

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

**Análise de polimorfismos em genes codificadores de moléculas envolvidas na homeostase do ferro como possíveis biomarcadores de recaída e/ou anemia durante a infecção por *Plasmodium vivax***

por

**Camila Raquel Rodrigues Barbosa**

Belo Horizonte

2016

DISSERTAÇÃO MCS - CPqRR C.R. R. BARBOSA 2016

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

**Análise de polimorfismos em genes codificadores de moléculas envolvidas na homeostase do ferro como possíveis biomarcadores de recaída e/ou anemia durante a infecção por *Plasmodium vivax***

por

**Camila Raquel Rodrigues Barbosa**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular

Orientação: Dra. Cristiana F. Alves de Brito

Co-orientação: Dra. Taís Nóbrega de Sousa

Dra. Flávia Carolina F. de Araújo

Belo Horizonte

2016

DISSERTAÇÃO MCS - CPqRR C.R. R. BARBOSA 2016

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

B238a      Barbosa, Camila Raquel Rodrigues  
2016

Análise de polimorfismos em genes codificadores de moléculas envolvidas na homeostase do ferro como possíveis biomarcadores de recaída e/ou anemia durante a infecção por *Plasmodium vivax* / Camila Raquel Rodrigues Barbosa. – Belo Horizonte, 2016

XIV, 46 f.: il.: 210 x 297 mm.  
Bibliografia: 54 -60

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

1. Malária Vivax/genética 2. *Plasmodium vivax* /patogenicidade 3. Recidiva 4. Anemia/complicações 5. Ferro/metabolismo 6. Hemocromatose/genética. I. Título. II. Brito, Cristiana Ferreira Alves (Orientação). III. Sousa, Taís Nóbrega (Coorientação). IV. Araújo, Flávia Carolina Faustino de (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936 2

## CAMILA RAQUEL RODRIGUES BARBOSA

Análise de polimorfismos em genes codificadores de moléculas envolvidas na homeostase do ferro como possíveis biomarcadores de recaída e/ou anemia durante a infecção por *Plasmodium vivax*

Dissertação apresentada ao Programa de Pósgraduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular

### **Banca Examinadora:**

Prof. Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente

Prof. Dra. Patricia Flávia Quaresma (CPqRR/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dra. Kezia Katiani Gorza Scopel (UFJF) Titular

Prof. Dra. Marina de Moraes Mourão (CPqRR/FIOCRUZ) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 24/02/2016

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, por todo amor, dedicação  
e por sempre acreditarem em mim.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por nunca ter me abandonado, por me proteger e por ter me guiado até aqui.

Aos meus amados pais Beth e João, por mesmo às vezes, sem entender muito bem o que faz uma estudante de mestrado, nunca deixaram de me apoiar neste, e em todos os meus sonhos.

Ao meu irmão e grande amigo Lucas, que no meio do meu mestrado se mudou para Irlanda, me deixando com uma saudade enorme! Mas sempre foi e continua sendo a minha inspiração.

Ao meu irmão Phillip, que sempre com um sorriso no rosto e focado em seus objetivos me encoraja a enfrentar os obstáculos da vida.

À minha orientadora Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito, por ter confiado em mim, me acolhido e me dado a oportunidade de trabalhar com esse projeto com o qual me encantei desde o princípio.

À minha co-orientadora Dra. Taís Nobrega de Souza, por ter me acompanhado quando a Cristiana teve que se ausentar. Agradeço muito pela paciência, dedicação e pela enorme contribuição nesse projeto.

À Dra. Flávia Caroline Faustino de Araújo, minha co-orientadora, que iniciou esse projeto e contribuiu muito para que eu desse continuidade à ele.

Ao Dr. Cór Fontes pela colaboração, sem a qual seria impossível a realização desse trabalho.

À Sarah, Vanessa, Marina e Ana Luiza que me auxiliaram muito nos experimentos de PCR-RFLP.

Ao nosso feto, Ana Carolina, por dividir comigo as preciosas amostras de recaída e por me ajudar nas incansáveis planilhas de banco de dados.

À Gabi por todo o auxílio nos experimentos de sequenciamento e pela grande amizade! Você faz muita falta!

À plataforma de sequenciamento PDTIS/FIOCRUZ, em especial à Renata e à Elisângela por toda ajuda e disponibilidade.

À TODOS do Laboratório de Malária. Às Dras. Flora e Luzia pelo enorme conhecimento. Ao Geraldo por toda ajuda. Aos meus queridos amigos Gabriel, pelo grande companheirismo, Aracele, Denise, Marina, Lara, Daniel, Mika, Ana, Dani

Robortela, Letícia, Bárbara, Jéssica, Vanessa, Ana Carolina, Sarah, Ricardo e Marcilene pela excelente convivência, e por tornarem minha rotina muito feliz!

À minha grande amiga Giovana, por estar sempre comigo, nos momentos bons e ruins. Obrigada pela sua amizade!

Aos meus amigos e minha família, pelos momentos de descontração e por entenderem quando não pude estar presente.

Ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou pelo oferecimento do curso de mestrado com ênfase em Biologia Molecular e Celular.

À todas as agências de fomento pelo apoio financeiro: CAPES, FAPEMIG, CNPq e FIOCRUZ.

## RESUMO

A malária é uma doença parasitária prevalente principalmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Indivíduos infectados com *Plasmodium vivax*, mais prevalente espécie do parasito no Brasil, apresentam dentre outras características, a anemia como uma das principais complicações. Além disso, essa espécie é capaz de desenvolver hipnozoítos que podem levar ao reaparecimento dos sintomas em episódios denominados recaídas. No entanto, os mecanismos responsáveis pela ativação desses hipnozoítos ainda são desconhecidos. O metabolismo do ferro tem sido associado com o desenvolvimento de diversos organismos, inclusive *Plasmodium*, além de estar envolvido em distúrbios hematológicos, como a anemia. Assim, a hipótese investigada neste trabalho é que as moléculas envolvidas na homeostase do ferro podem ser utilizadas como biomarcadores de recaída e/ou de anemia através da análise dos polimorfismos C282Y e H63D no gene da hemocromatose (HFE) e C326Y/S no gene da ferroportina (FPN). Os indivíduos analisados foram divididos segundo os dois grandes temas desse estudo: (1) indivíduos que tiveram uma ou múltiplas recaídas por *P. vivax* e (2) indivíduos anêmicos e não anêmicos infectados por *P. vivax*. A frequência do polimorfismo H63D identificada no grupo de múltiplas recaídas foi de 17%, enquanto que no grupo de uma recaída foi de apenas 2%. Não foi observada diferença significativa entre indivíduos anêmicos e não anêmicos para os polimorfismos HFE H63D e C282Y. Tanto no grupo de anemia quanto no grupo de recaída não foram encontrados os polimorfismos C326Y e C326S no gene da ferroportina. Os resultados obtidos nesse estudo evidenciam que o polimorfismo HFE H63D pode estar relacionado ao acúmulo de ferro nos indivíduos com múltiplas recaídas, sugerindo que esse polimorfismo pode ser considerado um biomarcador de múltiplas recaídas. Além disso, esses resultados abrem a perspectiva de realização de novos estudos que contribuam para a elucidação dos mecanismos que desencadeiam as múltiplas recaídas. Esses resultados podem inclusive contribuir para novas estratégias nos programas de eliminação da malária, como projetos de monitoramento de indivíduos que possuam predisposição ao acúmulo de ferro, e também resistência ao tratamento, principalmente nas áreas endêmicas.

**Palavras-chave:** malária, *Plasmodium vivax*, recaída, anemia, ferro, hemocromatose, ferroportina

## ABSTRACT

Malaria is one of the most prevalent parasitic diseases in tropical and subtropical regions of the world. *Plasmodium vivax*, the major species of the parasite in Brazil, has among other characteristics: anemia as one of the main symptoms, and the ability to develop latent forms in the liver, called hypnozoites, responsible for the reappearance of symptoms months or even years after infection. However, the mechanisms accountable for activation of these hypnozoites are still unknown. The iron metabolism has been associated with the development of many organisms, including *Plasmodium*, as well as being involved in hematological disorders such as anemia. Therefore, the hypothesis of this study is that the molecules involved in iron homeostasis can be used as biomarkers of relapse and/or anemia by analysis of the polymorphisms C282Y and H63D in the hemochromatosis gene (HFE) and C326Y/S in the ferroportin gene (FPN). The individuals analyzed were divided according to the two areas of this study: Relapse and anemia. By PCR-RFLP were found 33% heterozygotes for the HFE H63D polymorphism and only 4% heterozygous (n=35). The frequency of the HFE H63D polymorphism in multiple relapses group was 17% of the mutated allele, while in the group of one relapse was 2%. There was no significant difference between anemic and non-anemic individuals for HFE H63D and C282Y polymorphism. In both groups of anemia and relapse the C326Y and C326S polymorphisms were not found in the ferroportin gene. The results of this study show that the HFE H63D polymorphism may be related to the accumulation of iron in individuals with multiple relapses, suggesting that this polymorphism can be considered a biomarker of multiple relapses. Moreover, these findings open up the prospect of new studies that contribute to the elucidation of the mechanisms that trigger multiple relapses. These results may contribute to new strategies for malaria elimination programs, such as monitoring projects of individuals who have predisposition to iron accumulation, especially in endemic areas.

**Keywords:** malaria, *Plasmodium vivax* relapse, anemia, iron, hemochromatosis, ferroportin.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Mapa de regiões com risco de transmissão de malária .....	15
<b>Figura 2:</b> Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil. ....	16
<b>Figura 3:</b> Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> . ....	18
<b>Figura 4:</b> Fenótipos de latência e frequência de recaída por <i>P. vivax</i> .....	20
<b>Figura 5:</b> Regulação da homeostase do ferro .....	22
<b>Figura 6:</b> Valores de hemoglobina entre mulheres (M) e homens (H) dos grupos de indivíduos anêmicos e não anêmicos.....	33
<b>Figura 7:</b> Valores de hematócrito entre mulheres (M) e homens (H) dos grupos de indivíduos anêmicos e não anêmicos.....	34
<b>Figura 8:</b> Valores de hemoglobina entre mulheres (M) e homens (H) dos grupos de uma e múltiplas recaídas.....	36
<b>Figura 9:</b> Valores de hematócrito entre mulheres (M) e homens (H) dos grupos de uma e múltiplas recaídas.....	37
<b>Figura 10:</b> Perfil eletroforético do polimorfismo HFE 187 C>G, para amostras de 10 indivíduos.....	38
<b>Figura 11:</b> Frequência do polimorfismo HFE H63D entre indivíduos anêmicos e não anêmicos.....	39
<b>Figura 12:</b> Frequência alélica para o polimorfismo HFE H63D entre indivíduos anêmicos e não anêmicos.....	40
<b>Figura 13:</b> Frequência do polimorfismo HFE H63D entre indivíduos com uma e múltiplas recaídas.....	41
<b>Figura 14:</b> Frequência alélica para o polimorfismo HFE H63D entre indivíduos com uma e com múltiplas recaídas.....	41
<b>Figura 15:</b> Perfil eletroforético do polimorfismo HFE 845 G>A para amostras de 4 indivíduos.....	43
<b>Figura 16:</b> Frequência do polimorfismo HFE C282Y entre indivíduos anêmicos e não anêmicos.....	43
<b>Figura 17:</b> Frequência alélica para o polimorfismo HFE C282Y entre indivíduos anêmicos e não anêmicos.....	44
<b>Figura 18:</b> Gel da PCR para o alvo FPN C326Y/S .....	45
<b>Figura 19:</b> Alinhamento do sequenciamento para os polimorfismos C326Y/S de 12 pacientes.....	45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Sequência dos iniciadores, condições de ciclagem e tamanho do amplicon gerado pela PCR.....	29
<b>Tabela 2:</b> Condições para reação de digestão da PCR-RFLP.....	30
<b>Tabela 3:</b> Comparação dos valores médios de diferentes variáveis entre os grupos com ou sem anemia infectados por <i>P. vivax</i> .....	34
<b>Tabela 4:</b> Comparação das dosagens de ferro, ferritina e hepcidina entre os grupos de indivíduos anêmicos e não anêmicos.....	35
<b>Tabela 5:</b> Comparação dos valores médios de diferentes variáveis entre os grupos com número variado de recaídas.....	36
<b>Tabela 6:</b> Comparação das dosagens de ferro, ferritina e hepcidina entre os grupos de uma e múltiplas recaídas.....	38
<b>Tabela 7:</b> Comparação dos valores de hemoglobina e hematócrito entre homens e mulheres homozigotos não mutados e heterozigotos para o polimorfismo HFE H63D.....	42

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Fe	Ferro
G6PD	Glicose 6-fosfato Desidrogenase
HAMP	<i>Hepcidin Antimicrobial Peptide</i>
Hb	Hemoglobina
HFE	<i>Hemochromatosis- “High Iron Fe”</i>
HH	Hemocromatose hereditária
HJV	<i>Hemojuveline</i>
HRPs	<i>Histidine-rich proteins</i>
MG	Minas Gerais
MS	Ministério da Saúde
MT	Mato Grosso
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de Bases
PBS	Tampão Fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP	Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismos por restrição de fragmentos
PfLDH	<i>P. falciparum lactate dehydrogenase</i>
PPM	Padrão de peso molecular
RBC	Células vermelhas do sangue
Sinan	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
Sivep	Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica.
SVS	Serviço de Vigilância em Saúde
Tf	Transferrina
TFR2	<i>Transferrin receptor-2</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

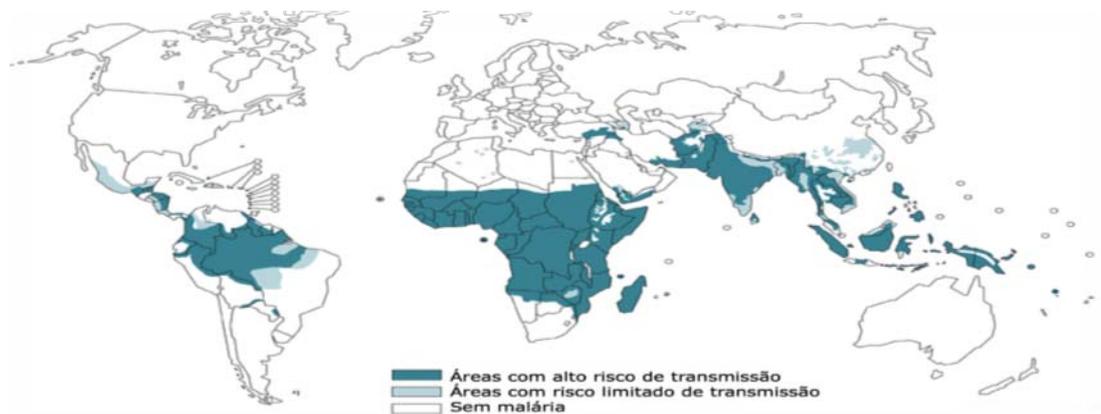
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 Aspectos gerais da malária.....	15
1.2 Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> .....	16
1.3 Recaída .....	18
1.4 Homeostase do ferro.....	20
1.4.1 Distúrbios relacionados ao metabolismo do ferro e sua relação com a malária.....	22
1.4.1.1 Deficiência de ferro.....	22
1.4.1.2 Acúmulo de ferro .....	23
1.5 Biomarcadores e a malária.....	23
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	24
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	26
3.1 Objetivo Geral .....	26
3.2 Objetivos específicos .....	26
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	27
4.1 Pacientes e obtenção das amostras .....	27
4.2 Amplificação dos alvos através da Reação em Cadeia da Polimerase.....	28
4.3 Genotipagem dos polimorfismos HFE C282Y e HFE H63D por Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismos por restrição de fragmentos- PCR-RFLP.....	30
4.4 Genotipagem do polimorfismo C326Y/S no gene da Ferroportina por sequenciamento.....	30
4.4.1 Purificação dos produtos de PCR.....	30
4.4.2 Reação de sequenciamento.....	31
4.4.3 Precipitação das amostras.....	31
4.4.4 Análise do sequenciamento.....	32
4.5 Análises estatísticas.....	32
<b>5 RESULTADOS</b> .....	33

5.1 Caracterização do pacientes com anemia.....	33
5.1.1 Relação entre anemia e algumas dosagens bioquímicas relacionadas ao metabolismo do ferro .....	35
5.2 Caracterização dos pacientes com recaída e sua relação com anemia .....	35
5.2.1 Relação entre recaídas e as dosagens bioquímicas.....	37
5.3 Análises do polimorfismo H63D no gene codificador da Hemocromatose.....	38
5.3.1 Polimorfismo H63D- Anemia.....	39
5.3.2 Polimorfismo H63D- Recaída.....	40
5.4 Análises do polimorfismo C282Y no gene codificador da Hemocromatose.....	42
5.5 Análises dos polimorfismos C326Y/S no gene codificador da Ferroportina.....	44
5.5.1 Polimorfismo FPN C326Y/S- Recaída .....	45
5.5.2 Polimorfismo FPN C326Y/S- Anemia .....	45
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>54</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos gerais da malária

A malária é mundialmente conhecida como a doença parasitária mais letal, prevalente em diversas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2015, aproximadamente 3,2 bilhões de pessoas - quase metade da população mundial - estavam sob risco de contrair malária. A maioria dos casos e mortes ocorre na África sub-saariana. No entanto, populações na Ásia, América Latina, e, em menor proporção, no Oriente Médio e partes da Europa, também estão em risco (Figura 1). Em 2015, 97 países e territórios tinham uma transmissão contínua de malária (WHO, 2015).



