

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

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Plasmodium vivax* ISOLADOS DE
INFECÇÕES PRIMÁRIAS E RECAÍDAS E A INFLUÊNCIA DA HOMEOSTASE DO
FERRO NA ATIVAÇÃO DOS HIPNOZOÍTOS**

por

Flávia Carolina Faustino de Araújo

**Belo Horizonte
Dezembro/2014**

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

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Plasmodium vivax* ISOLADOS DE
INFECÇÕES PRIMÁRIAS E RECAÍDAS E A INFLUÊNCIA DA HOMEOSTASE DO
FERRO NA ATIVAÇÃO DOS HIPNOZOÍTOS**

por

Flávia Carolina Faustino de Araújo

**Tese apresentada com vistas à
obtenção do Título de Doutora em
Ciências na área de concentração de
Biologia Celular e Molecular.**

**Orientação: Dra. Cristiana F. A. de Brito
Co-Orientação: Luzia Helena Carvalho**

**Belo Horizonte
Dezembro/2014**

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

A658c Araújo, Flávia Carolina Faustino de.
2014

Caracterização molecular de *Plasmodium vivax* isolados de infecções primárias e recaídas e a influência da homeostase do ferro na ativação dos hipnozoítos / Flávia Carolina Faustino de Araújo. – Belo Horizonte, 2014.

XX, 93 f: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 104 – 113

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor(a) 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/complicações 2. Malária/Prevenção & Controle 3. *Plasmodium vivax*/genética I. Título. II. Brito, Cristiana F. A. (Orientação). III. Carvalho, Luzia Helena (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 2

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

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Plasmodium vivax* ISOLADOS DE
INFECÇÕES PRIMÁRIAS E RECAÍDAS E A INFLUÊNCIA DA HOMEOSTASE DO
FERRO NA ATIVAÇÃO DOS HIPNOZOÍTOS**

por

Flávia Carolina Faustino de Araújo

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito (Presidente)

Prof. Dra. Érika Martins Braga

Prof Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva

Dr. Wuelton Marcelo Monteiro

Prof. Dra. Silvane Maria Fonseca Murta

Tese defendida e aprovada em: 18/12/2014.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, sob a orientação da Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito com suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Rede malária Pronex – CNPq, MS-DECIT, Fapemat, Faperj e Centro de Pesquisas René Rachou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, autor da minha vida, por cuidar de mim, guiar meus passos no caminho que Ele tem planejado. A Ele toda honra e toda glória!

Aos meus pais pelas orações, apoio, carinho e por estarem sempre ao meu alcance quando estendo os meus braços à procura de um abraço. São meus exemplos e mestres na arte de saber viver, como diz Thayná Thoni: É com lições da vida que aprendemos a viver, mas talvez haja um modo mais fácil, sempre que puder ouça conselhos, eles são muito valiosos.

Ao meu irmão Cristiano pela cumplicidade e apoio, à minha amada irmã Ana Paula por todo incentivo, por acreditar que sou capaz e me ensinar que a meta de todo profissional é ser o melhor do mundo naquilo que faz. Obrigada Ana por sonhar junto comigo. Ao Paulo, pelo carinho, pelos conselhos sábios e inspiradores que fazem dele uma pessoa admirável.

Ao Héber, meu companheiro e cúmplice que tem sido meu porto seguro, amigo e eterno namorado. Agradeço todo o carinho, apoio e paciência. Agradeço a Deus por te colocar em minha vida.

À minha orientadora Dra. Cristiana quero agradecer principalmente por toda a paciência direcionada a mim e pelos ensinamentos que me fizeram crescer não somente como profissional, mas também como pessoa.

À Dra. Luzia pelo apoio, discussões, críticas e sugestões que me fizeram crescer e ver a ciência com olhar diferenciado, sua dedicação ao trabalho e à ciência são exemplos de um profissional que ama o que faz.

Ao Dr. Cór Fontes e ao Antonio Rezende por suas valiosas contribuições para o trabalho, além da Alice Sabatino que sempre me socorreu e sempre esteve pronta a me ajudar com sua fascinante competência.

Aos meus queridos amigos que mesmo distantes estão sempre presentes na minha vida, agradeço a vocês: Brenda Resende, Juliana Passos, Letícia Torres, Marcos Celírio, Izabela Ibraim e outros tantos que ocupam lugar especial em meu coração. Agradeço a vocês por muitas vezes compreenderem minha ausência e me oferecerem apoio incondicional em todos os momentos.

Quero agradecer também a uma pessoa muito especial que foi um grande exemplo e inspiração para que eu escolhesse o caminho da ciência e pesquisa, foi ela quem deu o “empurrãozinho” motivador, o seu entusiasmo e paixão pelo seu trabalho são contagiantes a todos que tem o privilégio de conhecê-la. Obrigada Michelyne.

À todos os membros e colegas que pertencem ou pertenceram ao laboratório de malária, quero agradecer por me acolherem com carinho e fazem o ambiente de trabalho ser agradável onde acabei encontrando, nessa caminhada de 8 anos, bons amigos.

