cloroquina.

Apenas estudos preliminares foram realizados para análise do gene *pvmdr* em amostras com diferentes perfis de resistência à cloroquina. Até o presente momento não houve associação entre pontos de mutação nesse gene e a resposta diferenciada à cloroquina. No entanto, não se pode descartar seu papel na modulação da resposta à antimaláricos sem o aprofundamento dos estudos e análise de maior numero de amostras.



Resultados semelhantes foram encontrados em amostras de *P. falciparum* resistentes à cloroquina, onde não foi possível a associação de pontos de mutação ao fenótipo de resistência (WELLEMS *et al.*, 1990, VIANA *et al.*, 2006).

O gene *pfcr*t é um importante marcador molecular de resistência à cloroquina no *P. falciparum*, a mutação K76T foi observada em 100% das amostras resistentes à cloroquina de diferentes regiões endêmicas (VIEIRA *et al.*, 2004, VIANA *et al.*, 2006). O ortólogo em *P. vivax*, conhecido como *pvcg10*, não apresenta o mesmo comportamento, e não foi possível a associação de pontos de mutação à resposta diferenciada à cloroquina. Acredita-se haver diferentes mecanismos de ação e, conseqüentemente, de resistência entre as espécies *P. falciparum* e *P. vivax* (NOMURA *et al.*, 2001). O fato de a resistência à cloroquina no *P. vivax* só ter sido descrita 30 anos depois da observada no *P. falciparum* corrobora esta hipótese.

## 6. CONCLUSÃO

- A utilização da gota espessa como método padrão para diagnóstico da malária permanece como consenso no meio científico e foi possível observar sua importância neste trabalho. A maior sensibilidade das técnicas moleculares empregadas neste estudo se justifica para um menor número de casos, por exemplo em estudos de monitoramento da resposta terapêutica, identificação de infecções mistas em amostras com suspeita do diagnóstico da G.E., em casos particulares de diferentes respostas clínicas e/ou terapêuticas por determinada espécie ou em estudos moleculares.
- Foi realizada a padronização de metodologia de PCR em tempo real para diagnóstico da malária, podendo assim ser utilizada como mais uma ferramenta da Gerência de Malária da FMTAM no atendimento ao público e no desenvolvimento das diferentes linhas de pesquisa.
- A genotipagem do *P. vivax* através da busca de mutações no gene de resistência a multidrogas, envolvido nos mecanismos de resistência para diferentes antimaláricos, foi realizada com sucesso, assim como a padronização da metodologia empregada. Foi possível observar a presença de 11% de mutantes para este gene em amostras de 12 diferentes localidades do estado do Amazonas. No entanto, o significado clínico dessas mutações não pode ser descrito, pois não houve o acompanhamento da resposta terapêutica nas amostras analisadas. Há a necessidade de estudos posteriores, utilizando amostras com respostas clínica e terapêutica conhecidas para a busca de

possíveis associações e identificação do papel das mesmas na resposta terapêutica.

- Em virtude da recente introdução do tratamento de malária através da artemisinina e seus derivados na região Amazônica, a caracterização do perfil genético de parasitas circulantes será uma importante ferramenta para o constante monitoramento da eficácia de tratamento na população em geral. Este trabalho permite a identificação do perfil genético do gene *pfATP6* no momento da introdução da artemisinina e seus derivados como primeira linha de tratamento da malária. As mutações identificadas ainda não haviam sido descritas na literatura, o que justifica a continuidade desse estudo e sua ampliação para a análise de outros marcadores moleculares associados à resistência aos antimaláricos, visando compreender a ligação entre essas diferentes moléculas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, A., HUNT, P., CHEESMAN, S., ALVES, A.C., CUNHA, C.V., DO ROSARIO, V., CRAVO, P. Malaria parasites can develop stable resistance to artemisinin but lack mutations in candidate genes *atp6* (encoding the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase), *tctp*, *mdr1*, and *cg10*. *Antimicrob Agents Chemother.* v. 50. n. 2, p. 480-9, Fevereiro 2006.

ALECRIM, M.G.C. Estudo da resistência do *Plasmodium falciparum* as drogas anti-malárias *in vivo* e *in vitro* na Amazônia. Brasília: UNB, 1981. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, 1981.

ALECRIM, M.G.C.; ALECRIM, W.; MACÊDO, V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon Region. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* v. 32. n. 1, p. 67-68, 1999.

AL-OLAYAN, E. M.; BEETSMA, A. L; BUTCHER, G. A.; SINDEN, R. E.; HURD, H. Complete development of mosquito phases of the malaria parasite *in vitro*. *Science.* v. 295, p. 677 – 679, January 2002.

ARAI, M., MIZUKOSHI, C., KUBOCHI, F., KAKUTANI, T., WATAYA, Y. Detection of *Plasmodium falciparum* in human blood by a nested polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* v. 51. n. 5, p. 617-26, Novembro, 1994..

ARCANJO, A. R. L, LACERDA, M.G.V., ALECRIM, W. D., ALECRIM, M.G.C. .Avaliação dos testes rápidos Optimal-IT e ICT *P.f./P.v* para o diagnóstico da malária, na Atenção Básica de Saúde, no município de Manaus, Amazonas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 40. n. 1, p. 88-90, Janeiro-Fevereiro, 2007.

ARAVIND, L., IYER, L. M., WELLEMS, T.E., MILLER, L. H. *Plasmodium* Biology: Genomic Gleanings. Cell. v. 115, p. 771–785, Dezembro, 2003.

BAIRD, J.K. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. Antimicrob Agents Chemother. v.48, n. 11, p. 4075-83, Novembro, 2004.

BARKER JR, ROBERT; BANCHONGAKSORN, TRAIRAT; COURVAL, JEANNE; SUWONKERD, WANNAPA; RIWUNGTRAGOON, KAMOLWAN; WIRTH, DYANN. *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*: factors affecting sensitivity and specificity of PCR-based diagnosis of malaria. Exp. Parasitol. v. 79, p. 41-49, 1994.

BANO, N.; ROMANO, J.D.; JAYABALASINGHAM, B.; COPPENS, I. Cellular interactions of *Plasmodium* liver stage with its host mammalian cell. International Journal for Parasitology. v. 37, p. 1329–1341, 2007.

BEG, M.A.; KHAN, R.; BAIG, S.M.; GULZAR, Z.; HUSSAIN, R.; SMEGO R.A.; Cerebral involvement in benign tertian malaria. Am. J. Trop. Med. Hyg. v. 67, p. 230-2, 2002.

BELL, A.S., RANFORD-CARTWRIGHT, L.C. Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol.* v. 18. n. 8, p. 337-42, Agosto, 2002.

BRAY, P.G., WARD, S.A., O'NEILL, P.M. Quinolines and artemisinin: chemistry, biology and history. *Curr Top Microbiol Immunol.* v. 295, p. 3-38, 2005.

CARLTON, J.M.; ANGIUOLI, S.V.; SUH, B.B.; KOOIJ, T.W.; PERTEA, M.; SILVA, J.C.; ERMOLAEVA, M.D.; ALLEN, J.E.; SELENGUT, J.D.; KOO, H.L.; PETERSON, J.D.; POP, M.; KOSACK, D.S.; SHUMWAY, M.F.; BIDWELL, S.L.; SHALLOM, S.J.; VAN AKEN, S.E.; RIEDMULLER, S.B.; FELDBLYUM, T.V.; CHO, J.K. QUACKENBUSH, J., SEDEGAH, M., SHOAIBI, A., CUMMINGS, L.M., FLORENS, L., YATES, J.R., RAINE, J.D., SINDEN, R.E., HARRIS, M.A., CUNNINGHAM, D.A., PREISER, P.R., BERGMAN, L.W., VAIDYA, A.B., VAN LIN, L.H., JANSE, C.J., WATERS, A.P., SMITH, H.O., WHITE, O.R., SALZBERG, S.L., VENTER, J.C., FRASER, C.M., HOFFMAN, S.L., GARDNER, M.J., CARUCCI, D.J. Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature.* v. 419, n. 6909, p. 512-519, Outubro, 2002.

CARLTON J. The *Plasmodium vivax* genome sequencing project. *Trends Parasitol.* v. 19. n. 5, p. 277-31, Maio, .2003.

CICERON, L., JAUREGUIBERRY, G., GAY, F., DANIS, M. Development of a *Plasmodium* PCR for Monitoring Efficacy of Antimalarial Treatment. *J. Clin. Microbiol.* v. 37, p. 35-38, 1999.