Adaptado WHO (2013)

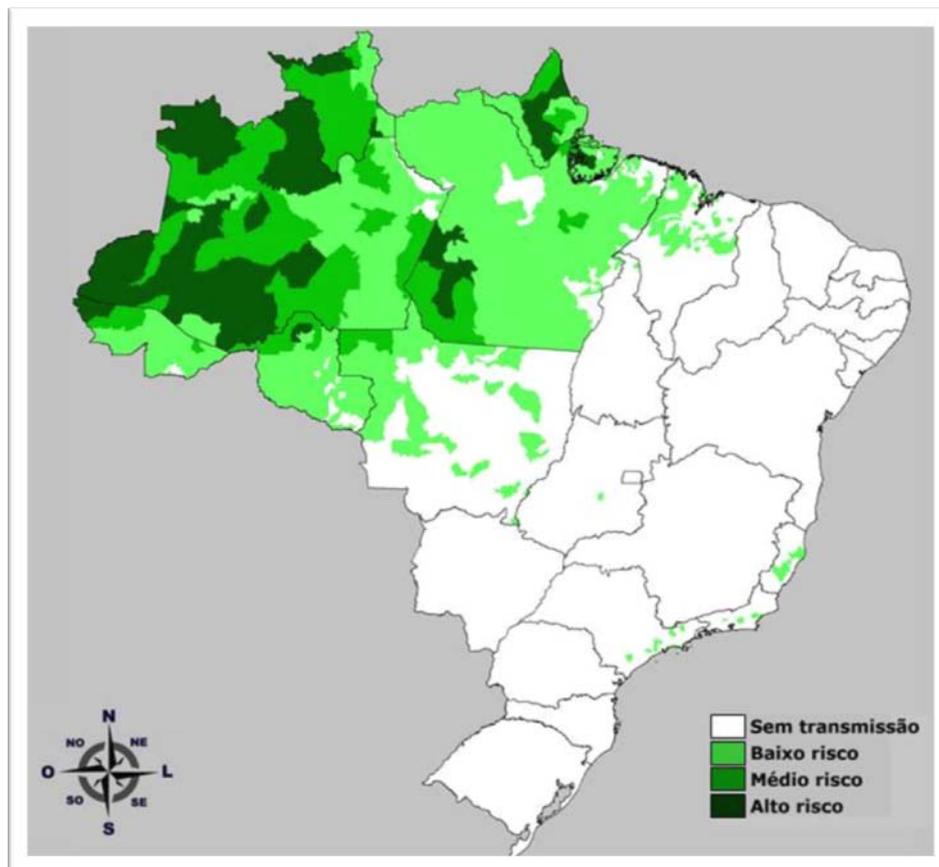
**Figura 1:** Mapa de regiões com risco de transmissão de malária

A transmissão da malária aos seres humanos ocorre através da picada de fêmeas de mosquitos pertencentes ao gênero *Anopheles* infectados com *Plasmodium*. Atualmente são conhecidas cinco espécies deste parasito capazes de infectar humanos, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e o mais recentemente descrito *Plasmodium knowlesi* (COX-SINGH, 2008).

Infecções causadas principalmente por *P. falciparum* e *P. vivax* representam um grande desafio para a saúde pública mundial. *P. falciparum*, considerada a espécie mais letal, possui maior prevalência no continente africano. Contudo, *P. vivax* apresenta a mais ampla distribuição geográfica, provavelmente devido à capacidade de se desenvolver no mosquito vetor a baixas temperaturas e altitudes

mais elevadas (SUTHERST, 2004). Além de ser amplamente distribuída, a malária por *P. vivax* já foi associada a casos graves inclusive no Brasil (GENTON et al., 2008; TJITRA et al., 2008 COSTA et al., 2012).

No Brasil o número de casos da doença tem diminuído nos últimos anos, com aproximadamente 142 mil casos no ano de 2015 (SIVEP-MALÁRIA, 2016). Desses, 99,6% ocorreram na região Amazônica (Figura 2) sendo 84% causados por *P. vivax* (MS/SVS, 2015).



Sinan/SVS/MS e Sivep-Malária/SVS/MS

**Figura 2:** Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2014.

### 1.2 Ciclo de vida do *Plasmodium*

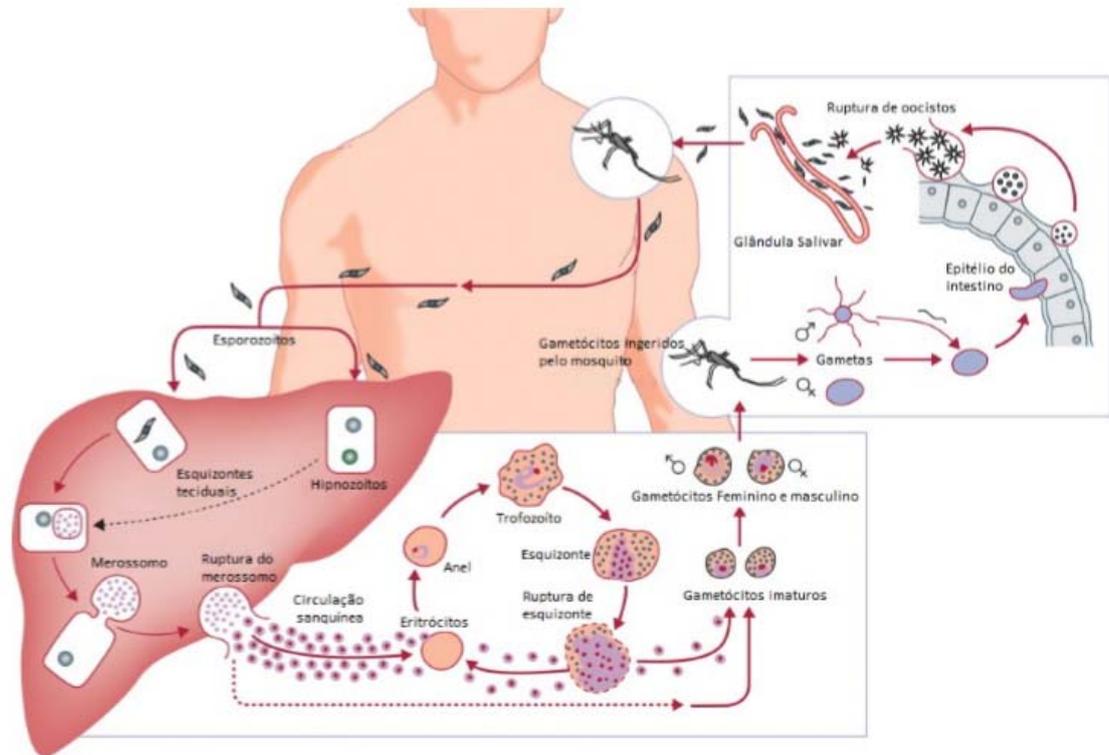
No hospedeiro humano, o ciclo de vida do parasito começa por esporozoítos sendo inoculados na pele durante a picada de um mosquito infectado (Figura 3). Por muito tempo acreditou-se que estas formas deixavam o local da picada através dos vasos sanguíneos ou linfáticos e migravam para o fígado. Contudo, foi descrito recentemente que aproximadamente 50% dos esporozoítos pode permanecer na pele do hospedeiro (MÉNARD et al., 2013) e cerca de 10% pode se desenvolver na epiderme e na derme, bem como nos folículos pilosos onde podem sobreviver

durante semanas (GUEIRARD et al., 2010). Esses esporozoítos, ao chegarem no fígado e antes de invadirem um hepatócito, migram através de várias células. Algumas dessas células são capazes de reparar o dano causado pela invasão, enquanto outras morrem por necrose (MOTA et al., 2001). Segundo Carrolo e colaboradores (2003), esse processo de migração dos esporozoítos é um evento primordial para o ciclo de vida desses parasitos, pois induz a secreção de fator de crescimento dos hepatócitos (HGF), que torna tais células mais susceptíveis à infecção. O desenvolvimento intrahepático por esquizogonia culmina com a liberação de merozoítos capazes de infectar eritrócitos ou reticulócitos.

Outro achado mais recente referente ao ciclo desse parasito é que acreditava-se que o rompimento de hepatócitos levava à liberação de merozoítos. Porém, esses merozoítos são empacotados em vesículas denominadas merossomos, que após chegarem na corrente sanguínea se rompem liberando os merozoítos (STURM et al., 2006).

O ciclo eritrocítico do parasito começa com o reconhecimento, ligação e invasão de RBCs (células vermelhas do sangue) pelos merozoítos. Uma vez que os eritrócitos foram invadidos, o parasito é encontrado dentro do vacúolo parasitóforo. O desenvolvimento intraeritrocítico do parasito passa por diferentes fases (anel, trofozoíto e esquizonte). A partir dos esquizontes, novos merozoítos são finalmente formados e liberados com a lise dos eritrócitos, de modo a infectar novas RBCs (BANNISTER & MITCHELL, 2003). Alguns merozoítos diferenciam em gametas (masculino e feminino), que são transportados para o estômago do mosquito durante seu repasto sanguíneo. Uma vez no intestino, o parasito passa por uma série de transformações, culminando no desenvolvimento de novos esporozoítos que invadem as glândulas salivares de modo que depois, podem ser inoculados em outro hospedeiro (MUELLER et al. 2009).

*P. vivax* possui algumas particularidades no seu ciclo de vida que o difere do *P. falciparum*: 1) o desenvolvimento de formas dormentes no fígado, os hipnozoítos, que podem levar ao reaparecimento dos sintomas em episódios denominados recaídas; 2) os gametócitos aparecem no sangue periférico antes do início dos sintomas, fator esse que dificulta inclusive o controle da transmissão da doença; 3) preferência dos merozoítos pelos reticulócitos como células hospedeiras (GALINSKI et al., 1992; TRAN et al., 2006) enquanto que o *P. falciparum* infecta tanto reticulócitos quanto eritrócitos maduros (MUELLER et al. 2009).



Adaptado de MUELLER et al., 2009

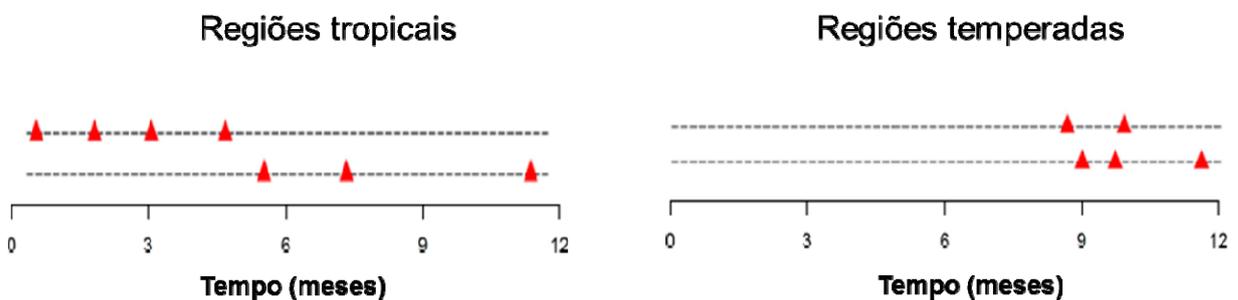
**Figura 3:** Ciclo de vida do *Plasmodium*. A transmissão do parasito *Plasmodium* ocorre através do repasto sanguíneo realizado por fêmeas do mosquito *Anopheles* (direita) em um hospedeiro humano (esquerda). Esporozoítos inoculados na pele pelos mosquitos atingem a corrente sanguínea e migram para os hepatócitos onde se reproduzem liberando as formas merozoítas para iniciar o estágio eritrocítico. Na célula sanguínea haverá a produção de outros merozoítos, capazes de invadir novas hemácias. Uma porção dos parasitos assexuados se diferenciará em gametócitos, e durante o repasto sanguíneo serão ingeridas pelo mosquito, onde ocorrerá a fecundação. No mosquito, os parasitos sofrem meiose e replicação mitótica para formar esporozoítos, que podem infectar outro hospedeiro humano.

### 1.3 Recaída

Uma característica da biologia do *P. vivax*, que também já foi encontrada em *P. ovale* e no parasito de malária simiana *P. cynomolgi*, é a capacidade de formar hipnozoítos, uma forma latente do parasito que pode permanecer no interior das células do fígado por variáveis períodos de tempo (WELLS et al., 2010).

Os hipnozoítos foram identificados pela primeira vez em 1982 através de biópsia hepática de chimpanzés infectados após a inoculação intravenosa de esporozoítos de *P. vivax* e foram caracterizados como uma fase hepática uninucleada persistente de cerca de 4  $\mu\text{m}$  de diâmetro (KROTOSKI et al. 1982). Algumas características do parasito podem variar entre as diferentes cepas, dentre

elas o tempo de dormência e o número de recaídas (Figura 4) (BATTLE et al., 2014). Cepas de regiões temperadas e subtropicais, por exemplo, apresentam um longo período de latência ou de incubação (de cerca de oito a dez meses) com poucos episódios de recaída, enquanto que cepas tropicais são caracterizadas por tempos de incubação e latência curtos, cerca de três a seis semanas com vários episódios de recaída (COATNEY et al., 1971). Huldén e colaboradores (2008) sugerem que a capacidade de dormência é parte da co-evolução do parasito, uma vez que os episódios de recaída coincidem com o comportamento sazonal do mosquito.



Adaptado de WHITE et al., 2014

**Figura 4: Fenótipos de latência e frequência de recaída por *P. vivax*.** Regiões tropicais apresentam cepas em que as recaídas acontecem mais rapidamente do que em zonas temperadas. Cepas de clima temperado apresentam recaídas mais lentamente em comparação com cepas de clima tropical.

Com relação à manifestação da doença, as recaídas, caracterizadas pela ativação dos hipnozoítos, são indistinguíveis de reinfecção em áreas endêmicas, causadas por novas picadas de mosquito, ou recrudescência, pela presença de formas sanguíneas do parasito de infecções pré-existentes. As formas latentes do *P. vivax*, hipnozoítos, podem ser consideradas um reservatório sub-clínico do parasito, o que representa uma grande barreira para a eliminação da malária, uma vez que não são eliminados por medicamentos tradicionais que combatem os estágios sanguíneos (WELLS et al., 2010).