Agradeço aos funcionários do CPqRR, à coordenação do curso de pós-graduação e aos professores pelo ensinamento e contribuição para o meu crescimento profissional bem como pela construção de um bom ambiente de trabalho. À plataforma PDTIS e à Dra. Taynãna César Simões do Serviço de Apoio em métodos quantitativos do Centro de Pesquisas René Rachou pela significativa contribuição neste trabalho.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

A todos, enfim, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, expresso meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE TABELAS.....	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XV
RESUMO.....	XVII
ABSTRACT	XIX
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Panorama atual da malária	21
1.1.1 Situação epidemiológica mundial.....	21
1.1.2 Situação epidemiológica da malária no Brasil	22
1.2 Ciclo biológico do <i>Plasmodium vivax</i>	25
1.3 Tratamento e controle da malária.....	28
1.4 Recaídas.....	29
1.4.1 Prováveis mecanismos de latência e ativação dos hipnozoítos	32
1.4.1.1 A homeostase do ferro e sua importância.....	34
1.4.1.2 A influência da homeostasia do ferro no níveis de hemoglobina durante a infecção malárica	38
1.5 Caracterização molecular dos parasitos nas infecções por <i>P. vivax</i>	39
1.5.1 Microsatélites.....	40
1.5.2 Proteínas de superfície do merozoíto.....	41
1.5.2.1 Proteína de superfície do merozoíto 1 (MSP1)	41
2 JUSTIFICATIVA	43
3 OBJETIVOS	46
3.1 Objetivo Geral.....	46

3.2 Objetivos específicos.....	46
4 METODOLOGIA.....	47
4.1 Descrição das amostras.....	47
4.2 Extração do DNA.....	49
4.3 Amplificação e genotipagem dos marcadores moleculares.....	49
4.4 Clonagem dos fragmentos.....	51
4.5 Análise dos resultados da genotipagem	53
4.6 Amplificação e sequenciamento do gene <i>hamp</i>	53
4.7 Análise dos dados de sequenciamento.....	54
4.8 Dosagem sorológica de hepcidina	55
4.9 Dosagem de ferro	56
4.10 Dosagem de ferritina	57
4.11 Antígenos recombinantes (PvDBP, PvMSP119 , PvAMA1)	58
4.12 Ensaio Imuno Enzimático (ELISA)	59
4.13 Análises estatísticas	59
5 RESULTADOS	61
5.1 Descrição das amostras.....	61
5.2 Variabilidade genética dos isolados.....	63
5.3 Identificação de alelos raros.....	67
5.4 Amplificação e sequenciamento do gene <i>hamp</i>	71
5.5 Dosagens de hepcidina.....	73
5.6 Dosagens de ferro.....	74
5.7 Dosagem de ferritina	75
5.8 Análise das variáveis do estudo	76
5.9 Análise da resposta imune humoral contra os principais antígenos de <i>P. vivax</i> nas amostras pareadas de infecções primárias e recaídas	79
5.10 Associações entre as variáveis	81

6 DISCUSSÃO	83
6.1 Caracterização molecular de isolados de <i>P. vivax</i> em amostras pareadas	83
6.2 A influência da homeostase do ferro no desenvolvimento das recaídas.....	85
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
7.1 ANEXO 1- Carta de Aprovação n.º 08/2010 - CEP/CPqRR	93
7.2 ANEXO 2 – Artigo	94
8 REFERÊNCIAS	104

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Risco de transmissão de malária em diferentes regiões do mundo	22
Figura 2. Número de casos registrados de Malária no Brasil no período de 1961-2013	23
Figura 3. Mapa do Brasil indicando as áreas de risco para malária de acordo com os diferentes níveis de incidência parasitária anual – IPA	24
Figura 4. Ciclo biológico do plasmódio no hospedeiro humano e no vetor <i>Anopheles</i>	25
Figura 5. Formas hepáticas do ciclo biológico do <i>Plasmodium vivax</i>	26
Figura 6. Caracterização de perfil de recaída quanto ao número e intervalo de tempo de ocorrência das recaídas nas diferentes regiões do mapa mundial.	31
Figura 7. Cepas de <i>Plasmodium vivax</i> e o intervalo de tempo entre a infecção primária e o episódio de recaída descrito em meses	32
Figura 8. Ciclo de absorção e distribuição de ferro no organismo	36
Figura 9. Sequência peptídica do hormônio Hecpidina codificada pelo gene <i>hamp</i>	37
Figura 10. Grupos de amostras e os objetivos de sua utilização na pesquisa.	48
Figura 11. Intervalo entre as infecções agudas de malária (primárias e recaídas)	62
Figura 12. Número de alelos por marcador considerando apenas o alelo predominante (preto) ou todos os alelos detectados (cinza)	64
Figura 13. Genotipagem de 10 marcadores moleculares e comparação dos haplótipos parasitários em amostras pareadas de infecções primárias e recaídas de 30 indivíduos	65
Figura 14. Flutuação do alelo predominante em quatro pacientes durante os diferentes episódios de infecção.	66
Figura 15. Perfil genotípico de quatro pacientes em uma análise dos alelos encontrados em diferentes marcadores antes e após a realização da clonagem	67
Figura 16. Genotipagem de duas amostras de infecções primárias de diferentes pacientes com perfis distintos para o mesmo marcador MSP1bloco2	69