COLEMAN, R. E.; MANEECHAI, N.; RACHAPHAEW, N.; KUMPITAK, C.; MILLER, R. S.; SOYSENG, V.; THIMASARN, K.; SATTABONGKOT, J. Comparison of field and expert laboratory microscopy for active surveillance for asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in western Thailand. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 67, n.2, p. 141–144, 2002.

COOPER, R. A.; HARTWIG, C. L.; FERDIG, M. T. *pfprt* is more than the *Plasmodium falciparum* chloroquineresistance gene: a functional and evolutionary perspective. Acta Trópica, v. 94, p. 170–180, 2005.

CORTESE, J. F.; CARABALLO, A.; CONTRERAS, C.E.; PLOWE, C. V. Origin and dissemination of *Plasmodium falciparum* drug-resistance mutations in South America. J Infect Dis. v. 186. p. 999–1006, 2002

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Revealing the determinants of gender in malaria parasites. Cell. v. 121. p. 659–666. June 3, 2005.

DAVIS, T.M., KARUNAJEEWA, H.A., ILETT, K.F. Artemisinin-based combination therapies for uncomplicated malaria. Med J Aust. v. 182, n. 4, p. 181-5, Fevereiro, 2005.

DE MONBRISON, F., C. ANGEI, A. STAAL, K. KAISER, AND S. PICOT. Simultaneous identification of the four human *Plasmodium* species and quantification of *Plasmodium* DNA load in human blood by real-time polymerase chain reaction. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 97:387–390, 2003.

DE MONBRISON, F.; RAYNAUD, D.; LATOUR-FONDANAICHE, C.; STAAL, A.; FAVRE, S.; KAISER, K.; PEYRON, F.; PICOT, S. Real-time PCR for chloroquine sensitivity assay and for *pfmdr1*–*pfcr1* single nucleotide polymorphisms in *Plasmodium falciparum*. *Journal of Microbiological Methods*, v. 54, n. 3. p. 391-401. September 2003.

DE MONBRISON, F.; GÉROME, P.; CHAULET, J.F.; WALLON, M.; PICOT, S.; PEYRON, F. Comparative diagnostic performance of two commercial rapid tests for malaria in a non-endemic area. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. v. 23. p. 784–786, 2004.

DELFINO, R.T., SANTOS-FILHO, O.A., FIGUEROA-VILLAR, J.D.. Molecular modeling of wild-type and antifolate resistant mutant *Plasmodium falciparum* DHFR. *Biophys Chem*. v.2, n.98, p. 287-300, Agosto de 2003.

DE VRIES, P.J., BICH, N.N., VAN THIEN, H., HUNG, L.N., ANH, T.K., KAGER, P.A., HEISTERKAMP, S.H. Combinations of artemisinin and quinine for uncomplicated *falciparum* malaria: efficacy and pharmacodynamics. *Antimicrob Agents Chemother*. v. 44, n. 5, p. 1302-8, Maio, 2000.

ECKSTEIN-LUDWIG, U., WEBB, R.J., VAN GOETHEM, I.D., EAST, J.M., LEE, A.G., KIMURA, M., O'NEILL, P.M., BRAY, P.G., WARD, S.A., KRISHNA, Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*. v. 424, n.6951, p. 957-6. Agosto 2003.



FABRE, R.; BERRY, A.; MORASSIN, B.; MAGNAVAL, J. F. Comparative assessment of conventional PCR with multiplex real-time PCR using SYBR Green I detection for the molecular diagnosis of imported malaria. *Parasitology*, v. 128, p. 15–21, 2004.

FERREIRA, I.D.; LOPES, D.; MARTINELLI, A.; FERREIRA, C.; DO ROSÁRIO, V.E.; CRAVO, P. *In vitro* assessment of artesunate, artemether and amodiaquine susceptibility and molecular analysis of putative resistance-associated mutations of *Plasmodium falciparum* from São Tome and Príncipe. *Tropical Medicine and International Health*. v. 12, n. 3, p. 353–362, Março, 2007.

FERREIRA, I.D.; MARTINELLI, A.; RODRIGUES, L., CARMO, E.L.; DO ROSÁRIO, V.E.; PÓVOA, M.M.; CRAVO, P. *Plasmodium falciparum* from Pará state (Brazil) shows satisfactory *in vitro* response to artemisinin derivatives and absence of the S769N mutation in the SERCA-type PfATPase6. *Tropical Medicine and International Health (in press)*.

FERDIG, M. T., COOPER, R. A., MU, J., DENG, B., JOY, D.A., SU, X.Z., WELLEMS, T.E. Dissecting the loci of low-level quinine resistance in malaria parasites. *Molecular Microbiology*. v.52. n. 4, p. 985–997, 2004.

FIDOCK, D.A.; NOMURA, T.; TALLEY, A.K.; COOPER, R.A.; DZEKUNOV, M.S.; FERDIG, M.T.; URSOS, L.B.; SIDHU, A.; NAUDE, B.; DELTSCH, K.W.; SU, X.S.; WOOTTON, J.C.; ROEPE, P.D.; WELLEMS, T.E. Mutations in the *P.falciparum*. Digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Molecular cell*, v. 6, p. 861-871, 2000.

FUNASA - FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Sistema de Informação do Programa de Controle da Malária (SISMAL): relatório resumo epidemiológico, 2001. Brasília: FUNASA. 2002.

GARDNER, MJ, HALL, N, FUNG, E, WHITE, O, BERRIMAN, M, HYMAN, RW, CARLTON, JM, PAIN, A, NELSON, KE, BOWMAN, S, PAULSEN, IT, JAMES, K, EISEN, JA, RUTHERFORD, K, SALZBERG, SL, CRAIG, A, KYES, S, CHAN, MS, NENE, V, SHALLOM, SJ, SUH, B, PETERSON, J, ANGIUOLI, S, PERTEA, M, ALLEN, J, SELENGUT, J, HAFT, D, MATHER, MW, VAIDYA, AB, MARTIN, DM, FAIRLAMB, AH, FRAUNHOLZ, MJ, ROOS, DS, RALPH, SA, MCFADDEN, GI, CUMMINGS, LM, SUBRAMANIAN, GM, MUNGALL, C, VENTER, JC, CARUCCI, DJ, HOFFMAN, SL, NEWBOLD, C, DAVIS, RW, FRASER, CM, BARRELL, B. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. v. 419, n. 6909, p. 498-511, Outubro, 2002.

HANSCHIED, T. Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy. *Clin. Lab. Haem.* v. 21, p. 235-245, 1999.

HARTL, D.I. The origin of malaria: Mixed messages from genetic diversity. *Nature Reviews Microbiol.* v. 2 p.15-22, 2004.

HALL, N., CARLTON, J. Comparative genomics of malaria parasites. *Curr Opin Genet Dev.* v. 15, n. 6, p. 609 – 613, Dezembro, 2005.

HALL, N., KARRAS, M., RAINE, J.D., CARLTON, J.M., KOOIJ, T.W., BERRIMAN, M., FLORENS, L., JANSSEN, C.S., PAIN, A., CHRISTOPHIDES, G.K., JAMES, K., RUTHERFORD, K., HARRIS, B., HARRIS, D., CHURCHER, C., QUAIL, M.A., ORMOND, D., DOGGETT, J., TRUEMAN, H.E., MENDOZA, J., BIDWELL, S.L., RAJANDREAM, M.A., CARUCCI, D.J., YATES, J.R. 3RD, KAFATOS, F.C., JANSE, C.J., BARRELL, B., TURNER, C.M., WATERS, A.P., SINDEN, R.E. A comprehensive survey of the Plasmodium life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. *Science*. v. 307, n. 5706, p. 82-86, Janeiro, 2005.

HERMSEN, C.C., TELGT, D.S., LINDERS, E.H., VAN DE LOCHT, L.A., ELING, W.M., MENSINK, E.J., SAUERWEIN, R.W. Detection of Plasmodium falciparum malaria parasites in vivo by real-time quantitative PCR. *Mol Biochem Parasitol*. v. 118(2):247-51, Dezembro 2001.

HYDE, J. E. Drug-resistant malaria. *TRENDS in Parasitology*, v. 21, n.11, Novembro 2005.

JAMBOU, R., LEGRAND, E., NIANG, M., KHIM, N., LIM, P., VOLNEY, B., EKALA, M.T., BOUCHIER, C., ESTERRE, P., FANDEUR, T., MERCEREAU-PUIJALON, O. Resistance of Plasmodium falciparum field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type *PfATPase6*. *Lancet*. v. 366, n. 9501, p. 1960-3, Novembro 2005.