Atualmente existe apenas um medicamento comercialmente disponível capaz de combater os hipnozoítos, a primaquina. No Brasil, o tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde para malária causada por *P. vivax* é a primaquina na dosagem de 30 mg/dia durante 7 dias, juntamente com a cloroquina na dosagem de 30 mg/kg divididos em três dias, que combate as fases sanguíneas do parasito.

Contudo, a primaquina não é considerada totalmente eficaz no combate à malária em virtude da existência de falhas na metabolização da droga, comprovadas por níveis insuficientes do metabólito ativo ocasionadas por polimorfismos uma enzima chave envolvida no metabolismo de primaquina (BENNETT et al., 2013), e também pelo fato de apresentar efeitos hemolíticos, especialmente em pessoas com deficiência de Glicose 6-fostato Desidrogenase (G6PD), em que a primaquina atua como um indutor de hemólise de eritrócitos (HOWES, et al., 2012).

Para tentar superar as dificuldades relacionadas ao controle da malária, muito tem sido estudado sobre as recaídas, porém os mecanismos que levam à dormência e reativação dos hipnozoítos ainda são desconhecidos (WHITE et al., 2014). Há trabalhos que sugerem que infecções causadas por outros patógenos como *P. falciparum* (SHANKS & WHITE, 2013) podem atuar na ativação dos hipnozoítos através de fenômenos como a inflamação ou a liberação de citocinas (LEVINE, 1963; MCLESTER, 1945). Há também uma hipótese de que a exposição à proteínas liberadas na saliva do *Anopheles* pode ativar a forma dormente do parasito (HULDEN & HULDEN, 2011).

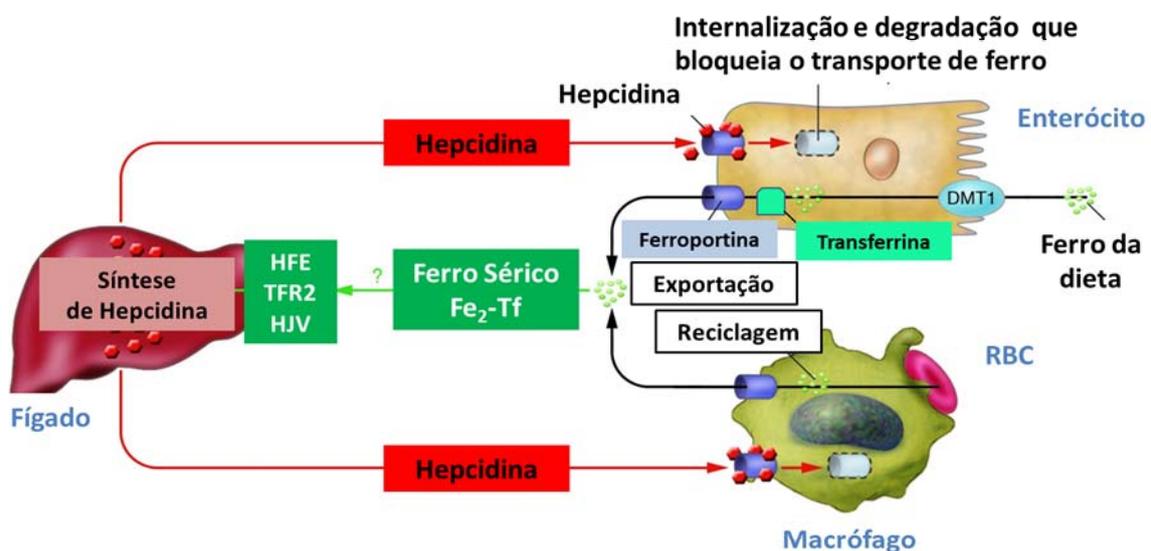
Com relação aos fatores do hospedeiro, poucos estudos têm sido conduzidos na elucidação do mecanismo de ativação dos hipnozoítos. Já foi observado que altas parasitemias sanguíneas provenientes de reinfeções podem levar à redução na parasitemia intra-hepática. Este mecanismo parece ser independente da resposta imune do hospedeiro, sugerindo que algum distúrbio relacionado à disponibilidade de nutrientes ou fator de crescimento do hospedeiro pode estar limitando a parasitemia hepática (PORTUGAL et al., 2011).

Vários estudos têm relacionado o metabolismo do ferro com o crescimento e desenvolvimento de diversos organismos, devido ao fato desse nutriente estar presente em processos vitais como síntese de DNA, o transporte de oxigênio e a geração de ATP (SCHAIBLE & KAUFMANN, 2004).

#### **1.4 Homeostase do ferro**

Já foi descrito na literatura que o ferro tem um papel importante na malária, tendo em vista inclusive que a o desenvolvimento do *Plasmodium* é dependente de ferro, tanto durante a fase hepática quanto na fase eritrocítica (SPOTTISWOODE et al., 2014).

O metabolismo do ferro envolve diversas proteínas com funções de absorção, distribuição e reciclagem em diferentes órgãos e tipos celulares (Figura 5). O ferro é absorvido da dieta através da proteína DMT1 (*Divalent metal transporter 1*) localizada na superfície apical dos enterócitos duodenais e distribuído aos tecidos pela proteína transferrina (Tf) (ANDREWS, 1999). Os macrófagos reticulo-endoteliais do baço são responsáveis pela reciclagem do ferro das células vermelhas senescentes do sangue. Os enterócitos e os macrófagos liberam o ferro através da ferroportina, que oxida  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ . O complexo  $\text{Fe}^{2+}$ -Tf, é detectado pelo fígado por um conjunto de proteínas ainda não muito bem compreendido composto por HFE (Hemocromatose - “*High Iron Fe*”), TFR2 (*Transferrin receptor-2*), e HJV (*Hemojuveline*). Os hepatócitos respondem a este sinal através da indução da expressão de HAMP (*Hepcidin Antimicrobial Peptide*) e secreção de hepcidina. A hepcidina circulante atua diminuindo a absorção de ferro da dieta pelos enterócitos e reciclagem de ferro pelos macrófagos através da internalização de ferroportina, que bloqueia a exportação de ferro. Como consequência, há uma diminuição do ferro sérico (PANTOPOULOS et al., 2012).



Adaptado de VAULONT et al. 2005

**Figura 5:** Regulação da homeostase do ferro. O complexo Ferro- transferrina ( $\text{Fe}^{2+}$ -Tf) é detectado pelo fígado por uma via regulamentar envolvendo HFE, TFR2 e HJV. Os hepatócitos respondem a este sinal através da indução da expressão do gene *HAMP* e secreção de hepcidina. A ferroportina é então internalizada, o que causa a diminuição de ferro sérico.

## **1.4.1 Distúrbios relacionados ao metabolismo do ferro e sua relação com a malária**

### **1.4.1.1 Deficiência de ferro**

Algumas doenças são causadas por falhas no metabolismo do ferro e estão associadas à deficiência ou ao acúmulo dessa molécula no organismo. A anemia, por exemplo, é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como "um estado em que a concentração de hemoglobina do sangue é anormalmente baixa em consequência da carência de um ou mais nutrientes essenciais, qualquer que seja a origem dessa carência". É caracterizada por níveis de hemoglobina menores que 12g/dL para mulheres e menores que 13g/dL para homens. Além disso, o hematócrito também pode ser utilizado para determinação da anemia, caracterizada por índices menores que 36% para mulheres e 39% para homens.

A anemia por deficiência de ferro resulta de longo período de balanço negativo entre a quantidade de ferro biologicamente disponível e a necessidade orgânica desse elemento (WHO, 2001).

A anemia pode ser causada por fatores como a alimentação, doenças infecciosas (parasitárias), inflamação crônica e também por fatores que alteram o funcionamento das proteínas envolvidas na homeostase do ferro (BURKE et al., 2001; HEENEY & FINBERG, 2014; CANAVESI et al., 2012). Além disso, a anemia é uma das complicações da malária (NAING et al., 2014).

A inflamação, com consequente liberação de citocinas pode levar à chamada "anemia por inflamação", que resulta na superexpressão da hepcidina ocasionando hipoferremia e reduzida disponibilidade de ferro para a eritropoiese (WEISS, 2009). Estudos recentes demonstram que infecções por *P. falciparum* e *P. vivax* tendem a aumentar os níveis de hepcidina (ATKINSON et al., 2015; Mendonça et al., 2015). Contudo, já foi demonstrado em modelo murino que altos níveis desse hormônio podem evitar superinfecções por *P. berghei* (PORTUGAL et al., 2011).

### **1.4.1.2 Acúmulo de ferro**

A falha na produção de hepcidina é o mecanismo patogênico mais comum que conduz ao acúmulo de ferro em quase todos os casos de Hemocromatose

Hereditária (HH) (CAMASCHELLA, 2005). Mutações ou ausência dos genes HFE, HJV, HAMP e TFR2 causam HH tipos 1, 2A, 2B, e 3, respectivamente, levam à redução da expressão de hepcidina. A hemocromatose tipo 1 é considerada a mais frequente, e a grande maioria dos casos está associada com os seguintes polimorfismos no gene HFE: 845 Guanina> Adenina, caracterizado pela substituição de uma cisteína por um aspartato na posição 282 (C282Y) e 187 Citosina> Guanina caracterizado pela substituição de uma histidina por um aspartato na posição 63 (H63D) (BEUTLER et al., 1996). As frequências desses polimorfismos na região norte do Brasil são de 0,3% para o polimorfismo C282Y e 7% para o H63D (TORRES et al. 2008).

Além disso, mutações no gene da Ferroportina (FPN), que causam HH tipo 4B, impedem a degradação da FPN mediada pela hepcidina (JANSSEN et al., 2009). Os polimorfismos C326Y/S em FPN resultam no acúmulo de ferro nos hepatócitos, sendo que a substituição C326S causa a forma mais grave da doença (KASVOSVE, 2013). Isso ocorre devido ao total bloqueio da ligação da hepcidina à ferroportina, resultando na absorção de ferro pelos enterócitos e na sobrecarga de ferro sistêmica (SHAM et al., 2009).

### **1.5 Biomarcadores e a malária**

Polimorfismos genéticos podem ser utilizados como biomarcadores, uma vez que esses biomarcadores são definidos como quaisquer alterações mensuráveis em amostras biológicas, sendo elas moleculares, bioquímicas ou celulares (NAYLOR, 2003) utilizadas para identificação de algum fenótipo de interesse.

Em regiões endêmicas onde a malária assintomática é frequente, técnicas que utilizem biomarcadores, combinados com estratégias de tratamento adequadas podem auxiliar significativamente na eliminação de reservatórios humanos do parasito que frequentemente contribuem para a persistência da transmissão de malária (ZOGHI et al., 2012)

PfLDH (*P. falciparum lactate dehydrogenase*) e HRP6 (*Histidine-rich proteins*) por exemplo, são biomarcadores utilizados no diagnóstico dessa doença (MATHEMA & BANGCHANG, 2015). Com relação à malária cerebral, os níveis plasmáticos das proteínas angiopoietina (ANG-1 and ANG-2) podem ser utilizados para prognóstico dessa complicação da malária (JAIN et al., 2011; LOVEGROVE et al., 2009). Contudo, não existem trabalhos disponíveis que descrevam algum

biomarcador de pré-disposição para recaída e anemia em pacientes infectados por *P. vivax*.

Tendo em vista o número reduzido de trabalhos abordando a relação da homeostase do ferro com o desenvolvimento de malária e anemia causada por *P. vivax* e considerando que não existem biomarcadores de pré-disposição para recaída e anemia em malária, a hipótese a ser investigada neste trabalho é que as moléculas envolvidas na homeostase do ferro podem ser utilizadas como biomarcadores de recaída e/ou de anemia através da análise de polimorfismos em genes reguladores dessa via.

## 2 JUSTIFICATIVA

A malária causada por *P. vivax* é de extrema importância para a saúde pública mundial, com grande número de casos, ampla distribuição geográfica e possibilidade de agravamento da doença podendo levar o paciente a óbito.

Estudos com esse parasito são dificultados uma vez que eles infectam preferencialmente reticulócitos no sangue periférico, e que essas células amadurecem rapidamente em eritrócitos, limitando assim o desenvolvimento de cultura *in vitro* e, conseqüentemente, a pesquisa com *P. vivax*. Além disso, o fato de a transmissão para o vetor ser altamente eficiente, devido ao aparecimento de gametócitos precocemente no sangue e dos mecanismos relacionados à dormência e ativação dos hipnozoítos ainda serem desconhecidos, o controle da malária causada por esse parasito ainda é um grande desafio.

Já se sabe que o metabolismo de diversos organismos, incluindo *P. vivax* está associado à disponibilidade de ferro. Exemplo disso é que tanto *in vitro* quanto *in vivo*, níveis elevados de ferro favorecem o desenvolvimento do *Plasmodium* e a deficiência dessa molécula inibe o seu crescimento (GOMA et al., 1995; LOYEVSKY et al., 1999; SCHEIBEL & ADLER, 1982). Além disso, a anemia, uma das principais complicações da malária, pode ser relacionada com alterações no funcionamento de proteínas envolvidas na homeostase do ferro. O acúmulo de ferro no organismo pode ocorrer por diversos motivos. Um deles é a Hemocromatose Hereditária, causada principalmente por polimorfismos no gene HFE, que podem indicar uma pré-disposição a reter maiores quantidades desse elemento de maneira sistêmica.

Falhas na regulação da ferroportina (FPN) pela hepcidina também podem resultar no acúmulo de ferro nos hepatócitos de indivíduos portadores de polimorfismos nesse gene.

Tendo em vista que o metabolismo do *P. vivax* está associado à disponibilidade de ferro e que os genes a serem estudados (HFE e FPN) estão relacionados com a regulação e homeostase do ferro levando à sobrecarga desse composto no hospedeiro, a hipótese a ser investigada é que polimorfismos nas moléculas envolvidas na homeostase do ferro podem ser utilizados como biomarcadores de recaída e/ou de anemia.

Nesse contexto, é de grande relevância a identificação da existência de relação entre os polimorfismos nos genes reguladores da homeostase do ferro e o desenvolvimento de recaída e/ou da anemia em indivíduos infectados por *P. vivax* para que se possa ter um marcador de pré-disposição para essas possíveis consequências da malária. Assim, será possível obter um planejamento terapêutico mais adequado, resultando em um melhor prognóstico para o paciente e ainda contribuir para elucidação dos mecanismos responsáveis pela ativação dos hipnozoítos que possam auxiliar em novas estratégias para programas de eliminação da malária, como no monitoramento de indivíduos que possuam predisposição ao acúmulo de ferro, e também resistência ao tratamento, principalmente nas áreas endêmicas.

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo geral**

Estudar polimorfismos em genes codificadores de moléculas envolvidas na homeostase do ferro e sua associação com episódios de recaída e ocorrência de anemia durante a infecção malárica por *Plasmodium vivax*.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Analisar os polimorfismos C282Y e H63D no gene HFE e C326S/Y no gene FPN.
- Correlacionar a presença desses polimorfismos nos genes envolvidos na homeostase do ferro com a ocorrência de episódios de recaída por *P. vivax*.
- Correlacionar a presença de polimorfismos nos genes envolvidos na homeostase do ferro com a ocorrência de anemia em pacientes infectados por *P. vivax*.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Pacientes e Obtenção de amostras

Foram utilizadas amostras de DNA de pacientes clinicamente acompanhados no Hospital Universitário Júlio Muller/MT em Cuiabá/MT, após o consentimento por escrito dos voluntários selecionados. As amostras foram obtidas no período de 2001 a 2012 e encontravam-se criopreservadas nos bancos de DNA do Laboratório de Malária do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ-MG. O diagnóstico da malária foi realizado no Hospital Julio Muller através de gota espessa corada por Giemsa. Foram selecionadas para este trabalho apenas amostras diagnosticadas com infecção apenas pelo *Plasmodium vivax*, excluindo infecções pelo *P. falciparum*.