Figura 17. Comparação das infecções múltiplas detectadas usando diferentes critérios.	70
Figura 18. Identificação de infecções múltiplas por marcadores moleculares e suas combinações	71
Figura 19. Produto amplificado do gene <i>hamp</i>	72
Figura 20. Alinhamento da sequencia proteica codificada pelo gene <i>hamp</i> em pacientes de área sem transmissão (A) e pacientes de área endêmica (B) comparados à sequencia depositada no GenBank (HAMPB).	73
Figura 21. Teste de Wilcoxon para dados pareados e teste de correlação de Spearman para dosagem de hepcidina.	74
Figura 22. Comparação dos níveis de ferro nos diferentes momentos de infecção.	75
Figura 23. Níveis de ferritina nos diferentes grupos.	76
Figura 24. Distribuição de dados referentes à idade dos pacientes na curva-padrão	77
Figura 25. Comparação da parasitemia nos diferentes momentos de infecção	78
Figura 26. Níveis de hemoglobina nos diferentes momentos da infecção	79
Figura 27. Índice de reatividade à Duffy Binding Protein em amostras pareadas	80
Figura 28. Índice de reatividade ao Antígeno de Membrana Apical em amostras pareadas.	80
Figura 29. Índice de reatividade à Proteína de Superfície do Merozoíto em amostras pareadas	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Caracterização dos marcadores moleculares	50
Tabela 2 Iniciadores e condições de amplificação	51
Tabela 3 Estatísticas sumárias de cada variável nos diferentes momentos de infecção	77
Tabela 4 Associações entre variáveis nos grupos de infecções primárias e recaídas avaliadas no teste de Correlação de Spearman	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AM	Amazonas
AMA	Antígeno de Membrana Apical
AMOVA	Análise Molecular de Variância
bp	Pares de Bases
DARC	Antígeno Duffy/Receptor para Quimiocinas
DBP	Proteína de ligação ao antígeno Duffy
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
G6PD	Glicose 6-fosfato Desidrogenase
GST	Glutathione S-Transferase
He	Heterozigosidade Esperada
IFN- γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IPA	Incidência Parasitária Anual
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
KDa	QuiloDaltons
LB	Luria-Bertani
MS	Ministério da Saúde
MSP	Proteína de Superfície do Merozoíto
MT	Mato Grosso
MTP-1	Matriptase 1
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP	Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismos por restrição de fragmentos
PEG	Polietilenoglicol
Pv-AMA	Antígeno de Membrana Apical do Plasmodium vivax
Pv-DBP	Duffy Binding Protein de Plasmodium vivax
PV-MSP	Proteína de Superfície do Merozoíto do Plasmodium vivax

rFU	Unidade Arbitrária de Fluorescência
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de Base Única)
SVS	Serviço de Vigilância em Saúde
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
WHO	World Health Organization

RESUMO

As hipóteses deste trabalho são a de que parasitos que causam recaídas são geneticamente homólogos aos parasitos das infecções primárias e que infecções múltiplas podem estar presentes nas infecções primárias e recaídas; Além dessas, outra hipótese é de que a hepcidina esteja envolvida no desenvolvimento de recaídas. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi analisar a variabilidade genética de isolados de amostras pareadas infecção primária/recaídas de um mesmo paciente e investigar a associação entre a homeostase do ferro, particularmente da hepcidina e sua associação com a ativação dos hipnozoítos além de avaliar a resposta imunológica contra os principais antígenos do *P. vivax*. Sessenta e cinco amostras pareadas de 30 pacientes foram genotipadas utilizando 10 marcadores moleculares através de eletroforese capilar. Além disso, a presença de infecção múltipla nos pacientes foi confirmada através da clonagem dos fragmentos amplificados dos microsatélites e genotipagem a partir de diferentes colônias. Na análise baseada nos alelos predominantes foi demonstrado que os parasitos da recaída são principalmente heterólogos em relação à infecção primária e que geralmente ocorre uma flutuação entre os alelos predominantes nos diferentes episódios do indivíduo. Entretanto, o número de alelos por marcador foi limitado e geralmente os alelos foram idênticos nos diferentes episódios da doença num mesmo paciente. A principal contribuição deste estudo foi demonstrar uma alta taxa de infecções múltiplas tanto das infecções primárias como nas recaídas, sendo que infecções múltiplas puderam ser identificadas com um mínimo de Cinco marcadores. Foram feitas dosagens bioquímicas de ferro, ferritina, níveis de hepcidina e análise de outras variáveis como hemoglobina e parasitemia dos pacientes. Houve diferença significativa entre os grupos somente na análise de níveis de hemoglobina sendo maior nas recaídas. Acredita-se que o número de amostras foi um limitante das análises estatísticas. O gene codificador da hepcidina foi sequenciado nas amostras de área sem transmissão e de área endêmica. Não foram encontrado polimorfismos nesse gene mostrando seu alto grau de conservação. Não foi observada diferença nos níveis de resposta imunológica contra os antígenos do *P. vivax* nas infecções primárias e recaídas. As infecções por este parasito são observadas com alta diversidade genética e com a presença de múltiplas variantes em uma mesma