JOY, D. A.; FENG X.; MU, J.; FURUYA, T.; CHOTIVANICH, K.; KRETTLI, A.U.; HO

M.; WANG, A.; WHITE, N.J.; SUH, E.; BEERLI, P.; SU, X.Z. Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*. *Science*, v. 300, p. 318–321, 2003.

KIRCHGATTER K, DEL PORTILLO HA. Clinical and molecular aspects of severe malaria. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. v. 77 (3): 455-75, Setembro 2005.

KRISHNA, S.; WOODROW, C. J.; STAINES, H. M.; HAYNES, R. K.; MERCEREAU-PUIJALON, O. Re-evaluation of how artemisinins work in light of emerging evidence of in vitro resistance. *Trends in Molecular Medicine*, v. 12, n.5, Maio, 2006.

KOCHAR D. K.; SAXENA V.; SINGH N.; KOCHAR S.K.; KUMAR S.V.; DAS A. *Plasmodium vivax* malaria. *Emerg Infect Dis*. v. 11. n. 1, 2005.

LEE, M.A., TAN, C.H., AW, L.T., TANG, C.S., SINGH, M., LEE, S.H., CHIA, H.P., YAP, E.P. Real-time fluorescence-based PCR for detection of malaria parasites. *J Clin Microbiol*. v. 40, n. 11, p. 4343-5. Novembro, 2002.

LOIOLA, C. C. P.; SILVA, C. J. M.; TAUIL, P. L. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health*, 11(4), 2002.

MANSO, M. R. C. Aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico de malária. 2004. 90f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais e Infecciosas) – Universidade Estadual do Amazonas, Manaus.

MARQUES, A.C.; GUTIERREZ, H.C. Combate a Malária no Brasil: evolução, situação atual e perspectivas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. v. 27. supl. III, p. 91-108, 1994.

MENDIS, K.; SINA, B.J; MARCHESINI, P.; CARTER, R. The neglected burden of plasmodium vivax malaria. Am. J. Trop. Med. Hyg. v. 64, n.1, p. 97–106, Janeiro-Fevereiro, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigilância em Saúde: Situação epidemiológica da malária no Brasil. Brasília, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigilância em Saúde: Situação epidemiológica da malária no Brasil. Brasília, 2007.

MU, J., FERDIG, M.T., FENG, X., JOY, D.A., DUAN, J., FURUYA, T., SUBRAMANIAN, G., ARAVIND, L., COOPER, R.A., WOOTTON, J.C., XIONG, M., SU, X.Z. Multiple transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine. Mol Microbiol. v. 49, n. 4, p. 977-89, Agosto, 2003.

OMER, A.H. Response of *Plasmodium falciparum* in Sudan to oral chloroquine. American Journal Tropical e Medicine and Hygiene. v. 27. n. 5: p. 853-7, September, 1978.

PAYNE, D. Spread os chloroquina resistance in *Plasmodium falciparum*. Parasitol. Today. v.3, p. 241-246, 1987.

REED, M.B., SALIBA, K.J., CARUANA, S.R., KIRK, K., COWMAN, A.F. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature*. v. 24, n. 403, supl. 6772, p. 906-9, Fevereiro, 2000.

ROUGEMONT, M., VAN SAANEN, M., SAHLI, R., HINRIKSON, H.P., BILLE, J., JATON, K. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J Clin Microbiol*. v. 42, n. 12, p. 5636-43, Dezembro, 2004.

RICH, S. M.; LICHT, M. C.; HUDSON, R. R.; AYALA, F. J. Malaria's Eve: evidence of a recent population bottleneck throughout the world population of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v. 95, p. 4425–4430, 1998.

SHARMA, Y.D. Genetic alteration in drug resistance markers of *Plasmodium falciparum*. *Indian J Med Res*. v. 121, p. 13-22, Janeiro, 2005.

SHERMAN, I. W. Malaria: parasite biology, pathogenesis, and protection. American Society for Microbiology. Washington, D.C., 1998.

SIDHU, A.B., VALDERRAMOS, S.G., FIDOCK, D.A. pfm<sub>1</sub> mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*. v. 57, n. 4, p. 913-26, Agosto, 2005.

SILVEIRA, A. C.; REZENDE, D. F. Avaliação da estratégia global de controle integrado da malária no Brasil. Organização Pan-Americana da Saúde. Brasília, 2001.

SNOUNOU, G., VIRIYAKOSOL, S., JARRA, W., THAITHONG, S., BROWN, KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol.* v. 58, n. 2, p. 283-92, Abril, 1993.

SCHUURKAMP, G. J.; SPICER, P.E.; KEREU, R.K.; BULUNGOL, P.K. A mixed infection of *vivax* and *falciparum* malaria apparently resistant to 4-aminoquinoline: a case report. *Transactions Royal of the Society Tropical Medicine and Hygiene.* v. 83, p. 607-608, 1989.

SU, X. Z., KIRMAN, L. A., FUJOKA, H.; WELLEMS, T. E. Complex polymorphisms in an ~330 kDa protein are linked to chloroquine-resistant *P. falciparum* in Southeast Asia and Africa. *Cell.* v. 91. n. 28, p. 593-603, 1997.

SU, X.; HAYTON, K.; WELLEMS, T. E. Genetic linkage and association analyses for trait mapping in *Plasmodium falciparum*. *Nat. Rev. Genetics*, v. 8, p.497 – 506, Julho, 2007.

SUAREZ-MUTIZ, M. C.; COURA J.R. Mudanças no padrão epidemiológico da malária em área rural do médio Rio Negro, Amazônia brasileira: análise retrospectiva. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 23, n 4, p. 795-804, abril, 2007.

TADEI, W. P.; THATCHER, B. D. Malaria vectors in the brazilian amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* v.42 n. 2, p. 87-94, March-April, 2000.

TADEI, W. P.; THATCHER, B. D.; SANTOS, J. M. M.; SCARPASSA, V. M.; RODRIGUES, I. B. O.; RAFAEL, M. S. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 59. n. 2, p. 325–335, 1998.

TALMAN, A. M., DOMARLE, O., MCKENZIE, E., ARIEY, F., ROBERT, V. Gametocytogenesis: the puberty of *Plasmodium falciparum*. *Malar J.* v. 3, n. 24, p. 1-14, Julho, 2004.

THAPA, R.; PATRA, V.; KUNDU, R. *Plasmodium vivax* Cerebral Malária. *INDIAN PEDIATR.* v. 44 p. 433-434, June, 2007.

TIRASOPHON, W.; RAJKULCHAI, P.; PONGLIKITMONGKOL, M.; WILAIRAT, P. BOONSAENG, V.; PANYIM, S. A highly sensitive, rapid and simple polymerase chain reaction-based method to detect human malaria (*Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*) in blood samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 51, n. 3, p. 308-313, 1994.

UHLEMANN AC, KRISHNA S. Antimalarial multi-drug resistance in Asia: mechanisms and assessment. *Curr Top Microbiol Immunol.* n. 295, p. 39-53, 2005.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. *Tratado de Infectologia.* Rio de Janeiro: Atheneu, 1998. p.1260-1289, cap. 98, Malária.



VIEIRA, P.P.; ALECRIM, M.G.C.; SILVA, L.H.P.; GONZÁLEZ-JIMÉNEZ, I.; ZALIS, M.G. Analysis of the PFCRT K76T Mutation in *Plasmodium falciparum* Isolates from the Brazilian Amazon. *Journal of Infectious Diseases*, 183 (12):1832-3, 2001.

VIEIRA, P.P.; ALECRIM, M.G.; ALECRIM, W.D.; SILVA, L.H.P.; FERREIRA, M.U.; SIHUICHA, M.M.; JOY, D.A.; MU, J.; SU, X.Z.; ZALIS, M.G. *pfcr*t Polymorphism and the Spread of Chloroquine Resistance in *Plasmodium falciparum* Populations across the Amazon Basin. *Journal of Infectious Diseases*.v. 190 (2):417-24, 2004.