Esses pacientes foram divididos em dois grupos: anemia e recaída. Para estudar os aspectos relacionados à anemia foram utilizados os seguintes critérios de inclusão: (I) infecção por *P. vivax*; (II) idade igual ou superior a 14 anos; (III) ausência de gravidez. Além disso, os pacientes foram divididos em grupos de: a) anêmicos (n=27) definidos pelo índice de hemoglobina menor que 12g/dL para mulheres e menor que 13g/dL para homens; e b) não anêmicos (n=47) com índice de hemoglobina maior ou igual que 12g/dL para mulheres e maior ou igual que 13g/dL para homens, sendo os exames de hemograma realizados de forma automatizada (Horiba).

Com relação ao estudo de recaída, foram considerados pacientes que: (I) apresentaram infecção por *P. vivax* e foram tratados por 3 dias com Cloroquina a 25mg/kg e 7 dias de tratamento com Primaquina a 30mg (II) apresentaram episódios de recaída mais de 28 dias após a primeira infecção e o início do tratamento, além disso (III) os paciente deveriam confirmar que não estiveram em área endêmica para malária desde o início do tratamento até o momento da ocorrência do episódio de recaída. Atendendo a esses critérios, foram estudados 35 indivíduos, subdivididos em dois grupos: uma recaída (n=26) e múltiplas recaídas (n=9).

## 4.2 Amplificação dos alvos através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica de PCR foi utilizada para a amplificação de regiões de interesse dos genes estudados, a partir de molde de DNA fita dupla. A amplificação da região que continha os polimorfismos C282Y e H63D na enzima HFE foi realizada de acordo com Lynas (1997) com modificações. Os volumes finais foram de 25  $\mu\text{L}$ , compreendendo 1  $\mu\text{L}$  DNA, 1x Taq Buffer, 0,25  $\mu\text{M}$  de cada primer (Tabela 1), 200  $\mu\text{M}$  dNTPmix (0,125 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,8  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$  e 1U Taq DNA polimerase (Invitrogen, California, USA).

As reações para o alvo FPN 326 (977 G>C/A) também foram preparadas com volume final de 25  $\mu\text{L}$  com 1  $\mu\text{L}$  DNA, 1x Taq Buffer, 0,25  $\mu\text{M}$  de cada primer, 200  $\mu\text{M}$  dNTPmix (0,125 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 3,2  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$  e 1U Taq DNA polimerase (Invitrogen, California, USA).

As reações ocorreram no termociclador Veriti® 96 Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), segundo as condições descritas na Tabela 1. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo.

**Tabela 1:** Sequência dos iniciadores, condições de ciclagem e tamanho do amplicon gerado pela PCR.

<b>Alvo</b>	<b>Sequência Foward</b>	<b>Sequência Reverse</b>	<b>Ciclagem</b>	<b>Tamanho do amplicon</b>
<b>HFE C282Y</b>	5'-TGGCAAGGGTAAACAGATCC-3'	5'-CTCAGGCACTCCTCTCAACC-3'	95°C por 3min, 32 ciclos de 45s a 95°C, 64°C por 30s e 72°C por 1 min, seguido de extensão final de 72°C por 5min	390 pb
<b>HFE H63D</b>	5'-ACATGGTTAAGGCCTGTTGC-3'	5'-GCCACATCTGGCTTGAAATT-3'	95°C por 3min, 32 ciclos de 45s a 95°C, 62°C por 30s e 72°C por 1 min, seguido de extensão final de 72°C por 5min	208 pb
<b>FPN C326S/Y</b>	5'-TCCGTACCTTCCGAGATGGA-3'	5'-CGATTCTAGCAGCAATGACGC-3'	95°C por 3min, 32 ciclos de 45s a 95°C, 60°C por 30s e 72°C por 1 min, seguido de extensão final de 72°C por 5min	528 pb

### 4.3 Genotipagem dos polimorfismos HFE C282Y e HFE H63D através de – Polimorfismos por restrição de fragmentos em produtos da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR-RFLP

Os produtos de PCR das amostras amplificadas para os alvos HFE C282Y e HFE H63D foram digeridos com enzimas de restrição específicas, como detalhado na Tabela 2. Os produtos gerados durante a digestão foram visualizados em gel de poliacrilamida 12% e corados com nitrato de prata.

**Tabela 2:** Condições para reação de digestão da PCR-RFLP

Alvo	Enzima	Reagentes	Ciclagem	Fragmentos gerados
HFE C282Y	<i>Rsa</i> I	Enzima: 10 U	2 horas por 37°C	Não mutado: 250pb e 140pb
		Buffer: 3,2 µl		Temp. de inativação: 65°C por 20min.
HFE H63D	<i>Bcl</i> I	Prod. PCR: 15 µl	2 horas por 50°C	Mutado: 208pb
		H <sub>2</sub> O: 0,8 µl		
		Enzima: 0,45 U		
		Buffer: 0,96 µl		
		Prod. PCR: 15 µl		
		H <sub>2</sub> O: 3,74 µl		

### 4.4 Genotipagem do polimorfismo C326Y/S no gene da Ferroportina por sequenciamento

#### 4.4.1 Purificação dos produtos de PCR

Após a confirmação da amplificação dos alvos por PCR através da eletroforese em gel de agarose, foi realizada a purificação desses produtos utilizando o kit de purificação QIAquick® (QIAGEN, Netherlands).

Para isso, foi adicionado Tampão PB1 5 vezes o volume da amostra. A mistura foi homogeneizada, transferida para a coluna QIAquick acoplada em um tubo coletor de 2 mL e centrifugada a 12.000 r.p.m. por 1 minuto. Após, o sobrenadante foi descartado e a coluna colocada novamente no tubo de coleta. Para lavar, foi adicionado 750  $\mu$ L de tampão PE na coluna e centrifugado a 12.000 r.p.m. por 1 minuto. O conteúdo foi descartado e a coluna recolocada no tubo. Para secar a coluna e eliminação de toda solução resíduo, foi realizada nova centrifugação sem nenhum reagente, por mais 1 minuto a 12.000 r.p.m. A coluna foi colocada em um tubo de 1,5 mL e, para eluir o DNA, foram adicionados 15  $\mu$ L de tampão EB no centro da coluna e centrifugado a 12.000 r.p.m. por 1 minuto. Esta etapa foi realizada duas vezes (com um volume final de 30 $\mu$ L) a fim de se obter o DNA mais concentrado. Após esse procedimento de purificação, as amostras foram novamente analisadas em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

#### **4.4.2 Reação de Sequenciamento**

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o kit Big Dye® Terminator v3.1 cycle sequencing (Applied Biosystems, Califórnia, USA). As reações apresentaram aproximadamente 10 ng de DNA, 3,3  $\mu$ M do iniciador senso, 0,5  $\mu$ L de Big Dye® Terminator, 1,75  $\mu$ L de tampão, completando com água para um volume final de 10  $\mu$ L. As reações foram realizadas no termociclador Veriti® (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), sendo as condições da amplificação: 96°C por um minuto, 35 ciclos a 96°C por quinze segundos, 60°C por quinze segundos e 60°C por quatro minutos.

#### **4.4.3 Precipitação das amostras**

Para precipitação do DNA, em cada poço da placa MicroAmp 96-well® Reaction plate (Applied Biosystems, Califórnia, USA) foram adicionados 1  $\mu$ L de EDTA 125 mM, 1  $\mu$ L de acetado de amônio 7,5 M e 50  $\mu$ L de etanol absoluto P.A. gelado. Em seguida, a placa foi selada e vortexada brevemente. Logo após, a placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e centrifugada por 45 minutos a 3700 r.p.m. também em temperatura ambiente. A placa foi vertida e o sobrenadante foi descartado. Em cada poço foram adicionados 100  $\mu$ L de etanol 70% gelado. A placa foi centrifugada por 15 minutos a 3700 r.p.m. em temperatura

ambiente e foi vertida de forma que o sobrenadante fosse descartado. Em seguida a placa foi centrifugada em posição invertida a 3700 rpm por dois minutos. Finalmente, o DNA foi ressuspensionado com formamida HI-DITM (Applied Biosystems, Califórnia, USA). A placa foi novamente selada e vedada em papel alumínio e analisada em sequenciador automático 37300 ABI pela plataforma de sequenciamento da FIOCRUZ-MG.

#### **4.4.4 Análise do sequenciamento**

Os dados brutos obtidos do sequenciador automático ABI foram analisados individualmente no *Chromas Lite* versão 2.1.1 e pela ferramenta *Electropherogram quality analysis* (<http://www.biomol.unb.br/phph/>), onde é possível verificar a qualidade das sequências. Os alinhamentos das sequências e a obtenção da sequência consenso foram realizados com o software de alinhamento múltiplo *ClustalW* (THOMPSON et al., 1994) e *Contig Assembly Program (CAP)* (HUANG, 1992), dentro do pacote de programas *BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9* (HALL, 1999).

#### **4.5 Análises estatísticas**

Inicialmente foi verificada a normalidade dos dados das variáveis: hemoglobina, hematócrito, parasitemia, idade, número de episódios de malária e dias de sintomatologia através dos testes D'Agostino's & Pearson's, Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Os dados que apresentaram distribuição normal nos três testes foram então analisados pelo Teste t não pareado, enquanto que as variáveis com distribuição não normal foram analisadas por um teste não paramétrico (Teste de Mann Whitney). Para a comparação das frequências genotípicas e alélicas dos indivíduos estudados foi utilizado o Teste Exato de Fisher e para comparação dos gêneros o teste Chi-Quadrado. Todas as análises foram realizadas considerando o nível de significância de 5% através do software *GraphPad Prism 5*.

## 5 RESULTADOS

Os polimorfismos referentes ao acúmulo de ferro no organismo foram analisados em indivíduos infectados por *P. vivax* com e sem anemia e em indivíduos que apresentaram recaídas por esse parasito, classificados de acordo com os valores de referência de hemoglobina para cada gênero.

### 5.1 Caracterização do pacientes com anemia

Dois grupos foram definidos de acordo com os níveis de hemoglobina: anêmicos (menor que 12g/dL para mulheres e menor que 13g/dL para homens) e não anêmicos (maior ou igual que 12g/dL para mulheres e maior ou igual que 13g/dL para homens). No grupo dos indivíduos anêmicos, a mediana do nível de hemoglobina para as mulheres foi de 10,45 g/dL e para os homens 11,05 g/dL, enquanto que no grupo dos indivíduos não anêmicos a mediana observada para as mulheres foi de 12,9 g/dL e para os homens 14,15 g/dL, sendo essa diferença estatisticamente significativa (Figura 6).

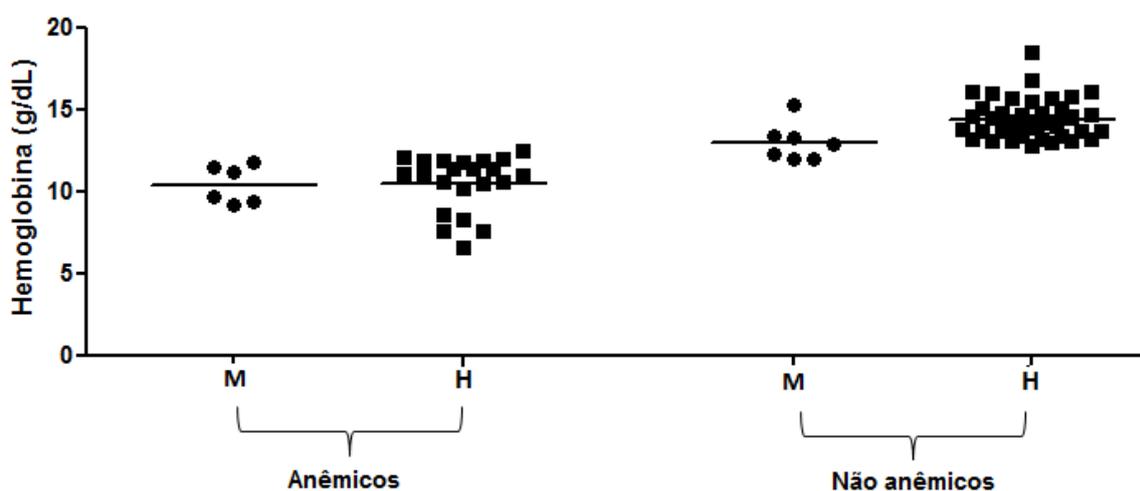
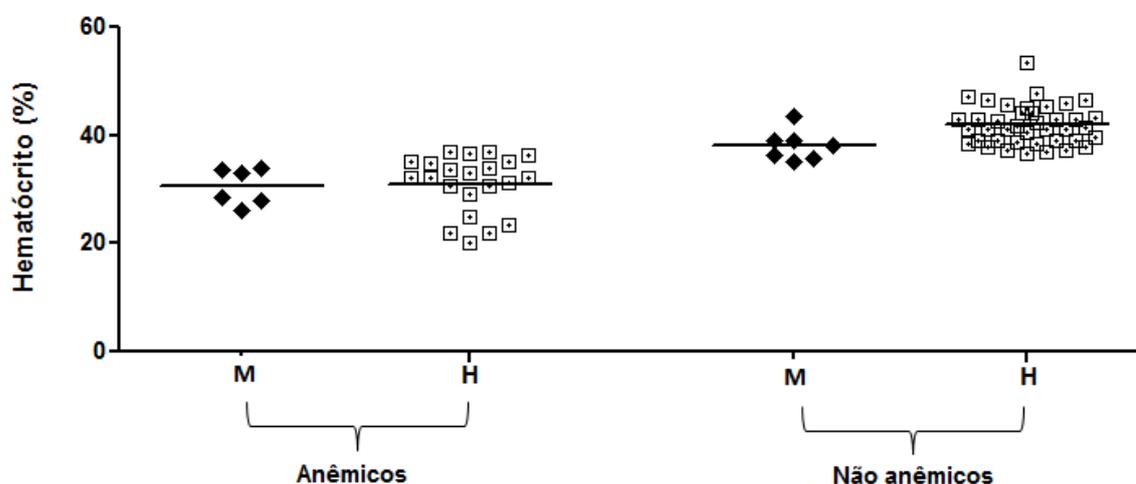


Figura 6:

Valores de hemoglobina entre mulheres (M) e homens (H) dos grupos de indivíduos anêmicos e não anêmicos. Mann Whitney test para mulheres  $P= 0,001$  e para homens  $P<0,0001$ .

Com relação ao índice de hematócrito, no grupo dos indivíduos anêmicos a mediana observada para as mulheres 30,80% e de 32,10% para os homens enquanto que no grupo dos indivíduos não anêmicos a mediana para as mulheres

foi de 38% e para os homens 41,45% e a diferença entre esses dois grupos também foi estatisticamente significativa (Figura 7).



**Figura 7:** Valores de hematócrito entre mulheres (M) e homens (H) dos grupos de indivíduos anêmicos e não anêmicos. Mann Whitney test para mulheres  $P=0,001$  e para homens  $P<0,0001$ .

Algumas variáveis podem estar associadas direta ou indiretamente ao desenvolvimento de anemia, tais como parasitemia, idade, número de episódios anteriores de malária e dias de sintomatologia. Portanto, o próximo passo foi comparar os grupos de indivíduos anêmicos e não anêmicos em relação à esses fatores (Tabela 3). Entre essas variáveis foi observada diferença estatisticamente significativa para a idade e para os dias de sintomatologia, sendo que indivíduos anêmicos apresentam maior idade e mais dias de sintomas em comparação com os indivíduos não anêmicos.