infecção, sendo esta, primária ou recaída da doença, variantes que podem sofrer variações em sua frequência durante a evolução da doença. Com estes resultados espera-se contribuir para o esclarecimento dos aspectos relacionados à diversidade genética dos parasitos e dos mecanismos que influenciam o desenvolvimento das recaídas do *P. vivax*, que poderão ajudar no seu prognóstico, direcionamento o tratamento e auxiliando no controle da doença.

ABSTRACT

The hypothesis of this study was that the parasites causing relapses are genetically homologous to the parasites from primary infections and multiple clone infections might be present in both primary and relapses of vivax malaria. Moreover the hypothesis here was that hepcidin is involved in the development of relapses. In this context, the aim of the study was to analyze the genetic variability of isolates of paired samples primary / relapse infection in the same patient and to investigate the association between iron homeostasis, particularly hepcidin and its association with hypnozoites activation and to assess the immune response against the main antigens of *P. vivax*. Sixty-five paired samples of 30 patients were genotyped using 10 molecular markers by capillary electrophoresis. Moreover, the presence of multiple infections was confirmed by cloning of microsatellites amplicons and genotyping of different colonies. We showed that relapse parasites are mainly heterologous compared to the ones of the primary infection and that a change in the alleles composition occurs in the different episodes of the individual. However, the number of alleles per marker was usually limited and the alleles were identical in the different episodes of the disease in the same patient. The main contribution of this study was to demonstrate a high rate of multiple infections both in primary infection and relapse, demonstrated for the first time, and multiple infections could be identified with a minimum of five markers. Biochemical levels of iron, ferritin, hepcidin levels and analysis of other variables such as hemoglobin and parasitemia of patients were performed. There was a significant difference between the groups only in the analysis of hemoglobin levels being higher in relapse. It is believed that the number of samples was a restriction to statistical analysis. The gene encoding hepcidin was sequenced in samples from area without transmission and endemic area. No polymorphisms were found in this gene showing the high conservation. There was no difference in levels of immune response against the antigens of *P. vivax* infections in primary and relapse. Infections with this parasite are observed with high genetic diversity and the presence of multiple variants in the same infection, which is primary or recurrence of disease, variants that may vary in their frequency during the course of the disease. With these results we hope to contribute to the clarification of aspects of the genetic diversity of parasites in relapses of *P. vivax*,

which may help in the prognostic treatment guidance and ultimately help the control of the disease.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Panorama atual da malária

1.1.1 Situação epidemiológica mundial

A malária é considerada um grave problema de saúde pública no mundo e uma das mais importantes doenças infecciosas nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, ocorrendo em mais de 104 países e territórios totalizando cerca de 3,4 bilhões de indivíduos sob o risco de contrair a doença. Ela é de difícil controle devido a vários fatores, como a resistência dos parasitos às drogas e dos vetores aos inseticidas.

Dentre os casos de malária registrados anualmente, 80% estão concentrados no continente africano e os outros 20% estão distribuídos na América Central e do Sul, sudeste asiático e ilhas da Oceania (WHO, 2013). Aproximadamente 207 milhões de casos e 627.000 mortes foram registradas em 2012 em decorrência da malária. Em torno de 90% das mortes ocorreram no continente africano, ocasionadas principalmente pelas formas graves da doença como a malária cerebral e a anemia grave sendo a maioria das mortes em crianças com menos de 5 anos de idade (WHO, 2013).

Nas Américas, cerca de 104 milhões de pessoas estão sob o risco de contrair a doença concentrando, no Brasil, cerca de 40 milhões desses indivíduos. Em relação aos casos notificados, 60% são do Brasil, os outros 40% estão distribuídos entre os países da América do Sul e Central (Figura 1).