WEATHERALL, D.J.; MILLER, L.H.; BARUCH, D.I.; MARSH, K.; DOUMBO, O.K., CASALS-PASCUAL, C. & ROBERTS, D.J. Malaria and the Red Cell. *Hematology*. p. 35-57, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World malaria situation in 1994, parts 1-111. *Weekly Epidemiol.* v.72. p. 269-274, 277-283, 285-291, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. New Perspectives Malaria Diagnosis. Report of a joint who/usaid informal consultation 25–27 october 1999. Geneva, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Malaria control today. Current WHO recommendations, Geneva, 2005.

ZALIS, M.G.; PANG, L.; SILVEIRA, M.S.; MILHOUS W.K. AND WIRTH, D.F. Characterization of *Plasmodium falciparum* isolated from the Amazon region of Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 58. n. 5, p. 630-36, 1998.

## **ANEXOS**

## **TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Projeto:** Caracterização molecular e fenotípica de isolados de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* de localidades endêmicas do Estado do Amazonas.

**Patrocinador:** Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM)

**Equipe responsável:** Dr. Pedro Paulo Vieira

Dra. Mônica Regina Costa Manso

Dra. Maria das Graças Costa Alecrim

Cynthia de Oliveira Ferreira

### **Descrição e objetivo do estudo**

Trata-se de um estudo laboratorial, descritivo, prospectivo, em amostras de sangue total de pacientes, oriundos da demanda natural, que procuram a FMTAM para diagnóstico da malária e de pacientes residentes em diferentes regiões malarígenas no estado do Amazonas. Este estudo tem por objetivo a caracterização genética de diferentes populações de plasmódios e análise da presença de genes de resistência aos antimaláricos em isolados de parasitos provenientes de diferentes localidades endêmicas do estado do Amazonas.

### **Riscos associados ao estudo**

Retirada de amostra de sangue: o meu maior desconforto é no momento em que a pele for ferida por uma agulha.

**Benefícios**

Participando neste estudo, nem eu/ou meu filho obteremos qualquer benefício adicional, mas estaremos contribuindo para o conhecimento de quantas pessoas são afetadas por este tipo de doença.

**Confidencialidade e avaliação dos registros**

Minha participação (ou de meu filho) neste estudo será confidencial e os registros ou resultados dos testes relacionados ao estudo serão mostrados apenas a representantes da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, bem como a autoridades normativas nacionais ou internacionais, com o objetivo de garantir informações de pesquisas clínicas ou para fins normativos. Minha identidade (de meu filho) permanecerá sempre em confidencialidade.

**Direito à retirada do estudo**

Eu tenho direito de fazer qualquer pergunta referente aos riscos potenciais ou conhecidos para mim/meu filho durante minha (dele/dela) participação neste estudo.

Eu tenho direito de retirar minha participação/ de meu filho neste estudo a qualquer momento.

**Participação voluntária**

A minha participação/ de meu filho neste estudo é voluntária. Se eu (ele/ela) recusar a participação neste estudo, não haverá qualquer tipo de retaliação ou perda de benefícios a que eu / meu filho tenha direito.

Eu tenho direito de manter uma cópia assinada deste documento.

Em caso de necessidade poderei entrar em contato com o Dr. Pedro Paulo Vieira ou a Dra. Mônica Regina Costa Manso pelo telefone 238-1711 ramal 219 (Gerência de Malária).

### **Consentimento Pós- informação**

E, por estar devidamente informado e esclarecido sobre o conteúdo deste termo, livremente, expresso meu consentimento para minha inclusão, como sujeito, nesta pesquisa.

---

**Paciente ou representante legal**

---

---

**Data**

---

---

**Pesquisador responsável**

---

---

**Data**

---



Impressão dactiloscópica (p/ analfabeto)

## Resultados Totais

Nº	LOCALIDADES	G.E.	PCR_td	PCR_tr
AM12	TEFÉ	F	F	F
AM13	TEFÉ	F	F	F
AM14	TEFÉ	F	F	NG
AM15	TEFÉ	F	F	F
AM16	TEFÉ	F	F	F
AM17	TEFÉ	F	F	F
AM18	TEFÉ	F	F	F
AM19	TEFÉ	F	F	NG
AM20	TEFÉ	F	V	V
AM21	TEFÉ	F	F	F
AM22	TEFÉ	F	F	NG
AM23	S.G. DA CACHOEIRA	F	VF	F
AM24	S.G. DA CACHOEIRA	F	F	F
AM25	S.G. DA CACHOEIRA	F	F	NG
AM26	HUMAITÁ	F	F	F
AM27	HUMAITÁ	F	VF	VF
AM28	HUMAITÁ	F	F	F
AM29	HUMAITÁ	F	F	F
AM30	HUMAITÁ	F	F	F
AM31	HUMAITÁ	F	F	F
AM32	HUMAITÁ	F	VF	V
AM33	HUMAITÁ	F	V	NG
AM34	CAREIRO	F	F	F
AM35	CAREIRO	F	F	F
AM36	CAREIRO	F	F	NG
AM37	CAREIRO	F	F	NG
AM38	CAREIRO	F	F	F
AM39	CAREIRO	F	F	F
AM41	CAREIRO	F	F	F
AM42	CAREIRO	F	V	NG
AM43	CAREIRO	F	F	NG
AM44	CAREIRO	F	F	NG
AM45	CAREIRO	F	F	NG
AM49	CAREIRO	F	F	NG
AM51	CAREIRO	F	F	NG
AM53	CAREIRO	F	F	NG
AM56	CAREIRO	F	F	NG
AM57	CAREIRO	F	F	NG
AM58	CAREIRO	F	F	NG
AM59	BARCELOS	F	VF	VF
AM60	BARCELOS	F	F	F
AM61	BARCELOS	F	Ng	NG
AM62	ITACOATIARA	F	F	NG
AM63	ITACOATIARA	F	VF	NG
AM64	ITACOATIARA	F	F	NG
AM65	ITACOATIARA	F	F	NG
AM66	ITACOATIARA	F	VF	NG
AM67	ITACOATIARA	F	F	NG
AM68	ITACOATIARA	F	F	F

<b>Nº</b>	<b>LOCALIDADES</b>	<b>G.E.</b>	<b>PCR_td</b>	<b>PCR_tr</b>
AM69	ITACOATIARA	F	F	NG
AM70	ITACOATIARA	F	F	F
AM71	ITACOATIARA	F	F	F
AM72	ITACOATIARA	F	F	NG
AM73	ITACOATIARA	F	F	F
AM74	ITACOATIARA	F	F	F
AM75	ITACOATIARA	F	F	F
AM76	ITACOATIARA	F	F	NG
AM77	ITACOATIARA	F	F	F
AM78	ITACOATIARA	F	F	F
AM79	ITACOATIARA	F	VF	VF
AM80	ITACOATIARA	F	VF	VF
AM81	ITACOATIARA	F	VF	F
AM82	AUTAZES	F	F	F
AM83	AUTAZES	F	F	NG
AM84	AUTAZES	F	F	F
AM85	AUTAZES	F	F	NG
AM86	AUTAZES	F	F	F
AM87	PRES. FIGUEIREDO	F	V	NG
AM88	COARI	F	F	F
AM89	COARI	F	F	NG
AM90	COARI	F	F	NG
AM91	COARI	F	F	NG
AM92	COARI	F	F	NG
AM93	COARI	F	F	NG
AM94	COARI	F	F	F
AM95	COARI	F	F	NG
AM96	COARI	F	F	NG
AM97	COARI	F	F	F
AM98	COARI	F	F	NG
AM99	COARI	F	F	F
AM100	COARI	F	F	F
AM101	COARI	F	F	NG
AM102	COARI	F	F	F
AM103	GUAJARÁ	F	F	F
AM104	GUAJARÁ	F	VF	VF
AM105	GUAJARÁ	F	F	F
AM106	GUAJARÁ	F	F	F
AM107	GUAJARÁ	F	VF	VF
AM108	GUAJARÁ	F	F	F
AM109	GUAJARÁ	F	F	F
AM110	GUAJARÁ	F	F	F
AM111	GUAJARÁ	F	VF	F
AM112	GUAJARÁ	F	VF	F
AM113	GUAJARÁ	F	F	F
AM114	GUAJARÁ	F	F	F
AM115	BORBA	F	F	NG
AM116	BORBA	F	F	F
AM117	BORBA	F	V	F
AM118	BORBA	F	F	F
AM119	BORBA	F	VF	F