**Tabela 3:** Comparação dos valores médios de diferentes variáveis entre os grupos com ou sem anemia infectados por *P. vivax*

Variáveis	Anêmicos		Não Anêmicos		P*
	Mediana/ Média	DP	Mediana/ Média	DP	
Parasitemia (parasitos/mm <sup>3</sup> )	1244	2231	1566	3510	0,72
Idade (anos)	43,27	3,14	34,77	1,6	0,01
Número de episódios	3	4,49	3	8,604	0,32
Dias de Sintomatologia	10	10,32	3	7,647	<0,0001

\*Teste de Mann Whitney, exceto para idade Teste t não pareado. DP – desvio padrão.

### 5.1.1 Relação entre anemia e algumas dosagens bioquímicas relacionadas ao metabolismo do ferro

As concentrações de alguns elementos podem influenciar o estado anêmico dos indivíduos. Por isso, foram realizadas dosagens de ferro, ferritina e hepcidina nos indivíduos anêmicos e não anêmicos (ARAÚJO, 2014). Foi observada maior concentração de ferro no grupo dos indivíduos não anêmicos, e maiores níveis de hepcidina no grupo dos anêmicos. Contudo, essas diferenças não foram estatisticamente significativas (Tabela 4).

**Tabela 4:** Comparação das dosagens de ferro, ferritina e hepcidina entre os grupos de indivíduos anêmicos e não anêmicos.

Variáveis	Anêmicos			Não anêmicos			P
	n	Mediana	DP	N	Mediana	DP	
Ferro ( $\mu\text{g/dL}$ )	6	50,40	62,49	14	99,35	68,95	0,2459
Ferritina ( $\mu\text{g/L}$ )	6	350,4	179,3	14	346,3	286,9	0,7260
Hepcidina ( $\text{ng/mL}$ )	6	419,8	134,5	15	293,4	168,9	0,1729

Teste de Mann Whitney

### 5.2 Caracterização dos pacientes com recaída e sua relação com anemia

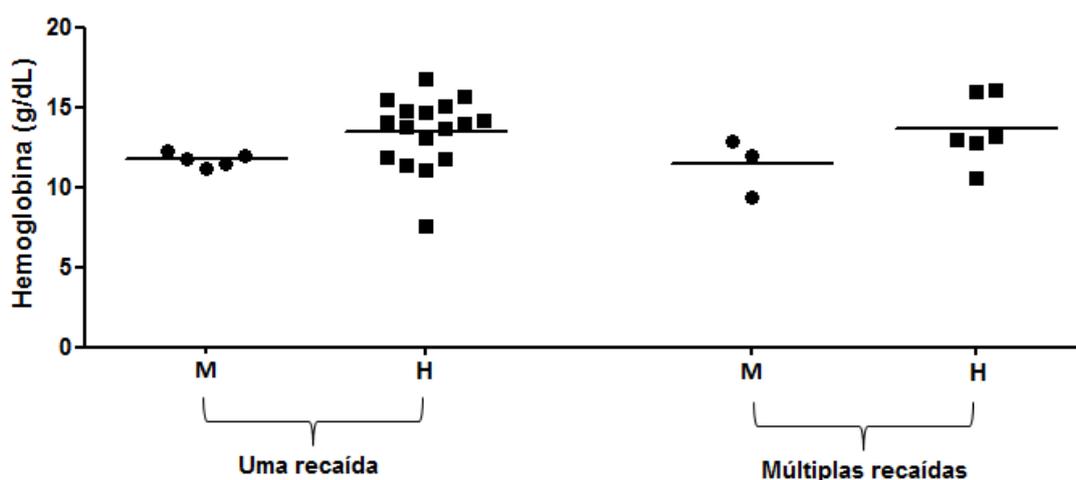
As amostras de indivíduos que tiveram recaída por *P. vivax* foram divididas em dois grupos: indivíduos com uma recaída ( $n=26$ ) e indivíduos com múltiplas recaídas ( $n=9$ ), sendo no mínimo 2 e no máximo 4 recaídas. Inicialmente, esses grupos foram comparados considerando diferentes variáveis: parasitemia, idade, número de episódios anteriores de malária e os dias de sintomatologia em função da quantidade de recaída apresentada pelos indivíduos estudados. Não foi observada diferença significativa entre os grupos (uma e múltiplas recaídas) para nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 5).

**Tabela 5:** Comparação dos valores médios de diferentes variáveis entre os grupos com número variado de recaídas

Variáveis	Uma recaída		Múltiplas recaídas		P*
	Mediana/ Média	DP	Mediana/ Média	DP	
Parasitemia (parasitos/mm <sup>3</sup> )	1594	4642	2876	2282	0,73
Idade (anos)	38,08	2,4	32,89	4,8	0,30
Número de episódios prévios	4	9,9	3	3,5	0,50
Dias de Sintomatologia	4	6,0	3,5	3,0	0,56

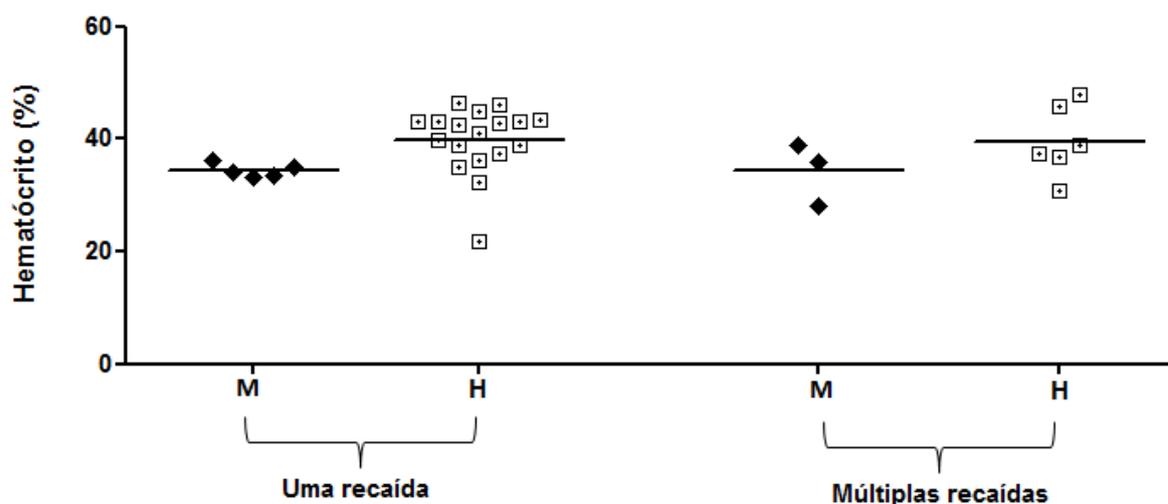
\*Teste de Mann Whitney, exceto para idade em que foi realizado o Teste t não pareado. DP – desvio padrão.

Para os índices hematológicos, as análises foram realizadas considerando o gênero do paciente, uma vez que os valores de referência são diferentes entre eles. A mediana do índice de hemoglobina entre as mulheres do grupo de uma recaída foi de 11,8 g/dL e no grupo de múltiplas recaídas foi de 12,0 g/dL. Já para os homens, a mediana do índice de hemoglobina do grupo de uma recaída foi de 14 g/dL e do grupo de múltiplas recaídas foi de 13,10 g/dL. Não houve diferença estatística entre esses grupos (Figura 8).



**Figura 8:** Valores de hemoglobina entre mulheres (M) e homens (H) dos grupos de uma e múltiplas recaídas. Teste de Mann Whitney comparando uma e múltiplas recaídas em mulheres  $P=0,88$  e em homens  $P=0,91$ .

A mediana da concentração de hematócrito entre as mulheres do grupo com uma recaída foi de 34% e do grupo de múltiplas recaídas 35,80%. Entre os homens, a mediana da concentração de hematócrito no grupo de uma recaída foi de 41,75% e no grupo de múltiplas recaídas 38,05%. A diferença entre esses grupos não foi estatisticamente significativa (Figura 9).



**Figura 9: Valores de hematócrito entre mulheres (M) e homens (H) dos grupos de uma e múltiplas recaídas.** Teste de Mann Whitney comparando uma e múltiplas recaídas em mulheres  $P=0,78$  e em homens  $P=0,73$ .

### 5.2.1 Relação entre recaídas e as dosagens bioquímicas

Além dos índices hematológicos, alguns elementos relacionados ao metabolismo do ferro amostras foram dosados pelo nosso grupo de pesquisa (ARAÚJO, 2014). Os resultados dessas dosagens indicaram que principalmente as concentrações de ferro eram maiores para o grupo de múltiplas recaídas, contudo essa diferença não foi estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 6).

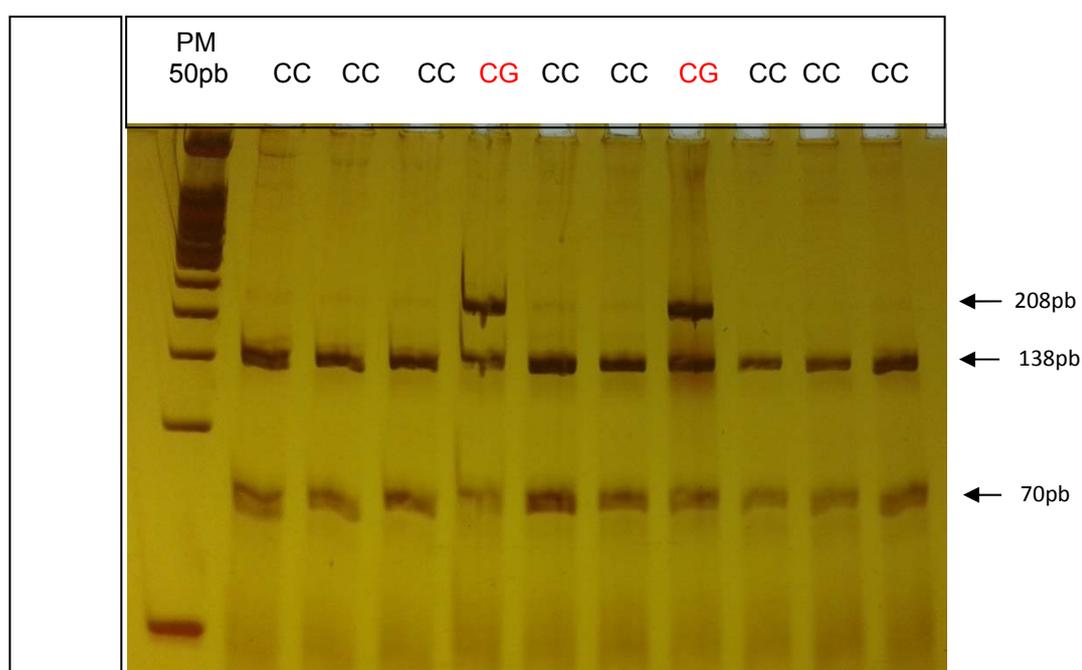
**Tabela 6:** Comparação das dosagens de ferro, ferritina e hepcidina entre os grupos de uma e múltiplas recaídas.

Variáveis	Uma recaída			Múltiplas recaídas			P*
	n	Mediana	DP	n	Mediana	DP	
Ferro (µg/dL)	13	77,20	72,37	6	123,2	53,73	0,23
Ferritina (µg/L)	14	305,6	307,1	6	308,9	123,9	0,77
Hepcidina (ng/mL)	17	300,6	168,5	6	280,6	90,73	0,50

\*Teste de Mann Whitney

### 5.3 Análises do polimorfismo H63D no gene codificador da Hemocromatose

A reação de PCR-RFLP foi padronizada com sucesso de acordo com o protocolo descrito por Torres e colaboradores (2008), apresentando modificações, conforme especificado na metodologia. A figura 10 ilustra o perfil eletroforético do polimorfismo HFE H63D, caracterizado pela substituição nucleotídica 187 C>G, para amostras de 10 pacientes.



**Figura 10:** Perfil eletroforético do polimorfismo HFE 187 C>G, para amostras de 10 indivíduos. Gel de poliácridamida 12% corado com nitrato de prata. PM= padrão de peso molecular.

### 5.3.1 Relação entre o polimorfismo H63D e anemia

Com relação aos genes estudados envolvidos com o metabolismo do ferro, análises do polimorfismo HFE H63D no gene da Hemocromatose através da PCR-RFLP demonstraram que no grupo dos anêmicos (n=26), vinte indivíduos (77%) apresentaram o genótipo homozigoto não mutado (C/C) e 6 (23%) apresentaram o genótipo heterozigoto (C/G), enquanto que no grupo dos não anêmicos (n=45), trinta e quatro indivíduos (75%) foram homozigotos não mutados (C/C), 10 (22%) heterozigotos (C/G) e 1 (2%) homozigoto mutado (G/G). Não houve diferença estatisticamente significativa entre esses grupos (Figura 11).

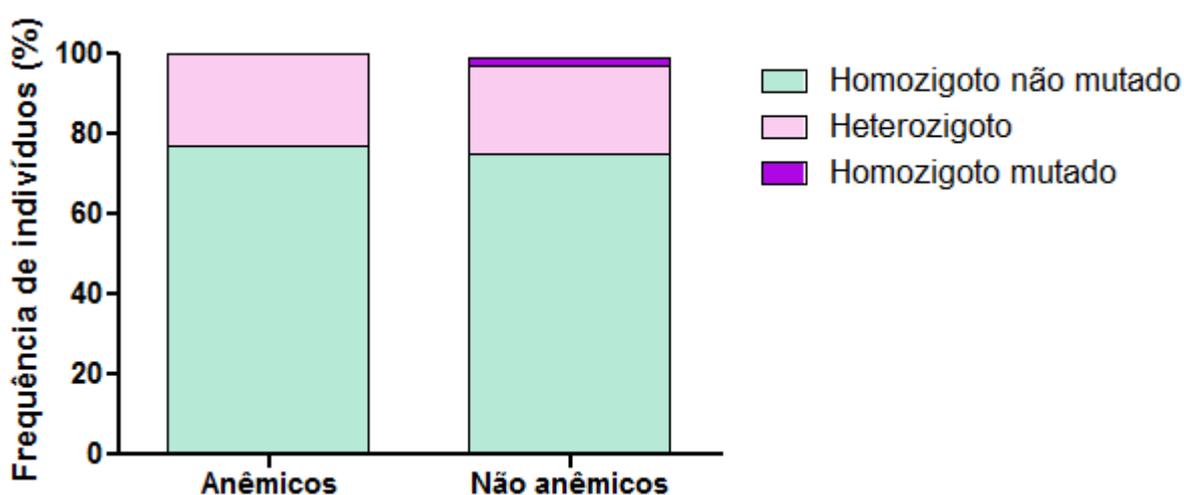
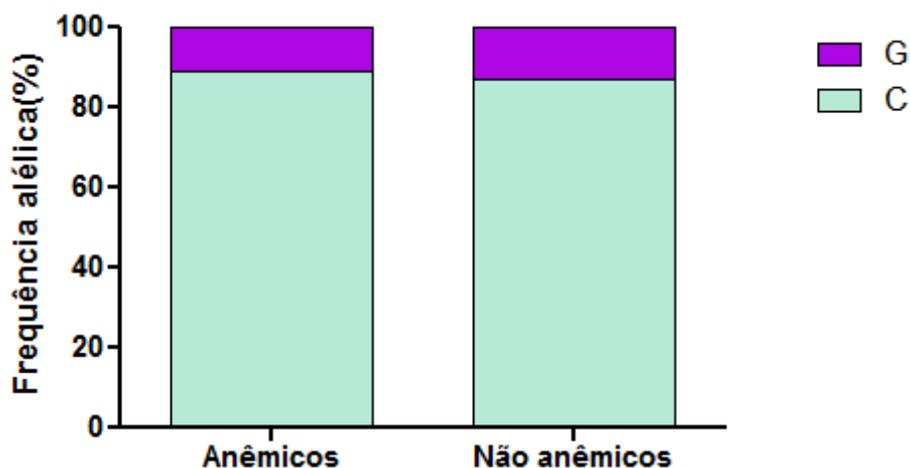


Figura 11: Frequência do polimorfismo HFE H63D entre indivíduos anêmicos e não anêmicos. Teste exato de Fisher  $P=1,00$ .