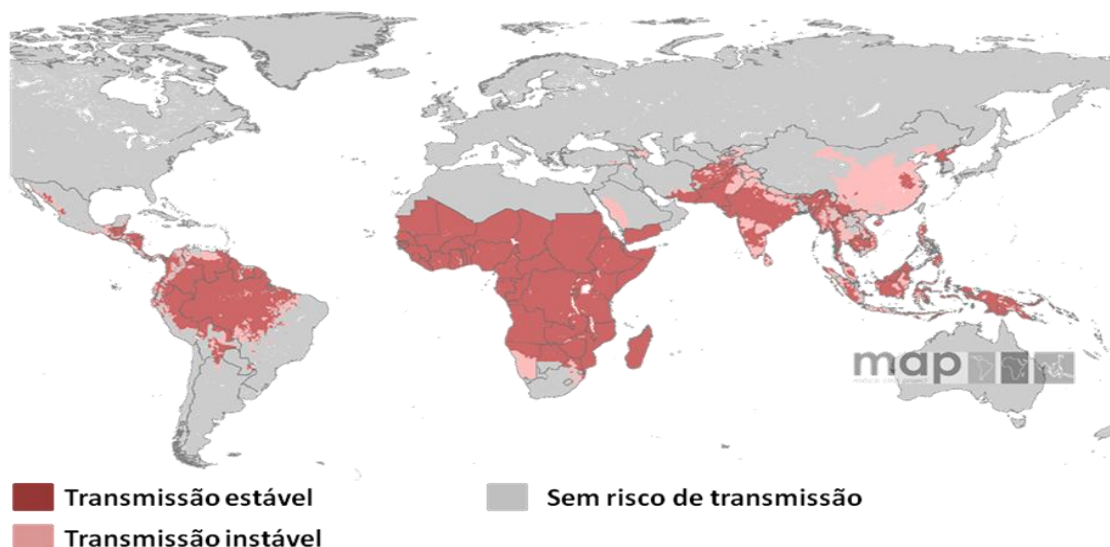


Figura 1. Risco de transmissão de malária em diferentes regiões do mundo (Guerra et al., 2010).

1.1.2 Situação epidemiológica da malária no Brasil

Os casos de malária no Brasil começaram a aumentar a partir de 1980 em função da ocupação desordenada da região amazônica. “O desenvolvimento intensificado da Amazônia nas décadas de 70 e 80 acelerou o processo migratório, atraindo moradores de outras regiões do país, graças aos projetos de colonização e expansão da fronteira agrícola, construção de estradas e hidrelétricas, projetos agropecuários, extração de madeira e mineração. Nesta região, as precárias condições socioeconômicas da população migrante determinaram a rápida expansão da doença (FUNASA/MS, 2001).” (Figura 2).

Nos períodos de 1996 a 1997 e 2001 a 2004 observou-se um declínio importante no número de casos resultante de amplo processo de mobilização de forças multissetoriais priorizando as ações de vigilância, prevenção e o controle da malária, que ficou mais evidente a partir do ano 2006 com declínio constante do número de casos da doença (Figura 2) (SVS/MS, 2010a).

A doença é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. No Brasil, são encontradas três espécies que comumente parasitam o homem: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium malariae* (SVS/MS, 2008). Até a década de 80, houve relativa equivalência entre as espécies parasitárias (*P. vivax* e *P. falciparum*) inclusive com um período de inversão parasitária de 1983 a 1988 com predominância de *P. falciparum*. A partir de então, nota-se um distanciamento no

número de registros causados pelas duas espécies, que culminou com a predominância do *P. vivax* (SVS/MS, 2010a). A transmissão de *P. falciparum*, espécie responsável pelas formas mais graves e letais da doença, tem apresentado redução importante nos últimos anos (SVS/MS, 2010a) (figura 2).

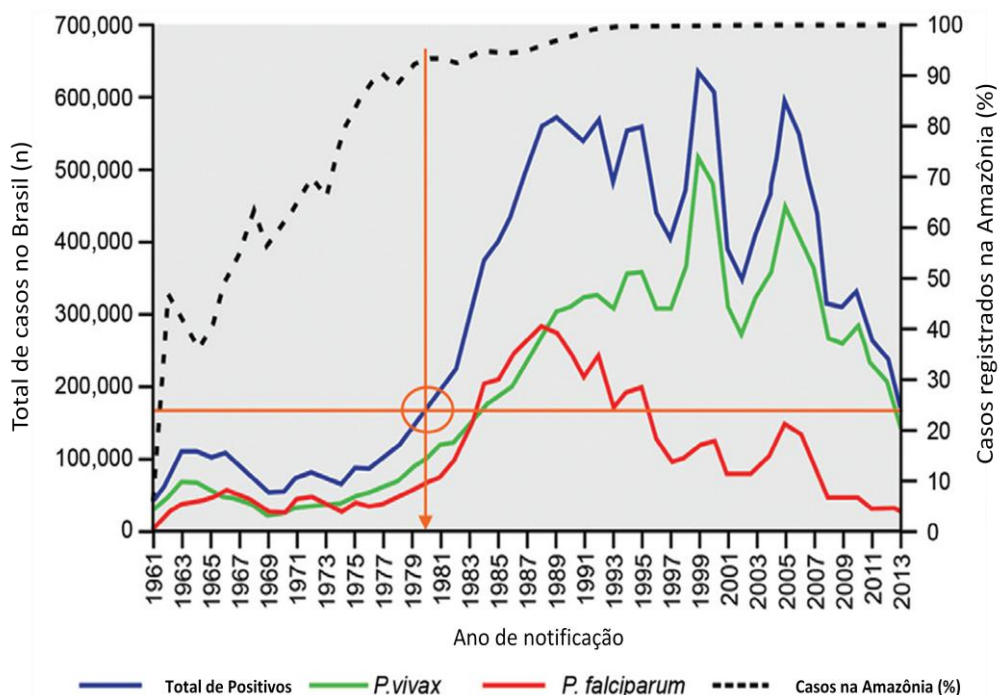


Figura 2. Número de casos registrados de Malária no Brasil no período de 1961-2013. Número total de casos de malária (azul), número de casos causados pelo *Plasmodium falciparum* (vermelho) e número de casos causados pelo *P. vivax* (amarelo) e porcentagem de casos brasileiros que ocorreram na região amazônica (linha pontilhada). Figura modificada de Pina-Costa *et al* (2014).