<b>Nº</b>	<b>LOCALIDADES</b>	<b>G.E.</b>	<b>PCR_td</b>	<b>PCR_tr</b>
AM120	BORBA	F	F	F
AM121	MANAUS	F	F	F
AM122	MANAUS	F	VF	F
AM123	MANAUS	F	F	F
AM124	MANAUS	F	F	NG
AM125	MANAUS	F	F	F
AM126	MANAUS	F	F	NG
AM127	MANAUS	F	F	NG
AM128	MANAUS	F	F	F
AM129	MANAUS	F	F	F
AM130	MANAUS	F	Ng	F
AM131	MANAUS	F	F	NG
AM132	MANAUS	F	F	NG
AM133	MANAUS	F	F	F
AM134	MANAUS	F	F	F
AM135	MANAUS	F	F	NG
AM136	MANAUS	F	F	F
AM137	MANAUS	F	Ng	NG
AM138	MANAUS	F	F	NG
AM139	MANAUS	F	F	NG
AM140	MANAUS	F	F	NG
AM141	MANAUS	F	F	NG
AM142	MANAUS	F	F	NG
AM143	MANAUS	F	F	NG
AM144	MANAUS	F	F	NG
AM145	MANAUS	F	VF	NG
AM146	MANAUS	F	F	F
AM147	MANAUS	F	VF	F
AM148	MANAUS	F	F	F
AM149	MANAUS	F	F	F
AM150	MANAUS	F	F	F
AM151	MANAUS	F	F	F
AM152	MANAUS	F	F	F
AM153	MANAUS	F	F	F
AM154	MANAUS	F	F	F
AM155	MANAUS	F	F	F
AM156	MANAUS	F	F	F
AM157	MANAUS	F	F	F
AM158	MANAUS	F	F	F
AM159	MANAUS	F	F	F
AM160	MANAUS	F	F	F
AM161	MANAUS	F	F	F
AM162	MANAUS	F	F	F
AM163	MANAUS	F	F	NG
AM164	MANAUS	F	F	F
AM165	MANAUS	F	F	F
AM166	MANAUS	F	F	F
AM167	MANAUS	F	F	NG
AM168	MANAUS	F	F	NG
AM169	MANAUS	F	F	F
AM170	MANAUS	F	F	F



<b>Nº</b>	<b>LOCALIDADES</b>	<b>G.E.</b>	<b>PCR_td</b>	<b>PCR_tr</b>
AM171	MANAUS	F	VF	NG
AM172	MANAUS	F	F	F
AM173	MANAUS	F	F	NG
AM174	MANAUS	F	VF	NG
AM175	MANAUS	F	F	NG
AM176	MANAUS	F	F	NG
AM177	MANAUS	F	VF	F
AM178	MANAUS	F	F	NG
AM179	MANAUS	F	F	F
AM180	MANAUS	F	F	F
AM181	MANAUS	F	VF	F
AM182	MANAUS	F	VF	F
AM183	MANAUS	F	F	F
AM184	MANAUS	F	F	F
AM185	MANAUS	F	F	NG
AM186	MANAUS	F	VF	F
AM187	MANAUS	F	F	F
AM188	MANAUS	F	F	NG
AM189	MANAUS	F	VF	F
AM190	MANAUS	F	VF	F
AM191	MANAUS	F	VF	NG
AM192	MANAUS	F	VF	F
AM193	MANAUS	F	F	F
AM194	MANAUS	F	F	NG
AM195	MANAUS	F	VF	VF
AM196	MANAUS	F	VF	V
AM197	MANAUS	F	F	F
AM198	MANAUS	F	F	F
AM199	MANAUS	F	VF	NG
AM200	MANAUS	F	VF	VF
AM201	MANAUS	F	F	F
AM202	MANAUS	F	F	NG
AM203	MANAUS	F	F	NG
AM204	MANAUS	F	F	NG
AM205	MANAUS	F	F	NG
AM206	MANAUS	F	F	F
AM207	MANAUS	F	VF	F
AM208	MANAUS	F	VF	F
AM209	MANAUS	F	F	F
AM210	MANAUS	F	VF	F
AM211	MANAUS	F	F	F
AM212	MANAUS	F	F	F
AM213	MANAUS	F	F	NG
AM214	MANAUS	F	F	NG
AM215	MANAUS	F	F	NG
AM216	MANAUS	F	F	NG
AM217	MANAUS	F	F	NG
AM218	MANAUS	F	F	NG
AM219	MANAUS	F	F	NG
AM220	MANAUS	F	F	NG
AM221	MANAUS	F	VF	VF

<b>Nº</b>	<b>LOCALIDADES</b>	<b>G.E.</b>	<b>PCR_td</b>	<b>PCR_tr</b>
AM222	MANAUS	F	F	F
AM223	MANAUS	F	Ng	F
AM224	MANAUS	V	V	ND
AM225	MANAUS	V	V	ND
AM226	MANAUS	V	V	ND
AM227	MANAUS	V	V	ND
AM228	MANAUS	V	V	ND
AM229	MANAUS	V	V	ND
AM230	MANAUS	V	V	ND
AM231	MANAUS	V	V	ND
AM232	MANAUS	V	V	ND
AM233	MANAUS	V	V	ND
AM234	TEFÉ	V	V	ND
AM235	TEFÉ	V	V	ND
AM236	TEFÉ	V	V	ND
AM237	TEFÉ	V	V	ND
AM238	TEFÉ	V	VF	F
AM239	TEFÉ	V	VF	VF
AM240	TEFÉ	V	V	ND
AM241	TEFÉ	V	V	ND
AM242	TEFÉ	V	V	ND
AM243	S.G. DA CACHOEIRA	V	V	ND
AM244	S.G. DA CACHOEIRA	V	VF	NG
AM245	S.G. DA CACHOEIRA	V	V	ND
AM246	S.G. DA CACHOEIRA	V	VF	V
AM247	S.G. DA CACHOEIRA	V	VF	NG
AM248	S.G. DA CACHOEIRA	V	V	ND
AM249	S.G. DA CACHOEIRA	V	VF	NG
AM250	S.G. DA CACHOEIRA	V	V	ND
AM251	S.G. DA CACHOEIRA	V	VF	NG
AM252	S.G. DA CACHOEIRA	V	V	ND
AM253	S.G. DA CACHOEIRA	V	VF	NG
AM254	HUMAITÁ	V	V	ND
AM255	HUMAITÁ	V	V	ND
AM256	HUMAITÁ	V	V	ND
AM257	HUMAITÁ	V	V	ND
AM258	HUMAITÁ	V	V	ND
AM259	HUMAITÁ	V	V	ND
AM260	HUMAITÁ	V	V	ND
AM261	HUMAITÁ	V	V	V
AM262	HUMAITÁ	V	V	V
AM263	HUMAITÁ	V	V	ND
AM264	HUMAITÁ	V	V	ND
AM265	HUMAITÁ	V	V	ND
AM266	HUMAITÁ	V	V	ND
AM267	HUMAITÁ	V	V	ND
AM268	HUMAITÁ	V	V	ND
AM269	HUMAITÁ	V	V	ND
AM270	HUMAITÁ	V	V	ND
AM271	HUMAITÁ	V	V	ND
AM272	CAREIRO	V	V	ND

<b>Nº</b>	<b>LOCALIDADES</b>	<b>G.E.</b>	<b>PCR_td</b>	<b>PCR_tr</b>
AM273	CAREIRO	V	V	ND
AM274	CAREIRO	V	V	ND
AM275	CAREIRO	V	V	ND
AM276	CAREIRO	V	V	ND
AM277	CAREIRO	V	VF	NG
AM278	CAREIRO	V	V	ND
AM279	CAREIRO	V	VF	NG
AM280	CAREIRO	V	V	ND
AM281	CAREIRO	V	V	V
AM282	CAREIRO	V	V	ND
AM283	CAREIRO	V	V	ND
AM284	CAREIRO	V	V	ND
AM285	CAREIRO	V	V	ND
AM286	CAREIRO	V	V	ND
AM287	CAREIRO	V	V	ND
AM288	CAREIRO	V	V	ND
AM289	CAREIRO	V	V	ND
AM290	CAREIRO	V	V	ND
AM291	CAREIRO	V	V	ND
AM292	CAREIRO	V	V	ND
AM293	CAREIRO	V	VF	NG
AM294	CAREIRO	V	V	ND
AM295	CAREIRO	V	V	ND
AM296	CAREIRO	V	V	ND
AM297	CAREIRO	V	V	ND
AM298	CAREIRO	V	V	ND
AM299	CAREIRO	V	VF	ND
AM300	CAREIRO	V	V	ND
AM301	CAREIRO	V	V	ND
AM302	CAREIRO	V	V	ND
AM303	CAREIRO	V	V	ND
AM304	CAREIRO	V	V	ND
AM305	CAREIRO	V	V	ND
AM306	CAREIRO	V	V	ND
AM307	CAREIRO	V	V	ND
AM308	CAREIRO	V	V	ND
AM309	CAREIRO	V	VF	ND
AM310	CAREIRO	V	V	ND
AM311	CAREIRO	V	VF	ND
AM312	CAREIRO	V	V	ND
AM313	CAREIRO	V	V	ND
AM314	CAREIRO	V	V	ND
AM317	CAREIRO	V	V	ND
AM322	BARCELOS	V	V	ND
AM323	BARCELOS	V	V	ND
AM324	BARCELOS	V	V	ND
AM325	BARCELOS	V	V	ND
AM326	BARCELOS	V	V	ND
AM327	BARCELOS	V	V	ND
AM328	BARCELOS	V	V	ND
AM329	BARCELOS	V	V	ND