Em relação as frequências alélicas, o alelo mutado G foi observado em frequência de 11% no grupo de indivíduos anêmicos, enquanto que no grupo de indivíduos não anêmicos essa frequência foi de 13% ( $P=0,79$ ) (Figura 12).



**Figura 12: Frequência alélica para o polimorfismo HFE H63D entre indivíduos anêmicos e não anêmicos.** Teste exato de Fisher  $P=0,79$ .

Como a Hemocromatose ocorre principalmente em homens, foi realizada a análise dos polimorfismos encontrados em função do gênero dos paciente estudados. Entre os indivíduos que apresentavam anemia, 4 (66,7%) eram homens e 2 (33,3%) eram mulheres entre os heterozigotos para a mutação HFE H63D. Já no grupo dos indivíduos não anêmicos, os heterozigotos são representados por 9 homens (90%) e 1 mulher (10%). O único indivíduo homozigoto mutado para esse polimorfismo é do sexo masculino. Não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre esses grupos.

### 5.3.2 Polimorfismo H63D- Recaída

Entre todas as amostras analisadas no grupo de uma recaída ( $n=26$ ), vinte e cinco indivíduos (96%) apresentaram genótipo homozigoto não mutado (C/C) e 1 indivíduo (4%) apresentou genótipo heterozigoto (C/G). No grupo de múltiplas recaídas ( $n=9$ ), 6 indivíduos (67%) eram homozigoto não mutado e 3 indivíduos (33%) eram heterozigotos, sendo essa diferença estatisticamente significativa ( $P=0,04$ ) (Figura 13).

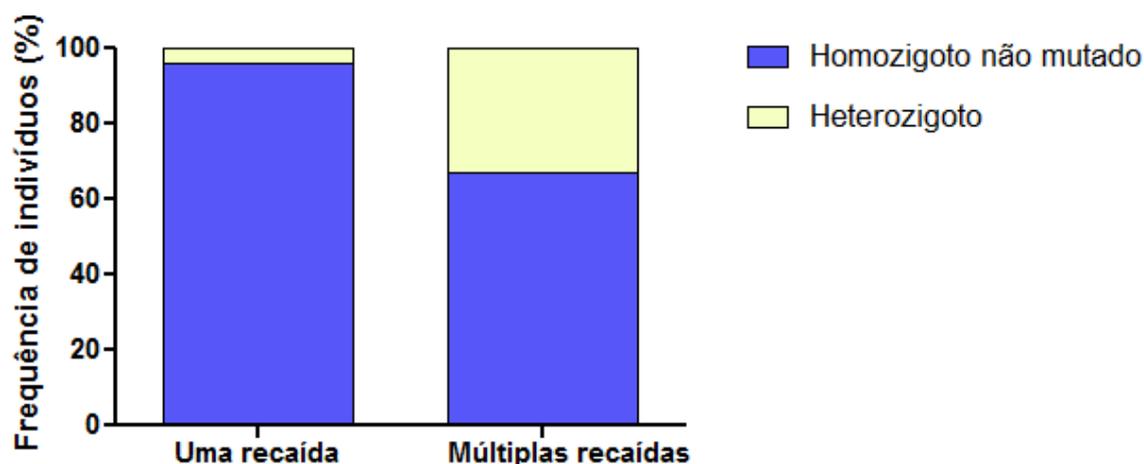


Figura 13: Frequência do polimorfismo HFE H63D entre indivíduos com uma e múltiplas recaídas. Teste exato de Fisher  $P=0,04$ .

Em relação às frequências alélicas, a frequência do alelo mutado G foi significativamente maior no grupo de indivíduos com múltiplas recaídas (17%) em comparação com o grupo de uma recaída (2%) (Figura 14).

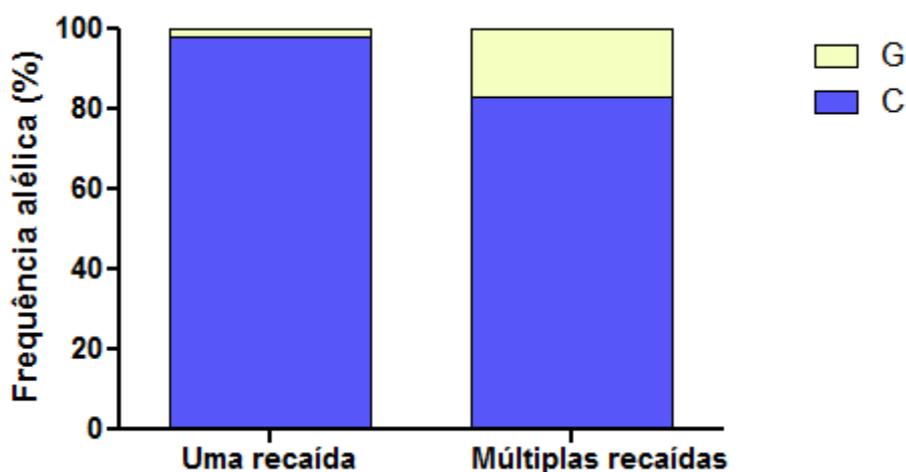


Figura 14: Frequência alélica para o polimorfismo HFE H63D entre indivíduos com uma e com múltiplas recaídas. Alelo mutado G e alelo não mutado C. Teste exato de Fisher  $P=0,04$ .

Com relação ao gênero, entre os indivíduos heterozigotos, 2 são homens (50%) e 2 são mulheres (50%).

Após a genotipagem para o HFE H63D em função do número de recaídas, foram realizadas novas análises para os índices de hemoglobina e hematócrito em função da genotipagem, a fim de se verificar se havia diferenças entre homozigotos

não mutados e heterozigotos. Os valores de hemoglobina e hematócrito não apresentaram diferença significativa entre os indivíduos homozigotos não mutados e heterozigotos, tanto para os homens quanto para as mulheres (Tabela 7).

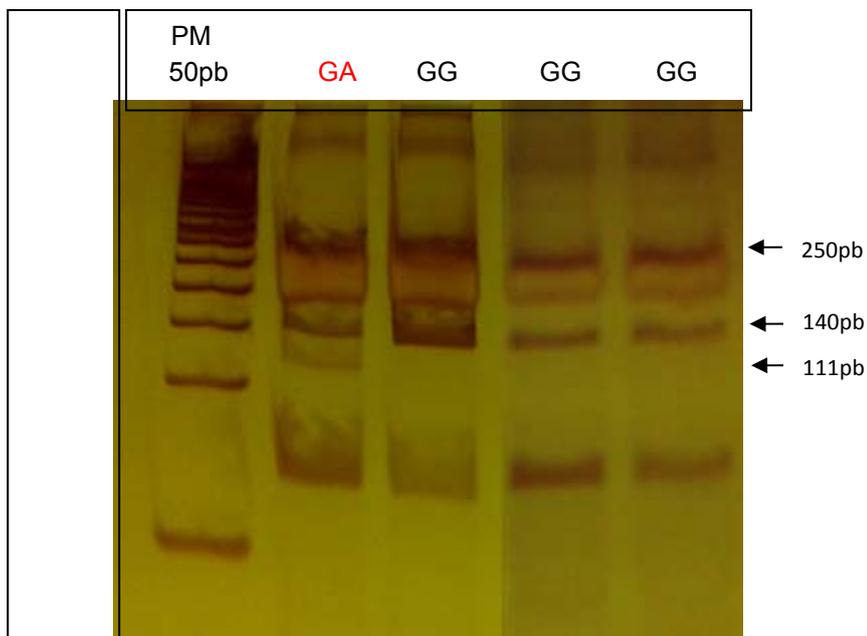
**Tabela 7:** Comparação dos valores de hemoglobina e hematócrito entre homens e mulheres homozigotos não mutados e heterozigotos para o polimorfismo HFE H63D.

Variáveis	Homozigoto normal		Heterozigoto		P*
	Mediana/ Média	DP	Mediana/ Média	DP	
Hemoglobina/mulheres (g/dL)	11,9	0,6	10,70	1,838	0,51
Hemoglobina/ homens (g/dL)	13,20	1,99	13,80	1,414	0,77
Hematócrito/ mulheres (%)	34,50	2,20	31,90	5,515	0,56
Hematócrito/ homens (%)	40,35	6,06	39,60	4,101	0,97

\*Teste de Mann Whitney.

#### 5.4 Análises do polimorfismo C282Y no gene codificador da Hemocromatose

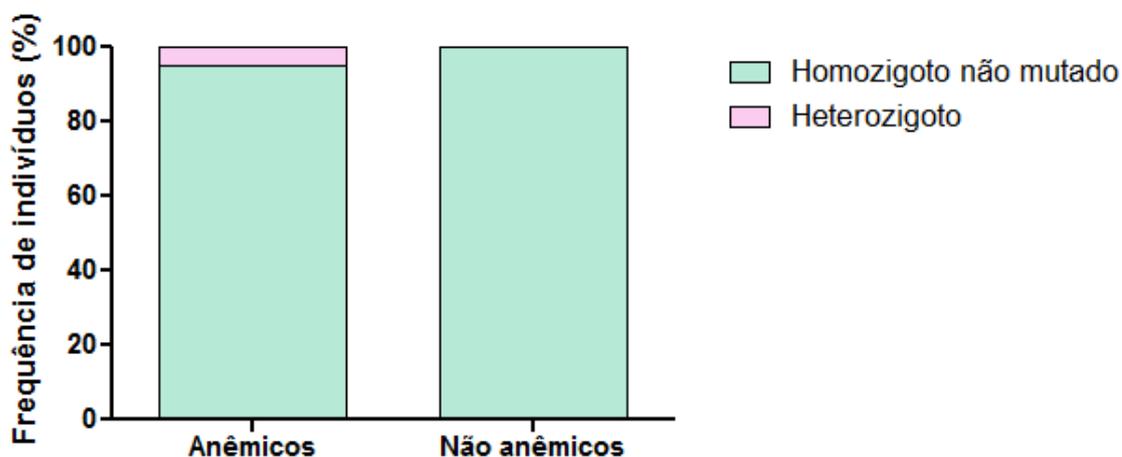
A reação de PCR-RFLP para o polimorfismo HFE C282Y também foi padronizada com sucesso de acordo com o protocolo descrito por Torres e colaboradores (2008) com modificações. A figura 15 ilustra o perfil eletroforético do polimorfismo caracterizado pela substituição nucleotídica 845 G>A para amostras de 4 pacientes.



**Figura 15: Perfil eletroforético do polimorfismo HFE 845 G>A para amostras de 4 indivíduos.**

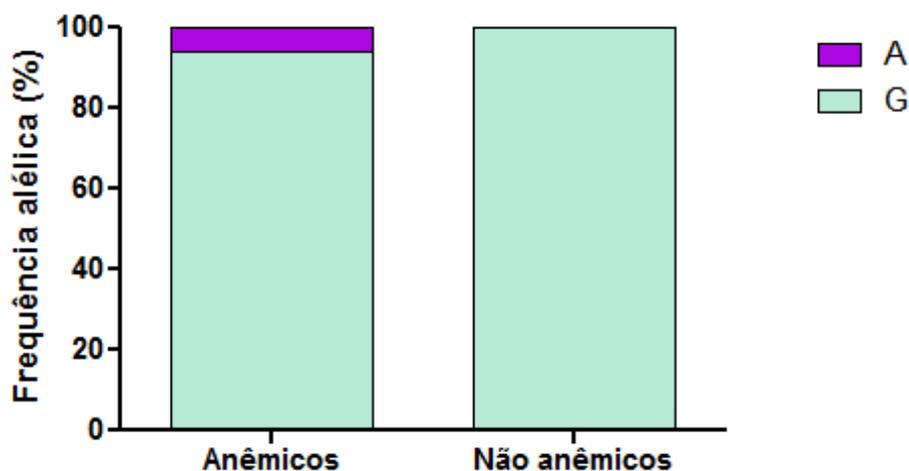
O indivíduo 1 possui genótipo heterozigoto GA (não é possível visualizar a banda de 29 pb). Os indivíduos 2, 3 e 4 possuem genótipo homozigoto normal GG. Gel de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata. PM= padrão de peso molecular.

As análises desse polimorfismo demonstraram que no grupo dos anêmicos (n=20), dezenove indivíduos (95%) apresentaram genótipo homozigoto não mutado (G/G) e 1 indivíduo (5%) heterozigoto (G/A), enquanto que no grupo dos não anêmicos todos os indivíduos genotipados (n=17) foram homozigotos não mutados (G/G). Não houve diferença estatística entre esses grupos (Figura 16).



**Figura 16: Frequência do polimorfismo HFE C282Y entre indivíduos anêmicos e não anêmicos.**  
 Teste exato de Fisher  $P=1,00$ .

A frequência alélica do polimorfismo HFE C282Y nos indivíduos anêmicos foi de 95% para o alelo normal G e 5% para o alelo mutado A, enquanto que nos não anêmicos a frequência do alelo G foi de 100% (Figura 17).

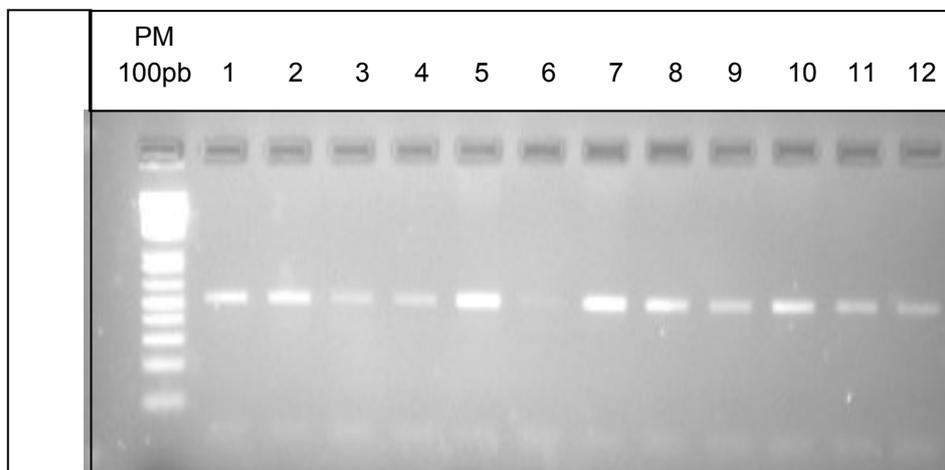


**Figura 17: Frequência alélica para o polimorfismo HFE C282Y entre indivíduos anêmicos e não anêmicos.** Teste exato de Fisher  $P=0,49$ .

Com relação à distribuição de gênero em função da genotipagem do polimorfismo HFE C282Y nos indivíduos anêmicos, o único indivíduo heterozigoto era do sexo masculino.