Em 2007, em apenas três estados, Amazonas, Rondônia e Pará foram registrados cerca de 350 mil casos, o que correspondeu a 78% das ocorrências naquele ano. Contudo, nesse mesmo ano, a maioria dos estados da Amazônia Legal apresentou redução na frequência de casos em relação ao ano anterior, exceto Amazonas e Mato Grosso (SVS/MS, 2008). Estes dados demonstram um caráter focal da doença cujos municípios de maior transmissão variam de ano para ano como resultado de diferentes fatores, tais como intensidade de chuvas, medidas de controle, entre outros (Figura 3).

Foram investidos novos esforços pelo Ministério da Saúde brasileiro na tentativa de controlar o número de casos, mortes e internações por malária no país, os investimentos se baseiam no diagnóstico rápido e tratamento dos infectados,

distribuição e utilização de mosquiteiros impregnados com inseticidas e monitoramento da resistência dos vetores aos inseticidas.

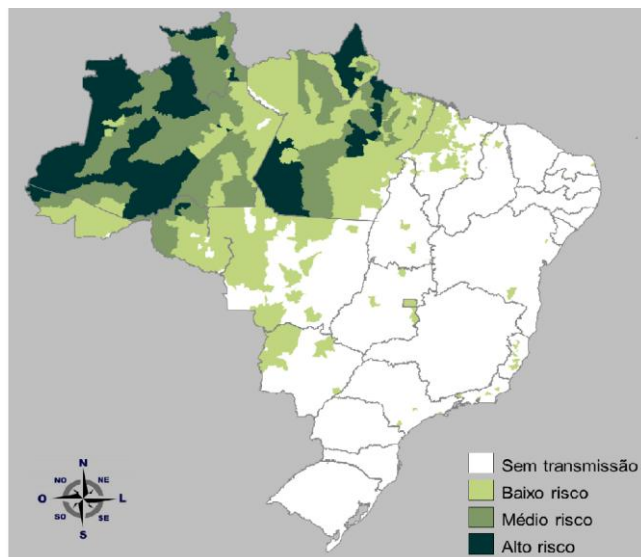


Figura 3. Mapa do Brasil indicando as áreas de risco para malária de acordo com os diferentes níveis de incidência parasitária anual – IPA. São demonstradas as regiões sem transmissão (branco), regiões de baixo risco de transmissão (verde claro), médio risco de transmissão (verde) e alto risco de transmissão (verde escuro) (SVS/MS, 2012).

O Brasil vem registrando notificações de cerca de 300 mil casos anuais de malária sendo 242.758 casos em 2012, dos quais 85% foram causados pelo *P. vivax* (WHO, 2013). Aproximadamente 99,8% desses casos se concentram na região da Amazônia Legal, composta pelos estados Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Maranhão, Mato Grosso e Tocantins (Barbosa, 2011).

Além da dificuldade de controle da malária pela resistência dos vetores aos inseticidas e do desenvolvimento de resistência a drogas pelos parasitos, uma dificuldade adicional no controle da malária causada pelo *P. vivax* é a sua capacidade de manter formas latentes do parasito no fígado, os hipnozoítos, que permanecem dormentes por intervalos variáveis de tempo e podem levar a uma reagudização da doença com elevação da parasitemia do indivíduo, restabelecendo o conjunto de sintomas e aumentando os riscos de transmissão (Mueller *et al.*, 2009).

1.2 Ciclo biológico do *Plasmodium vivax*

A Malária é transmitida através da picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*, que depositam esporozoítos, acumulados nas glândulas salivares deste inseto vetor, na derme do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. Em sua maioria, estes esporozoítos são degradados nos linfonodos para onde são drenados, porém outra parte invade os vasos sanguíneos e seguem para o fígado (Amino *et al.*, 2006). Neste órgão, se diferenciam em trofozoítos e se multiplicam formando esquizontes repletos de formas infectantes eritrocitárias, os merozoítos que serão liberados gradativamente na corrente sanguínea em vesículas denominadas merossomos (Sturm *et al.*, 2006) (figura 4).