<b>Nº</b>	<b>LOCALIDADES</b>	<b>G.E.</b>	<b>PCR_td</b>	<b>PCR_tr</b>
AM330	GUAJARÁ	V	VF	VF
AM331	GUAJARÁ	V	V	ND
AM332	GUAJARÁ	V	V	ND
AM333	GUAJARÁ	V	V	ND
AM334	GUAJARÁ	V	V	ND
AM335	ITACOATIARA	V	VF	V
AM336	ITACOATIARA	V	V	ND
AM337	ITACOATIARA	V	V	V
AM338	ITACOATIARA	V	V	V
AM339	ITACOATIARA	V	VF	V
AM340	AUTAZES	V	VF	V
AM341	AUTAZES	V	V	ND
AM342	AUTAZES	V	V	V
AM343	AUTAZES	V	V	V
AM344	AUTAZES	V	V	ND
AM345	AUTAZES	V	VF	VF
AM346	AUTAZES	V	VF	V
AM347	PRES. FIGUEIREDO	V	V	ND
AM348	PRES. FIGUEIREDO	V	V	ND
AM349	PRES. FIGUEIREDO	V	V	ND
AM350	PRES. FIGUEIREDO	V	VF	NG
AM351	PRES. FIGUEIREDO	V	VF	NG
AM352	PRES. FIGUEIREDO	V	V	ND
AM353	PRES. FIGUEIREDO	V	VF	NG
AM354	PRES. FIGUEIREDO	V	F	ND
AM355	COARI	V	VF	NG
AM356	COARI	V	V	ND
AM357	COARI	V	V	ND
AM358	COARI	V	VF	NG
AM359	COARI	V	VF	VF
AM360	COARI	V	VF	VF
AM361	COARI	V	V	ND
AM362	COARI	V	V	ND
AM363	COARI	V	V	ND
AM364	COARI	V	V	ND
AM365	COARI	V	V	ND
AM366	COARI	V	V	ND
AM367	COARI	V	V	ND
AM368	BORBA	V	VF	NG
AM369	BORBA	V	V	NG
AM370	BORBA	V	V	NG
AM371	BORBA	V	V	NG
AM372	BORBA	V	VF	NG
AM373	BORBA	V	VF	VF
AM374	MANAUS	V	V	ND
AM375	MANAUS	V	V	ND
AM376	MANAUS	V	V	ND
AM377	MANAUS	V	VF	ND
AM378	MANAUS	V	VF	ND
AM379	MANAUS	V	VF	ND
AM380	MANAUS	V	VF	ND

<b>Nº</b>	<b>LOCALIDADES</b>	<b>G.E.</b>	<b>PCR_td</b>	<b>PCR_tr</b>
AM381	MANAUS	V	VF	ND
AM382	MANAUS	V	V	ND
AM383	MANAUS	V	V	ND
AM384	MANAUS	V	V	ND
AM385	MANAUS	V	V	ND
AM386	MANAUS	V	V	ND
AM387	MANAUS	V	V	ND
AM388	MANAUS	V	V	ND
AM389	MANAUS	V	V	ND
AM390	MANAUS	V	V	ND
AM391	MANAUS	V	V	ND
AM392	MANAUS	V	V	ND
AM393	MANAUS	V	V	ND
AM394	MANAUS	V	V	ND
AM395	MANAUS	V	V	ND
AM396	MANAUS	V	V	ND
AM397	MANAUS	V	V	ND
AM398	MANAUS	V	V	ND
AM399	MANAUS	V	VF	ND
AM400	MANAUS	V	VF	ND
AM401	MANAUS	V	VF	ND
AM402	MANAUS	V	VF	ND
AM403	MANAUS	V	VF	ND
AM404	MANAUS	V	V	ND
AM405	MANAUS	V	V	ND
AM406	MANAUS	V	V	ND
AM407	MANAUS	V	VF	ND
AM408	MANAUS	V	VF	ND
AM409	MANAUS	V	V	ND
AM410	MANAUS	V	V	ND
AM411	MANAUS	V	V	ND
AM412	MANAUS	V	V	ND
AM413	MANAUS	V	V	ND
AM414	MANAUS	V	V	ND
AM415	MANAUS	V	VF	ND
AM416	MANAUS	V	VF	ND
AM417	MANAUS	V	VF	ND
AM418	MANAUS	V	V	ND
AM419	MANAUS	V	V	ND
AM420	MANAUS	V	V	ND
AM421	MANAUS	V	V	ND
AM422	MANAUS	V	V	ND
AM423	MANAUS	V	VF	NG
AM424	MANAUS	V	VF	F
AM425	MANAUS	V	F	ND
AM426	MANAUS	V	V	ND
AM427	MANAUS	V	V	ND
AM428	MANAUS	V	V	ND
AM429	MANAUS	V	V	ND
AM430	MANAUS	V	VF	NG
AM431	MANAUS	V	VF	NG

<b>Nº</b>	<b>LOCALIDADES</b>	<b>G.E.</b>	<b>PCR_td</b>	<b>PCR_tr</b>
AM432	MANAUS	V	V	ND
AM433	MANAUS	V	V	ND
AM434	MANAUS	V	VF	NG
AM435	MANAUS	V	V	ND
AM436	MANAUS	V	VF	NG
AM437	MANAUS	V	VF	NG
AM438	MANAUS	V	VF	NG
AM439	MANAUS	V	VF	NG
AM440	MANAUS	V	VF	NG
AM441	MANAUS	V	V	ND
AM442	MANAUS	V	V	ND
AM443	MANAUS	V	V	ND
AM444	MANAUS	V	VF	V
AM445	MANAUS	V	VF	V
AM446	MANAUS	V	VF	V
AM447	MANAUS	V	VF	V
AM448	MANAUS	V	V	ND
AM449	MANAUS	V	VF	V
AM450	MANAUS	V	V	ND
AM451	MANAUS	V	VF	V
AM452	MANAUS	V	VF	V
AM453	MANAUS	V	VF	V
AM454	MANAUS	V	VF	V
AM455	MANAUS	V	V	ND
AM456	MANAUS	V	F	ND
AM457	MANAUS	V	V	ND
AM458	MANAUS	V	V	ND
AM459	MANAUS	V	VF	V
AM460	MANAUS	V	VF	V
AM461	MANAUS	V	VF	V
AM462	MANAUS	V	VF	V
AM463	MANAUS	V	V	ND
AM464	MANAUS	V	VF	V
AM465	MANAUS	V	VF	V
AM466	MANAUS	V	V	ND
AM467	MANAUS	V	VF	V
AM468	MANAUS	V	V	ND
AM469	MANAUS	V	V	ND
AM470	MANAUS	V	V	ND
AM471	MANAUS	V	VF	V
AM472	MANAUS	V	VF	V
AM473	MANAUS	V	VF	V
AM474	MANAUS	V	V	ND
AM475	MANAUS	V	V	ND
AM476	MANAUS	V	VF	V
AM477	MANAUS	V	V	ND
AM478	MANAUS	V	V	ND
AM479	MANAUS	V	V	ND
AM480	MANAUS	V	V	ND
AM481	MANAUS	V	V	ND
AM482	MANAUS	V	VF	V