### 5.5 Análises dos polimorfismos C326Y/S no gene codificador da Ferroportina

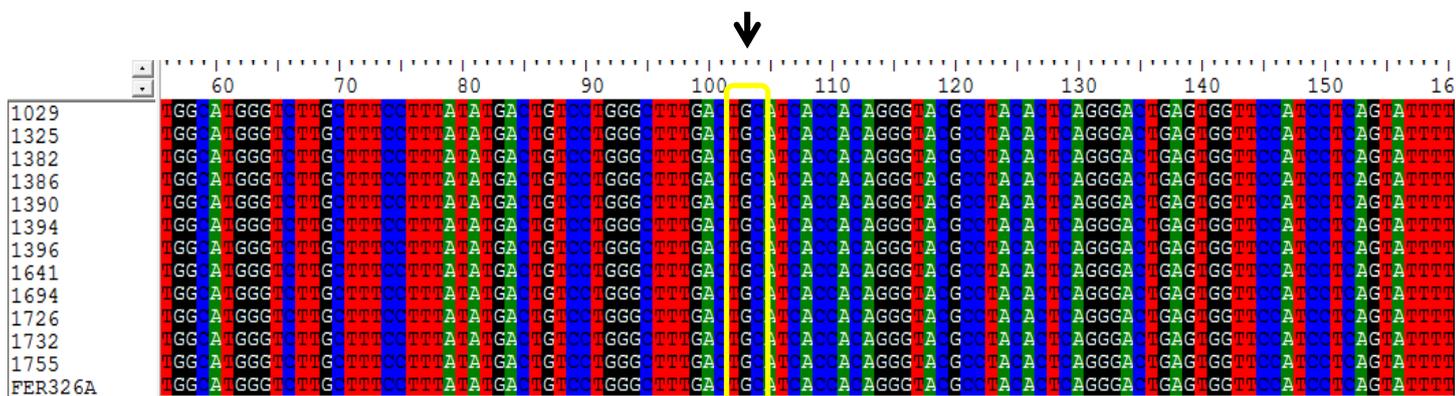
A PCR para o polimorfismo C326Y/S no gene da ferroportina foi padronizada com sucesso, como observado na Figura 18.



**Figura 18:** Gel da PCR para o alvo FPN C326Y/S para 12 pacientes. PM: Padrão de peso molecular 100pb.

### 5.5.1 Relação entre o polimorfismo FPN C326Y/S e as recaídas

Amostras de treze pacientes que apresentaram recaída foram genotipados para esse alvo, contudo nenhum dos indivíduos analisados apresentou as substituições C326Y/S (Figura 19).



**Figura 19:** Alinhamento do sequenciamento para os polimorfismos C326Y/S de 12 pacientes. Região do polimorfismo destacada pelo contorno amarelo e o nucleotídeo referente ao polimorfismo (G) indicado pela seta.

### 5.5.2 Relação do polimorfismo FPN C326Y/S e anemia

Dos quarenta e um indivíduos analisados nos grupos de anêmicos e não anêmicos, nenhum apresentou os polimorfismos C326Y/S.

## 6 DISCUSSÃO

A malária causada pelo *P. vivax* ainda é considerada uma das mais importantes causas de morbidade e mortalidade nas regiões tropicais do mundo, apesar de grandes esforços da Organização Mundial da Saúde com programas de eliminação. Um dos grandes desafios para a eliminação dessa doença é a existência de formas dormentes do parasito no fígado que são responsáveis pelas recaídas, uma vez que os mecanismos de dormência e ativação dos hipnozoítos ainda são desconhecidos (WELLS et al., 2010).

O ferro é um micronutriente essencial tanto para o hospedeiro vertebrado quanto para o agente patogênico, pois ambos requerem esse metal como um cofator ou como grupo prostético para enzimas que estão envolvidos em várias funções celulares básicas e vias metabólicas (SCHAIBLE & KAUFMANN, 2004; SPOTTISWOODE et al., 2014).

Estudos que relacionam o metabolismo do ferro com a malária têm se intensificado. Já foi demonstrado *in vitro* que a desferrioxamina, um quelante do ferro, inibe o crescimento de *P. falciparum* nas hemácias (SCHEIBEL & ADLER, 1982) e também que a remoção de ferro disponível causa um bloqueio no ciclo esquizogônico (RAVENTOS-SUAREZ et al., 1982). Em camundongos, níveis elevados de ferro favorecem o desenvolvimento do *P. yoelii*, e a suplementação de ferro em culturas de hepatócitos aumenta o número de parasitos *in vitro* (GOMA et al., 1996). Por outro lado, a deficiência de ferro pode reduzir o crescimento do parasito, tanto em animais experimentais (*P. yoelii*) como em hepatócitos em cultura (*P. falciparum*) (GOMA et al., 1995; LOYEVSKY et al., 1999).

O ferro é também um elemento essencial para a produção de células sanguíneas e para o transporte de oxigênio no sangue realizado através da hemoglobina. A distribuição desse metal no corpo humano está representada por 1800 mg em RBCs circulantes, 1000 mg no fígado, 300 mg na medula óssea, 600 mg em macrófagos esplênicos e 300 mg nos músculos (WINTER et al., 2014). Sendo assim, a hemoglobina representa 45% do ferro no corpo e o fígado 25%.

No presente trabalho, a hipótese investigada foi que as moléculas envolvidas na homeostase do ferro poderiam ser utilizadas como biomarcadores de recaída e/ou de anemia através da análise de polimorfismos em genes reguladores dessa via. Sendo assim, o estudo foi dividido de acordo com os dois grandes grupos: (1) indivíduos com número variado de recaída e (2) indivíduos com e sem anemia infectados por *P. vivax*.

No grupo de recaída não foram observadas diferenças na parasitemia, idade, número de episódios anteriores de malária e os dias de sintomatologia em relação aos níveis de hemoglobina. Isso sugere que tais variáveis não influenciaram de forma significativa no número de recaídas que os indivíduos estudados apresentaram. Os indivíduos pertencentes a esses grupos foram então analisados quanto à presença de polimorfismos em duas moléculas envolvidas na homeostase do ferro, a hemocromatose (HFE) e ferroportina (FPN), com o objetivo de se identificar um biomarcador de recaída na infecção por *P. vivax*. Polimorfismos no gene HFE (Hemocromatose) são responsáveis por maiores concentrações de ferro no organismo, sendo que o H63D é considerado o mais comum, enquanto que o C282Y é responsável pelas formas mais graves da Hemocromatose, podendo acarretar em cirrose, diabetes, insuficiência cardíaca e arritmias, artrite, carcinoma hepatocelular, e expectativa de vida reduzida (EDWARDS et al. 1980). Para a maioria das amostras deste estudo não foi possível realizar a genotipagem do polimorfismo HFE C282Y, devido a quantidade restrita de DNA disponível. Para o polimorfismo HFE H63D foi encontrada uma frequência significativamente maior do alelo mutado 187C>G no grupo de indivíduos que tiveram múltiplas recaídas.

Existem até o momento dois trabalhos que associam a malária com polimorfismos no gene HFE. Em um deles, Torres e colaboradores (2008) estudaram as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos HFE C282Y e H63D em 400 pacientes com malária e o mesmo número de doadores de sangue da região da Amazônia brasileira. Nessa região, as frequências dos alelos mutados 845 G>A e 187C>G dos polimorfismos C282Y e H63D, respectivamente, foram de 0,3% e 7%. Nos pacientes com malária e portadores do alelo mutado, não foi encontrada associação entre polimorfismos do gene HFE e os sinais clínicos da malária. Dessa forma, os autores sugerem que esta doença pode coexistir com as

alterações nos níveis de ferro causados pela presença de polimorfismos do gene HFE. Contudo, seriam necessários estudos com um maior número de indivíduos para confirmar esses achados.

O outro trabalho referente à malária e o HFE é um estudo recente de malária cerebral experimental (ECM) em que foram analisadas as alterações em camundongos infectados por *P. berghei*, causadas pela restrição de ferro na dieta ou pela sobrecarga de ferro devido ao polimorfismo HFE H67D, correspondente ao H63D em humanos. Os resultados demonstraram que camundongos homocigotos para o polimorfismo H67D e que receberam ração enriquecida com ferro eram mais resistentes aos efeitos da ECM, ao contrário do esperado, uma vez que o ferro contribui para o desenvolvimento do parasito (LEITNER et al., 2015).

Com relação ao estudo desse polimorfismo HFE H63D no presente trabalho, entre as trinta e cinco amostras genotipadas no grupo de recaídas o polimorfismo H63D foi detectado apenas em heterocigose. No grupo de anemia, para esse mesmo polimorfismo, das setenta e uma amostras genotipadas, treze se apresentaram em heterocigose e apenas um indivíduo não anêmico apresentou genótipo homocigoto mutado. Apesar de a Hemocromatose Hereditária ser considerada um distúrbio com herança autossômica recessiva (SMITH et al., 1997), já foi descrito que indivíduos heterocigotos, assim como os homocigotos para a mutação H63D apresentaram concentrações séricas de ferro e saturações de transferrina significativamente maiores em comparação com indivíduos sem essa mutação no gene HFE (BURT et al., 1998; BEUTLER et al., 2000). Além disso, foi relatado também um aumento da concentração de ferro no fígado de indivíduos heterocigotos tanto para HFE H63D quanto pra HFE 282 (EDWARDS et al., 2000).

No que se refere às dosagens bioquímicas realizadas, os indivíduos do grupo de múltiplas recaídas apresentaram maiores índices de ferro quando comparados com o grupo de uma recaída. Entretanto essa diferença não foi estatisticamente significativa, possivelmente devido ao pequeno número de amostras analisadas. Para dar suporte aos achados de maior frequência de heterocigotos para o polimorfismo H63D no grupo de múltiplas recaídas é

importante a realização de dosagens bioquímicas dos elementos citados anteriormente em um maior número de pacientes.

Além disso, não foi encontrada associação dos valores de hemoglobina e hematócrito quando foram comparados indivíduos homocigotos normais com os heterocigotos para o polimorfismo HFE H63D no grupo de recaída. Uma possível explicação para isso seria que a expressão fenotípica dos heterocigotos para o polimorfismo HFE H63D pode estar associada a fatores de risco adicionais, tais como etnia caucasiana, histórico familiar da presença do polimorfismo, uso de suplementos dietéticos (OLYNYK et al., 1999) e a dieta alimentar (LEITNER et al., 2015), os quais não foram investigados nesse trabalho.

Além dos fatores de riscos citados anteriormente, é sabido também que as manifestações clínicas da Hemocromatose ocorrem principalmente nos homens (JACKSON et al., 2001). Apesar disso, não foi encontrada relação entre os polimorfismos estudados no gene HFE e o gênero dos indivíduos analisados tanto no grupo de recaída quanto no grupo de anemia.

Em resumo, nossos resultados evidenciam que o polimorfismo HFE H63D pode ser o responsável pelo acúmulo de ferro nos indivíduos com múltiplas recaídas, o que poderia resultar na ativação dos hipnozoítos no fígado.

A anemia é considerada um dos principais sintomas da malária, sendo caracterizada por menores concentrações de ferro e baixos índices de hemoglobina e hematócrito. Nesse trabalho, indivíduos infectados por *P. vivax* foram divididos em dois grupos caracterizados pela presença e/ou ausência de anemia. Esses grupos foram bem definidos, apresentando diferenças significativas para os índices de hemoglobina e hematócrito. Os grupos também foram comparados quanto à parasitemia, número de episódios anteriores de malária, idade e dias de sintomatologia, e apenas os dois últimos mostraram-se diferentes estatisticamente, com mais dias de sintomatologia e maior idade em indivíduos anêmicos quando comparados com os não anêmicos. O fato de os pacientes com anemia terem demorado mais dias para procurar um serviço de saúde pode ter contribuído para o quadro anêmico, uma vez que, se não tratada precocemente, a doença pode progredir para as formas mais graves (TRAMPUZ et al., 2003). Com relação à idade, os trabalhos que abordam esse tema demonstram que o risco de

desenvolver anemia durante a infecção malárica diminui com o aumento da idade (REYBURN et. al., 2005; OWUSU-AGYEI et. al., 2002). No entanto esses estudos são realizados em crianças residentes de áreas endêmicas. Já o presente trabalho analisou apenas indivíduos maiores de quatorze anos e que não residem em áreas endêmicas para malária, e que por esse motivo podem não apresentar imunidade para essa doença. No que se refere às dosagens bioquímicas, o grupo dos anêmicos apresentou menor concentração de ferro e maior índice de hepcidina, resultado também observado por outros autores (CASALS-PASCUAL et al., 2002; MOUSAVI et al., 2015). Como a diferença observada não foi estatisticamente significativa, esses resultados precisam ser confirmados com um maior número de amostras.

Como os polimorfismos estudados estão relacionados com o acúmulo de ferro no organismo, eles também foram analisados no grupo de anemia. Com relação à genotipagem dos polimorfismos no gene HFE do grupo de anemia, não foi observada diferença significativa entre indivíduos anêmicos e não anêmicos tanto para o polimorfismo HFE H63D quanto para o HFE C282Y. Isso sugere que esses polimorfismos podem não influenciar no índice de hemoglobina e hematócrito dos indivíduos estudados, ou ainda que outros fatores que podem estar associados ao desenvolvimento de anemia na infecção por *P. vivax*, ao não serem considerados nas nossas análises podem ter interferido nos resultados apresentados. Portanto, é importante que esse estudo seja ampliado para considerar um número maior de pacientes e que contemple a análise de fatores adicionais associados à anemia.

Nos indivíduos analisados nesse trabalho, tanto do grupo de anemia quanto do grupo de recaída, não foram encontrados o polimorfismo C326Y/S no gene da ferroportina. Não foi possível realizar o sequenciamento de todas as amostras, provavelmente devido à baixa qualidade das mesmas, que foram coletadas há muito tempo e estão estocadas no banco de DNA do Laboratório de Malária. O número reduzido de amostras analisadas, associada à baixa frequência desses polimorfismos ( $<1/100$  ou  $<1/300$ ) (MAYR et al., 2010) podem ter influenciado nesse resultado. A ferroportina é a única proteína identificada até o momento com função de exportação de ferro em mamíferos (MCKIE et al., 2000). A ligação da ferroportina à hepcidina - principal hormônio responsável pela homeostase do ferro

- faz com que o ferro seja internalizado e degradado, e falhas nesse mecanismo podem levar à diminuição ou ao acúmulo de ferro no organismo (DOMENICO et al. 2011).

A relação entre malária, anemia e o ferro é bastante complexa: o baixo nível de ferro pode proteger contra a infecção por malária, mas a infecção malárica por sua vez, está associada com a anemia, a nível individual e populacional. Nos últimos anos, alguns pesquisadores estão tentando entender essa relação. Um dos principais estudos randomizados em larga escala foi realizado na ilha de Pemba, Tanzânia, que constatou que a suplementação de ferro em crianças está associada com um aumento da mortalidade relacionada à malária (SAZAWAL et al., 2006).

No Kenya foi realizado um estudo de coorte com crianças entre 8 meses e 8 anos e foi verificado menor incidência de malária clínica em crianças com deficiência de ferro (NYAKERIGA et al., 2004). Além disso, outro estudo recente e de grande relevância também no Kenya mostrou que a malária assintomática e episódios de febre causados pela malária aumentam significativamente os níveis de hepcidina em uma população de crianças da região. Uma vez que a absorção de ferro é prejudicada pela hepcidina, esses dados sugerem que a malária assintomática e febril contribui para os altos índices de deficiência de ferro observados em crianças africanas (ATKINSON et al., 2015).

O Brasil possui um Programa Nacional de Suplementação de Ferro, instituído pela Portaria nº 730 de 13 de maio de 2005, que é uma das estratégias da Política Nacional de Alimentação e Nutrição para o combate da deficiência de ferro (DAB, BRASIL 2012). Entretanto, não há nenhum estudo que correlacione a suplementação de ferro no país com a malária. O Manual Operacional “Estratégia de Fortificação da alimentação infantil com micronutrientes (vitaminas e minerais) em pó – NutriSUS” (2014) e o “Caderno de Orientações NutriSUS (2015)” ambos disponibilizados pelo Ministério da Saúde e pelo Ministério da Educação ressaltam a necessidade de acompanhamento individualizado pelas equipes de saúde dos casos de doenças relacionadas ao acúmulo de ferro, como doença falciforme, talassemia e Hemocromatose. Esse acompanhamento faz-se realmente necessário uma vez que a Hemocromatose pode estar relacionada com múltiplas recaídas da malária, e a suplementação de ferro agravaria ainda mais este quadro.