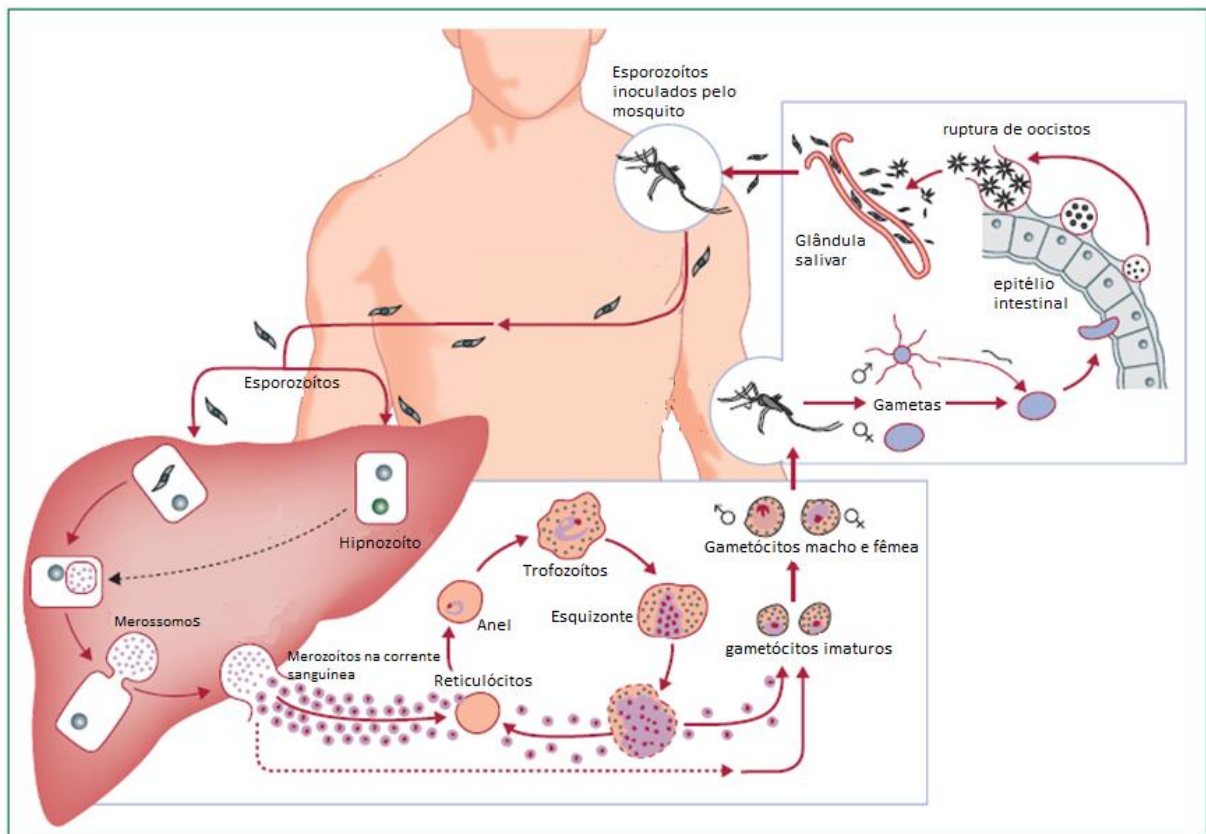


Figura 4. Ciclo biológico do plasmódio no hospedeiro humano e no vetor *Anopheles*. Figura modificada de Muller *et al* (2009).

Plasmodium vivax tem uma característica adicional e importante no seu desenvolvimento exoeritrocítico. Alguns esporozoítos tem a capacidade de se diferenciarem em formas parasitárias que permanecem latentes no fígado por

intervalos variáveis de tempo, denominados hipnozoítos e, podem em determinado momento ser ativados. Eles se desenvolvem formando os esquizontes contendo merozoítos em seu interior que serão liberados na corrente sanguínea levando ao reaparecimento da parasitemia e reagudização da doença, fenômeno conhecido como recaída (figura 5) (Krotoski, 1985).