<b>Nº</b>	<b>LOCALIDADES</b>	<b>G.E.</b>	<b>PCR_td</b>	<b>PCR_tr</b>
AM483	MANAUS	V	V	ND
AM484	MANAUS	V	V	ND
AM485	MANAUS	V	V	ND
AM486	MANAUS	V	V	ND
AM487	MANAUS	V	VF	V
AM488	MANAUS	V	V	ND
AM489	MANAUS	V	VF	V
AM490	MANAUS	V	VF	V
AM491	MANAUS	V	V	ND
AM492	MANAUS	V	V	ND
AM493	MANAUS	V	VF	V
AM494	MANAUS	V	VF	NG
AM495	MANAUS	V	F	ND
AM496	MANAUS	V	V	ND
AM497	MANAUS	V	V	ND
AM498	MANAUS	V	V	ND
AM499	MANAUS	V	V	ND
AM500	MANAUS	V	V	ND
AM501	MANAUS	V	V	ND
AM502	MANAUS	V	V	ND
AM503	MANAUS	V	V	ND
AM504	MANAUS	V	VF	ND
AM505	MANAUS	V	V	ND
AM506	MANAUS	V	V	ND
AM507	MANAUS	V	V	ND
AM508	MANAUS	V	V	ND
AM509	MANAUS	V	V	ND
AM510	MANAUS	V	V	ND
AM511	MANAUS	V	V	ND
AM512	MANAUS	V	V	ND
AM513	MANAUS	V	V	ND
AM514	MANAUS	V	V	ND
AM515	MANAUS	V	V	ND
AM516	MANAUS	V	V	ND
AM517	MANAUS	V	V	ND
AM518	MANAUS	V	V	ND
AM519	MANAUS	V	V	ND
AM520	MANAUS	V	V	ND
AM521	MANAUS	V	V	ND
AM522	MANAUS	V	VF	ND
AM523	MANAUS	V	V	ND
AM524	MANAUS	V	V	ND
AM525	MANAUS	V	V	ND
AM526	MANAUS	V	V	ND
AM527	MANAUS	V	V	ND
AM528	MANAUS	V	V	ND
AM529	MANAUS	V	VF	ND
AM530	MANAUS	V	V	ND
AM531	MANAUS	V	V	ND
AM532	MANAUS	V	V	ND
AM533	MANAUS	V	V	ND

<b>Nº</b>	<b>LOCALIDADES</b>	<b>G.E.</b>	<b>PCR_td</b>	<b>PCR_tr</b>
AM534	MANAUS	V	V	ND
AM535	MANAUS	V	V	ND
AM536	MANAUS	V	V	ND
AM537	MANAUS	V	V	ND
AM538	MANAUS	V	F	ND
AM539	MANAUS	V	V	ND
AM540	MANAUS	V	V	ND
AM541	MANAUS	V	V	ND
AM542	MANAUS	V	V	ND
AM543	MANAUS	V	V	ND
AM544	MANAUS	V	V	ND
AM545	MANAUS	V	V	ND
AM546	MANAUS	V	V	ND
AM547	MANAUS	V	V	ND
AM548	MANAUS	V	VF	ND
AM549	MANAUS	V	V	ND
AM550	MANAUS	V	V	ND
AM551	MANAUS	V	V	ND
AM552	MANAUS	V	V	ND
AM553	MANAUS	V	VF	ND
AM554	MANAUS	V	V	ND
AM555	MANAUS	V	V	ND
AM556	MANAUS	V	V	ND
AM557	MANAUS	V	V	ND
AM558	MANAUS	V	V	ND
AM559	MANAUS	V	V	ND
AM560	MANAUS	V	V	ND
AM561	MANAUS	V	V	ND
AM562	MANAUS	V	V	ND
AM563	MANAUS	V	V	ND
AM564	MANAUS	V	V	ND
AM565	MANAUS	V	V	ND
AM566	MANAUS	V	V	ND
AM567	MANAUS	V	VF	ND
AM569	MANAUS	V	VF	ND
AM570	MANAUS	V	VF	ND
AM571	MANAUS	V	V	ND
AM572	MANAUS	V	V	ND
AM573	MANAUS	V	V	ND
AM574	MANAUS	V	V	ND
AM575	MANAUS	V	V	ND
AM576	MANAUS	V	V	ND
AM577	MANAUS	V	V	ND
AM578	MANAUS	V	V	ND
AM579	MANAUS	V	V	ND
AM580	MANAUS	V	V	ND
AM581	MANAUS	V	VF	ND
AM582	MANAUS	V	VF	ND
AM583	MANAUS	V	V	ND
AM584	MANAUS	V	VF	ND
AM585	MANAUS	V	V	ND



<b>Nº</b>	<b>LOCALIDADES</b>	<b>G.E.</b>	<b>PCR_td</b>	<b>PCR_tr</b>
AM586	MANAUS	V	V	ND
AM587	MANAUS	V	V	ND
AM588	MANAUS	V	V	ND
AM589	MANAUS	V	V	ND
AM590	MANAUS	V	V	ND
AM591	MANAUS	V	VF	ND
AM592	MANAUS	V	V	ND
AM593	MANAUS	V	V	ND
AM594	MANAUS	V	VF	ND
AM595	MANAUS	V	V	ND
AM596	MANAUS	V	V	ND
AM597	MANAUS	V	V	ND
AM598	MANAUS	V	V	ND
AM599	MANAUS	V	V	ND
AM600	MANAUS	V	V	ND
AM601	MANAUS	V	V	ND
AM602	MANAUS	V	V	ND
AM603	MANAUS	V	V	ND
AM604	MANAUS	V	V	ND
AM605	MANAUS	V	V	ND
AM606	MANAUS	V	V	ND
AM607	MANAUS	V	V	ND
AM608	MANAUS	V	V	ND
AM609	MANAUS	V	V	ND
AM610	MANAUS	V	V	ND
AM611	MANAUS	V	V	ND
AM612	MANAUS	V	V	ND
AM613	MANAUS	V	VF	ND
AM614	MANAUS	V	F	ND
AM615	MANAUS	V	VF	ND
AM616	MANAUS	V	V	ND
AM617	MANAUS	V	V	ND
AM618	MANAUS	V	V	ND
AM619	MANAUS	V	V	ND
AM620	MANAUS	V	VF	ND
AM621	MANAUS	V	V	ND
AM622	MANAUS	V	VF	ND
AM623	MANAUS	V	VF	ND
AM624	MANAUS	V	VF	ND
AM625	MANAUS	V	V	ND
AM626	MANAUS	V	VF	ND
AM627	MANAUS	V	V	ND
AM628	MANAUS	V	V	ND
AM629	MANAUS	V	V	ND
AM630	MANAUS	V	V	ND
AM631	MANAUS	V	V	ND
AM632	MANAUS	V	V	ND
AM633	MANAUS	V	V	ND
AM634	MANAUS	V	V	ND
AM635	MANAUS	V	V	ND
AM636	MANAUS	V	V	ND

<b>Nº</b>	<b>LOCALIDADES</b>	<b>G.E.</b>	<b>PCR_td</b>	<b>PCR_tr</b>
AM637	MANAUS	V	V	ND
AM638	MANAUS	V	V	ND
AM639	MANAUS	V	V	ND
AM640	MANAUS	V	V	ND
AM641	MANAUS	V	V	ND
AM648	MANAUS	V	V	ND
AM649	MANAUS	V	V	ND
AM650	MANAUS	V	VF	ND
AM651	MANAUS	V	VF	ND
AM652	MANAUS	V	VF	ND
AM653	MANAUS	V	V	ND
AM654	MANAUS	V	V	ND
AM655	MANAUS	V	V	ND
AM656	MANAUS	V	V	ND
AM657	MANAUS	V	V	ND
AM658	MANAUS	V	V	ND
AM659	MANAUS	V	V	ND
AM660	MANAUS	V	V	ND
AM661	MANAUS	V	V	ND
AM662	MANAUS	V	V	ND
AM663	MANAUS	V	V	ND
AM664	MANAUS	V	V	ND
AM665	MANAUS	V	V	ND
AM666	MANAUS	V	V	ND
AM667	MANAUS	V	V	ND
AM668	MANAUS	V	V	ND
AM669	MANAUS	V	V	ND
AM670	MANAUS	V	V	ND
AM671	MANAUS	V	V	ND
AM672	MANAUS	V	VF	ND
AM673	MANAUS	V	VF	ND
AM674	MANAUS	V	VF	ND
AM675	MANAUS	V	F	ND
AM676	MANAUS	V	V	ND
AM677	MANAUS	V	VF	ND
AM678	MANAUS	V	V	ND
AM679	MANAUS	V	VF	ND
AM680	MANAUS	V	V	ND
AM681	MANAUS	V	VF	ND
AM682	MANAUS	V	V	ND
AM683	MANAUS	V	V	ND
AM684	MANAUS	V	V	ND
AM685	MANAUS	V	V	ND
AM686	MANAUS	V	V	ND
AM687	MANAUS	V	V	ND
AM688	MANAUS	V	VF	ND
AM689	MANAUS	V	V	ND
AM690	MANAUS	V	VF	ND
AM691	MANAUS	V	V	ND
AM692	MANAUS	V	VF	ND
AM693	MANAUS	V	V	ND