Em áreas em que a transmissão da malária é sazonal, como no Brasil, Spottiswoode e colaboradores (2014) sugerem que a suplementação de ferro ocorra fora da temporada de ocorrência de malária, sendo essa uma estratégia para reduzir a susceptibilidade à infecção. Contudo, quando se trata de recaídas, a suplementação de ferro em indivíduos que já possuem a pré-disposição de acumular esse metal no organismo e que possuam a forma latente do parasito no fígado, pode contribuir para novas recidivas da doença, além de possibilitar a manutenção da transmissão do *P. vivax*.

Dessa forma, programas de suplementação de ferro são de extrema importância, principalmente para o desenvolvimento infantil. No entanto, devem ser realizados com cautela, uma vez que podem acarretar ou intensificar outros problemas de saúde pública, como a malária.

## 7 CONCLUSÃO

- Não foi constatada relação entre os polimorfismos HFE H63D e C282Y e o nível de hemoglobina e hematócrito dos indivíduos anêmicos e não anêmicos estudados;
- Não foram detectados os polimorfismos C326Y e C326S no gene da ferroportina através do sequenciamento de DNA tanto no grupo de recaída quanto no grupo de anemia;
- Foi encontrada uma maior frequência do polimorfismo HFE H63D associado ao acúmulo de ferro no grupo com maior número de recaídas, assim esse polimorfismo pode ser considerado um biomarcador de predisposição para múltiplas recaídas;
- Para corroborar esses achados, novos estudos envolvendo outros polimorfismos e a associação deles com os níveis de ferro, ferritina e hepcidina com um número maior de amostras seriam interessantes, incluindo indivíduos controle que não apresentaram recaídas.
- Esses resultados podem contribuir para o desenvolvimento de programas de eliminação da malária, como projetos de monitoramento em indivíduos que possuam predisposição ao acúmulo de ferro, principalmente nas áreas endêmica para essa doença.

## REFERÊNCIAS

ANDREWS, N. C. The iron transporter DMT1. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31:10, p. 991-994. 1999.

ARAÚJO, Flávia Carolina Faustino de. Caracterização molecular de *Plasmodium vivax* isolados de infecções primárias e recaídas e a influência da homeostase do ferro na ativação dos hipnozoítos. Brito, Cristiana Ferreira Alves de . Belo Horizonte: s.n., 2014. 113 p. Tese (Doutorado Ciências na área de concentração Biologia Celular e Molecular)-Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Disponível em: [http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/T\\_68.pdf](http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/T_68.pdf) . Acesso em: 20/ 01/ 2016

ATKINSON, S.H. et al. Malaria and Age Variably but Critically Control Hepcidin Throughout Childhood in Kenya. *EBioMedicine*. 2: p. 1478–1486. 2015.

BANNISTER, L.; MITCHELL G. The ins, outs and roundabouts of malaria. *Trends Parasitology*. 19:209-213. 2003.

BATTLE, K. E. et al. Geographical variation in *Plasmodium vivax* relapse. *Malaria Journal*. 13:144. 2014.

BENNETT, J. W. Primaquine Failure and Cytochrome P-450 2D6 in *Plasmodium vivax* Malaria. *The New England Journal of Medicine*. 369:14. 2013.

BEUTLER, E. Mutation Analysis in Hereditary Hemochromatosis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 22:16, p. 187-194. 1996.

BEUTLER, E.; FELITTI, V.; GELBART, T. The effect of HFE genotypes on measurements of iron overload in patients attending a health appraisal clinic. *Annals of Internal Medicine*. 133, 329-337. 2000

BURKE, W.; IMPERATORE, G.; REYES, M. Iron deficiency and iron overload: effects of diet and genes. *Proceedings of the Nutrition Society*. 60, p. 73–80. 2001.

BURT, M. J. et al. The significance of haemochromatosis gene mutations in the general population: implications for screening. *Gut BMJ*. 43, p. 830-836. 1998.

CAMASCHELLA, C. Understanding iron homeostasis through genetic analysis of hemochromatosis and related disorders. *Blood*. Dec 1;106(12) p. 3710-7. 2005.

CANAVESI, E. et al. Heparin and HFE protein: Iron metabolism as a target for the anemia of chronic kidney disease. *World Journal of Nephrology*., 1:6, p. 166–176. 2012.

CARROLO, M. Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. *Nature Medicine*. 9, p.1363-9. 2003.

- CASALS-PASCUAL, C. et. al. Hcpidin demonstrates a biphasic association with anemia in acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Haematologica*. 97, 11, p.1695-1698. 2012
- COATNEY, R. *The Primate Malaras*. Washington, DC: US Government Printing Office. 1971.
- COSTA, F. T. M. et. al. On the pathogenesis of *Plasmodium vivax* malaria: Perspectives from the Brazilian field. *International Journal for Parasitology*. 42, p.1099–1105. 2012.
- COX-SINGH, J. et al. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis*. 15, 46(2), p: 165-71. 2008.
- DAB -Departamento de atenção básica. 2012. Disponível em: <<http://dab.saude.gov.br/portaldab/pnsf.php>>. Acesso 20 jan. 2016.
- DOMENICO, I.; WARD, D. M. V.; KAPLAN, J. Hcpidin and Ferroportin: The New Players in Iron Metabolism. *Semin Liver Dis*. 2011.
- EDWARDS, C. Q. et al. Homozygosity for hemochromatosis: clinical manifestations. *Ann Intern Med*. 93, p. 519–25. 1980.
- EDWARDS, C. Q. The iron phenotype of hemochromatosis heterozygotes. In: *Hemochromatosis: Genetics, Pathophysiology, Diagnosis and Treatment* Cambridge University Press. p. 411-418. 2000.
- GALINSKI, M. R. et al. A Reticulocyte-Binding Protein Complex of *Plasmodium vivax* Merozoites. *Cell*. 69, p. 1213-1226. 1992.
- GENTON, B. I. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Medicine*. 5:6, e127. 2008.
- GOMA, J. et al. Effects of iron deficiency on the hepatic development of *Plasmodium yoelii*. *Parasite*. 2, p. 351–356. 1995.
- GOMA, J. et al. Iron overload increases hepatic development of *Plasmodium yoelii* in mice. *Parasitology*. 112, p. 165–168. 1996.
- GUEIRARD, P. et al. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *PNAS*. 107, 43: p. 18640–18645 .2010.
- HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp*. 41, p. 95-98. 1999.
- HANSON, E. H.; IMPERATORE, G., BURKE, W. HFE Gene and Hereditary Hemochromatosis: A HuGE Review. *American Journal of Epidemiology*. Volume 154, Issue 3Pp. 193-206

- HEENEY, M. M.; FINBERG, K.E. Iron-Refractory Iron Deficiency Anemia (IRIDA). *Hematology Oncology Clinics*. 28, p. 637–652. 2014.
- HOWES, R. E. et al. G6PD Deficiency Prevalence and Estimates of Affected Populations in Malaria Endemic Countries: A Geostatistical Model-Based Map. *PLOS Medicine*. 9 :11. 2012.
- HUANG, X. A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. *Genomics*. 14, p.18–25. 1992.
- HULDEN, L.; HULDEN, L. Activation of the hypnozoite: a part of *Plasmodium vivax* life cycle and survival. *Malaria Journal*. 10:90. 2011.
- HULDÉN, L.; HULDÉN, L.; HELIÖVAARA, K. Natural relapses in *vivax* malaria induced by *Anopheles* mosquitoes. *Malaria Journal*. Abr. 22;7:64. 2008.
- JACKSON, H. A.; et al. HFE mutations, iron deficiency and overload in 10 500 blood donors. *British Journal of Haematology*. 114, p. 474-484. 2001.
- JAIN, V.; et al. Plasma levels of angiopoietin-1 and -2 predict cerebral malaria outcome in Central India. *Malaria Journal* 10:383. 2011.
- JANSSEN, M. C. H.; SWINKELS, D. W. Hereditary haemochromatosis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 23 p. 171–183. 2009.
- KASVOSVE, I. Effect of ferroportin polymorphism on iron homeostasis and infection. *Clinical Chimica Acta*. 416, p. 20–25. 2013.
- KROTOSKI, W. A. et al. Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 31:6 p.1291-3. 1982.
- LEITNER, D. F. et al. The HFE genotype and a formulated diet controlling for iron status attenuate experimental cerebral malaria in mice. *International Journal for Parasitology*. 45, p. 797–808. 2015.
- LEVINE, H. D. Clinical aspects of malaria. In *Internal: Medicine in World War II Infectious diseases*. Office of the Surgeon General, Department of the Army; p. 479-92. 1963.
- LOVEGROVE, F. E. Serum Angiopoietin-1 and -2 levels discriminate cerebral malaria from uncomplicated malaria and predict clinical outcome in african children. *PLoS One*. 4:3. 2009
- LOYEVSKY, M. et al. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii*: effect of the iron chelation prodrug dexrazoxane on in vitro cultures. *Exp Parasitol*. 91: p. 105–114. 1999.
- LYNAS, C. A Cheaper and More Rapid Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Method for the Detection of the HLA-H Gene Mutations Occurring in Hereditary Hemochromatosis. *Blood*. 90: 4235. 1997.

MATHEMA, V. B., BANGCHANG, K. N. A brief review on biomarkers and proteomic approach for malaria research. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. p. 253-262. 2015.

MAYR, R. et al. Ferroportin disease: A systematic meta-analysis of clinical and molecular findings. *Journal of Hepatology*. 53, p. 941–949. 2010.

MCKIE, A. T. et al. A Novel Duodenal Iron-Regulated Transporter, IREG1, Implicated in the Basolateral Transfer of Iron to the Circulation. *Molecular cell*. 5:2. 2000.

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

MÉNARD, R. et al. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. *Nature Review Microbiology*. 11:10, p. 701–12. 2013.

MENDONÇA, V. R. R. et al. Associations between hepcidin and immune response in individuals with hyperbilirubinaemia and severe malaria due to *Plasmodium vivax* infection. *Malaria Journal*. 14:407 2015.

Ministério da Saúde e Ministério da Educação. Caderno de Orientações NutriSUS. Brasil. 2015.

Ministério da Saúde e Ministério da Educação. Manual Operacional “Estratégia de Fortificação da alimentação infantil com micronutrientes (vitaminas e minerais) em pó – NutriSUS”. Brasil. 2014

MOTA M. M. et al. Migration of *Plasmodium* through cells before infection. *Science*. 291, p.141-144. 2001.

MOUSAVI, S. A. et al. Relationship of Baseline Hemoglobin Level with Serum Ferritin, Postphlebotomy Hemoglobin Changes, and Phlebotomy Requirements among HFE C282Y Homozygotes. *BioMed Research International*. 2015.

MS/SVS: Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, Brasília, 2015.

MUELLER, I. et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infectious Diseases*. 9:9 p.555–66. 2009.

NAING C. et al. Is *Plasmodium vivax* Malaria a Severe Malaria?: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 8:8. 2014.

NAYLOR, S. Mathema, Kesara Na-Bangchang. Future drugs Expert Review of Molecular Diagnostics. 3: 5, p. 525-529. 2003.

NYAKERIGA, A. M. et al. Iron Deficiency and Malaria among Children Living on the Coast of Kenya. *The Journal of Infectious Diseases*. 190, p. 439–47. 2004.

OLYNYK, J. K. et al. A population-based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene. *The New England Journal of Medicine*. 2. 1999.

OWUSU-AGYEI, S. et al. Characteristics of severe anemia and its association with malaria in young children of the Kassena-Nankana District of northern Ghana. 67,4, p.371-7. 2002

PANTOPOULOS, K. et al. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry*. 51:29, pag. 5705–5724. 2012

PORTUGAL, S. et al. Host-mediated regulation of superinfection in malaria. *Nature Medicine*. Jun;17: 6, p. 732-7. 2011

PORTUGAL, S.; DRAKESMITH, H.; MOTA, M. M. Superinfection in malaria: *Plasmodium* shows its iron will. *Embo Dec* 1;12: 12, p.1233-42. 2011.

RAVENTOS-SUAREZ, C.; POLLACK, S.; NAGEL, R.L. *Plasmodium falciparum*: inhibition of in vitro growth by desferrioxamine. *Am J Trop Med Hyg* 31, p. 919–922. 1982.

REYBURN, H. et al. Association of Transmission Intensity and Age With Clinical Manifestations and Case Fatality of Severe *Plasmodium falciparum* Malaria. *Journal of the American Medical Association*. 293, 12. 2005.

SAZAWAL, S. et al. Effects of routine prophylactic supplementation with iron and folic acid on admission to hospital and mortality in preschool children in a high malaria transmission setting: community-based, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet*. 367, p. 133–43. 2006.

SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. E. Iron and microbial infection. *Nature reviews microbiology*. 2:950. 2004.

SCHEIBEL, L. W.; ADLER, A. Antimalarial activity of selected aromatic chelators. III. 8-Hydroxyquinolines (oxines) substituted in positions 5 and 7, and oxines annelated in position 5: 6 by an aromatic ring. *Mol Pharmacol*. 22, p. 140–144. 1982.

SHAM, R. L. et al. Hereditary hemochromatosis due to resistance to hepcidin: high hepcidin concentrations in a family with C326S ferroportin mutation. *Blood*. 114, p. 493-4. 2009.

SHANKS, G. D.; WHITE, N. J. The activation of *vivax* malaria hypnozoites by infectious diseases. *The Lancet Infectious Diseases*. 13: p. 900–906. 2013.

SIVEP- MALÁRIA. Número de registro de casos de malária. 2015. Disponível em: <http://dw.saude.gov.br/> Acesso 20 jan. 2016

SMITH, B. M. et al. Prevalence of Hereditary Hemochromatosis in a Massachusetts Corporation: Is Celtic Origin a Risk Factor? *Hepatology*. 1997.

SPOTTISWOODE, N.; DUFFY, P. E. DRAKESMITH, H. Iron, anemia and hepcidin in malaria. *Front Pharmacol. Mai*, 30, 5:125. 2014.

STURM, A. et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 313, p. 1287–90. 2006.

SUTHERST, R. W. Global Change and Human Vulnerability to Vector-Borne Diseases. *Clinical microbiology reviews*. 17:1, p. 136–173. 2004.

THOMPSON, J.; HIGGINS, D.; GIBSON, T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 22: 46734680. 1994.

TJITRA, E. et al. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Medicine*. 5:6, e128. 2008.

TORRES, F. R. et al. Frequency of the HFE C282Y and H63D polymorphisms in Brazilian malaria patients and blood donors from the Amazon region. *Genetics and Molecular Research*. 7:1, p. 60-64. 2008.

TRAMPUZ, A. et. al. Clinical review: Severe malaria. *Critical Care BioMed Central*. 7, p. 315-323. 2003.

TRAN, T. N. et al. Detection of a *Plasmodium vivax* erythrocyte binding protein by flow cytometry. *Journaul of the International Society for Advancement of Cytometry*. 63A:1, p. 59–66. 2005.

WEISS, G. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1790, p. 682–693. 2009.

WELLS, T. N.; BURROWS, J. N.; BAIRD, J. K. Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. *Trends Parasitol*. 26: 3p. 145-51. 2010.

WHITE, M. T. et al. Modelling the contribution of the hypnozoite reservoir to *Plasmodium vivax* transmission. *eLife*. 3:e04692. 2014.

WHO World Health Organization. Guidelines for the Use of Iron Supplements to Prevent and Treat Iron Deficiency Anemia. 1998

WHO World Health Organization. Iron deficiency anemia: assessment, prevention and control. A guide for programme managers. WHO/NDH/01.3. Geneve: WHO/NHD, 2001.

WHO World Health Organization. Weekly epidemiological record. No. 45: 90. 2015.

WINTER, W. E.; BAZYDLO, L. A. L.; HARRIS, N. S. The Molecular Biology of Human Iron Metabolism. *Lab Medicine Spring*. 45: 2. 2014.

ZOGHI, S. I. et al. Survey for asymptomatic malaria cases in low transmission settings of Iran under elimination programme. *Malaria Journal*. 11, 126. 2012.