<b>Nº</b>	<b>LOCALIDADES</b>	<b>G.E.</b>	<b>PCR_td</b>	<b>PCR_tr</b>
AM694	MANAUS	V	V	ND

Legenda: G.E.: Gota espessa; PCR\_td: Nested-PCR, PCR\_tr: PCR em Tempo Real, V: *P. vivax*, F: *P. falciparum*, VF: Infecção mista; NG: Negativo; ND: Não determinado;

Nº	LOCALIDADES	pfcr			pfatp6					
		74	75	76	110	1204	1888	1916	2306	2694
W2	INDOCHINA	I	E	T	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7G8	MANAUS	M	N	T	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HB3	HONDURAS	M	N	K	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3D7	HOLANDA	M	N	K	G	T	G	G	G	T
AM12	TEFÉ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM13	TEFÉ	ND	ND	ND	G	T	T	G	G	A
AM15	TEFÉ	M	N	T	ND	ND	ND	G	G	A
AM16	TEFÉ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM17	TEFÉ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM18	TEFÉ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM21	TEFE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM24	S.G. DA CACHOEIRA	ND	ND	ND	ND	T	T	G	G	A
AM25	S.G. DA CACHOEIRA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM26	HUMAITÁ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM27	HUMAITÁ	M	N	T	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AM28	HUMAITÁ	ND	ND	ND	G	G	T	G	G	A
AM29	HUMAITÁ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM30	HUMAITÁ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM31	HUMAITÁ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM34	CAREIRO	M	N	T	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AM35	CAREIRO	M	N	T	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AM36	CAREIRO	M	N	T	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AM60	BARCELOS	ND	ND	ND	G	T	G	G	G	A
AM68	ITACOATIARA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	A
AM70	ITACOATIARA	ND	ND	ND	G	T	G	G	G	A
AM71	ITACOATIARA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM73	ITACOATIARA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM75	ITACOATIARA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM77	ITACOATIARA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM78	ITACOATIARA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM82	AUTAZES	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM84	AUTAZES	ND	ND	ND	G	T	G	G	G	A
AM85	AUTAZES	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM86	PRESIDENTE FIGUEIREDO	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AM88	COARI	ND	ND	ND	G	T	T	G	G	A
AM99	COARI	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM100	COARI	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM102	COARI	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM103	GUAJARÁ	ND	ND	ND	G	G	T	G	G	A
AM105	GUAJARÁ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	A
AM106	GUAJARÁ	ND	ND	ND	G	G	T	G	G	A
AM108	GUAJARÁ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM109	GUAJARÁ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM110	GUAJARÁ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM113	GUAJARÁ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	A
AM114	GUAJARÁ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM116	BORBA	ND	ND	ND	G	T	T	G	G	A
AM118	BORBA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM120	BORBA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM123	MANAUS	ND	ND	ND	G	T	T	G	G	A
AM124	MANAUS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AM128	MANAUS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM129	MANAUS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM133	MANAUS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	A
AM153	MANAUS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	A
AM155	MANAUS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM156	MANAUS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM157	MANAUS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM161	MANAUS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM211	MANAUS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM212	MANAUS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	G	A
AM222	MANAUS	ND	ND	ND	G	T	T	G	G	A
AM538	MANAUS	M	N	T	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AM548	MANAUS	M	N	T	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AM553	MANAUS	M	N	T	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Legenda: ND: Não determinado;

Nº	LOCALIDADES	<i>pvm</i> dr*	
		976	1076
<b>Sall</b>	<b>El Salvador</b>	<b>Y</b>	<b>F</b>
AM234	TEFÉ	Y	F
AM235	TEFÉ	Y	F
AM236	TEFÉ	Y	F
AM237	TEFÉ	Y	F
AM238	TEFÉ	Y	F
AM239	TEFÉ	Y/F	L
AM240	TEFÉ	Y	F
AM241	TEFÉ	Y	F
AM242	TEFÉ	Y	F
AM245	S.G. DA CACHOEIRA	Y	F
AM248	S.G. DA CACHOEIRA	Y	F
AM250	S.G. DA CACHOEIRA	Y	F
AM252	S.G. DA CACHOEIRA	Y	F
AM254	HUMAITÁ	Y	F
AM255	HUMAITÁ	Y	F
AM256	HUMAITÁ	Y	F
AM257	HUMAITÁ	Y	F
AM258	HUMAITÁ	Y	F
AM259	HUMAITÁ	Y	F
AM260	HUMAITÁ	Y	F
AM261	HUMAITÁ	Y	F
AM262	HUMAITÁ	Y	F
AM263	HUMAITÁ	Y	F
AM264	HUMAITÁ	Y	F
AM265	HUMAITÁ	Y	F
AM266	HUMAITÁ	Y	F
AM267	HUMAITÁ	Y	F
AM268	HUMAITÁ	Y	F
AM269	HUMAITÁ	Y	F
AM270	HUMAITÁ	Y	F
AM271	HUMAITÁ	Y	F
AM272	CAREIRO	Y	F
AM273	CAREIRO	Y	F
AM274	CAREIRO	Y	F
AM275	CAREIRO	Y	F
AM276	CAREIRO	Y	F
AM278	CAREIRO	Y	F
AM280	CAREIRO	Y	F
AM281	CAREIRO	Y	F
AM282	CAREIRO	Y	F
AM289	CAREIRO	Y	F
A290	CAREIRO	Y	F
AM291	CAREIRO	Y	F
AM294	CAREIRO	Y	F
AM295	CAREIRO	Y	F
AM296	CAREIRO	Y	F
AM322	BARCELOS	Y	F
AM323	BARCELOS	Y	F

Nº	LOCALIDADES	<i>pvm</i> dr*	
		976	1076
AM324	BARCELOS	Y	F
AM325	BARCELOS	Y	F
AM326	BARCELOS	Y	F
AM327	BARCELOS	Y	F
AM328	BARCELOS	Y	F
AM329	BARCELOS	Y	F
AM331	GUAJARÁ	Y	F
AM332	GUAJARÁ	Y	F
AM333	GUAJARÁ	Y	F
AM334	GUAJARÁ	Y	F
AM336	ITACOATIARA	Y	F
AM337	ITACOATIARA	Y	F
AM338	ITACOATIARA	Y	F
AM341	AUTAZES	Y/F	L
AM342	AUTAZES	Y/F	L
AM343	AUTAZES	Y/F	L
AM344	AUTAZES	Y	F
AM347	PRES. FIGUEIREDO	Y	F
AM348	PRES. FIGUEIREDO	Y	F
AM349	PRES. FIGUEIREDO	Y	F
AM356	COARI	Y/F	L
AM357	COARI	Y	F
AM359	COARI	Y	F
AM360	COARI	Y	F
AM361	COARI	Y	F
AM362	COARI	Y/F	L
AM363	COARI	Y	F
AM364	COARI	Y	F
AM365	COARI	Y	F
AM366	COARI	Y	F
AM369	BORBA	Y	F
AM370	BORBA	Y	F
AM371	BORBA	Y	F
AM373	BORBA	Y/F	L
AM375	MANAUS	Y	F
AM385	MANAUS	Y	F
AM386	MANAUS	Y	F
AM387	MANAUS	Y	F
AM388	MANAUS	Y/F	L
AM390	MANAUS	Y	F
AM391	MANAUS	Y/F	L
AM392	MANAUS	Y	F
AM394	MANAUS	Y	F
AM395	MANAUS	Y	F
AM397	MANAUS	Y/F	L
AM398	MANAUS	Y	F
AM404	MANAUS	Y	F
AM406	MANAUS	Y	F
AM409	MANAUS	Y/F	L
AM411	MANAUS	Y	F

Nº	LOCALIDADES	<i>pvm</i> dr*	
		976	1076
AM412	MANAUS	Y	F
AM414	MANAUS	Y	F
AM419	MANAUS	Y	F

\* Aminoácido: Y: Treonina; F: Fenilalanina; L: Leucina