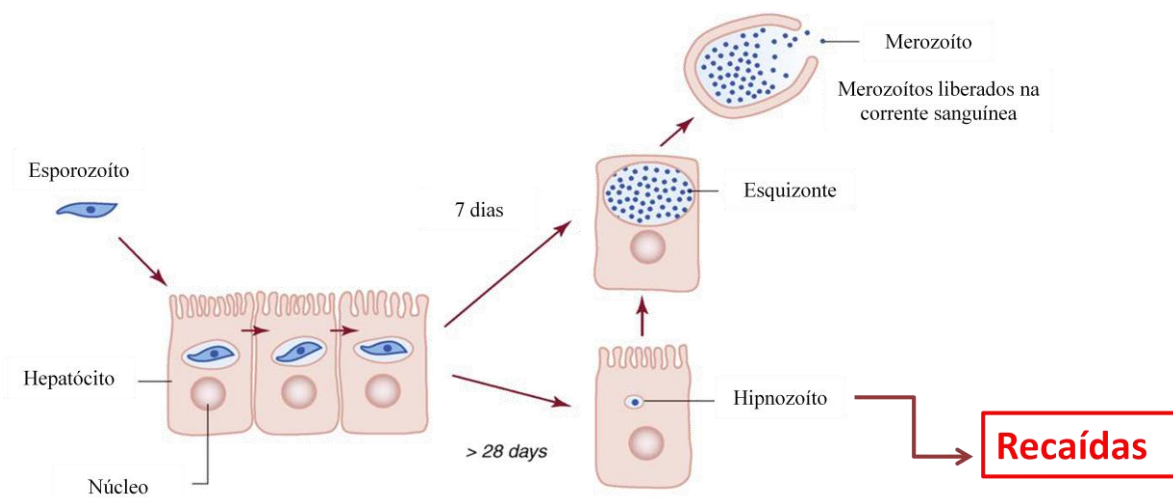


Figura 5. Formas hepáticas do ciclo biológico do *Plasmodium vivax*. O hospedeiro humano é infectado por esporozoítos durante o repasto sanguíneo do mosquito. No fígado, após 7 dias, os esporozoítos podem se multiplicar e formar esquizontes exo-eritrocíticos contendo, em seu interior vários merozoítos. O *P. vivax* consegue manter formas dormentes chamadas hipnozoítos por um tempo superior a 28 dias e estes podem ser ativados causando as recaídas. Figura modificada de Wells; Burrows e Baird (2010).

Os merozoítos tem a capacidade de infectar células vermelhas do sangue, se multiplicarem promover o rompimento desta célula liberando novos merozoítos. O processo de invasão dos eritrócitos pelos merozoítos necessita do reconhecimento e adesão reversível do merozoíto à superfície do eritrócito onde várias proteínas são participantes dessa interação como a proteína de superfície do merozoíto 1 (MSP-1) e o antígeno apical de membrana (AMA-1). Estudos têm mostrado que a resposta de anticorpos aos domínios variáveis de PvMSP1 em indivíduos continuamente expostos são desenvolvida após várias infecções e os anticorpos IgG específicos aos domínios variáveis da PvMSP1 mostraram associação com a proteção clínica da doença (Nogueira *et al.*, 2006). No Brasil, a proteína AMA-1 apresentou-se altamente imunogênica em indivíduos de áreas endêmicas durante infecções naturais (Rodrigues *et al.*, 2005; Moraes *et al.*, 2006), sendo os níveis de anticorpos

aumentados em função da exposição à malária (Morais *et al.*, 2006). Além dessas, nas infecções pelo *Plasmodium vivax* é utilizada uma via principal de invasão dos eritrócitos baseada na interação irreversível de uma proteína do parasito, a Duffy Binding Protein (DBP) com o seu receptor na superfície dos eritrócitos, o Duffy Antigen/receptor for Chemokines (DARC) (Miller *et al.*, 1988). Estudos realizados em regiões de alta endemicidade demonstram a existência de anticorpos anti-PvDBP (Fraser *et al.*, 1997; Michon *et al.*, 2000; King *et al.*, 2008). Além desses, estudo realizado em áreas de média e baixa endemicidade observaram a presença desses anticorpos em indivíduos residentes na Amazônia e que parte desses anticorpos era capazes de bloquear a interação entre o ligante e o receptor DBP-DARC (Cerávolo *et al.*, 2005; Cerávolo *et al.*, 2008).

Após invasão, os merozoítos se multiplicam pelo processo de esquizogonia formando os esquizontes que promovem a ruptura dos eritrócitos para liberação de novos merozoítos (Coatney *et al.*, 1971). A ruptura dos eritrócitos está associada ao aparecimento dos sintomas característicos da doença, como febre, calafrios e anemia (Barnwell & Galinski, 1998) decorrente da destruição de eritrócitos infectados e não infectados e de uma resposta inflamatória exacerbada contra o parasito. Estudos mostram que para cada eritrócito infectado destruído, outros 32 não infectados são removidos da corrente sanguínea. Entretanto, o paroxismo febril e a anemia acontecem principalmente em consequência da liberação de citocinas inflamatórias, tais como IL-6, IL-1, TNF- α e IFN- γ (Anstey *et al.*, 2009), caracterizando a anemia malárica como uma anemia inflamatória.

Alguns merozoítos também podem se diferenciar em formas sexuais do parasito, os microgametócitos e macrogametócitos, que ao serem ingeridas pelo mosquito vetor, durante o repasto sanguíneo, se transformam em gametas masculinos e femininos, respectivamente. No interior do intestino médio do mosquito, esses gametas se fundem e formam o zigoto (Barnwell & Galinski, 1998). Em seguida, o zigoto se transforma em oocineto e este, quando chega à lâmina basal do intestino do mosquito se diferencia em oocisto. Após sucessivas divisões mitóticas e diferenciação celular, são produzidos milhares de esporozoítos a partir dos oocistos (figura 4). Os esporozoítos caem na hemolinfa e se acumulam nas glândulas salivares do mosquito, fechando o ciclo biológico do parasito ao serem inoculados num novo hospedeiro no repasto sanguíneo (Sinden, 2002).

1.3 Tratamento e controle da malária

O controle da malária no Brasil se está concentrado em três ações básicas: diagnóstico rápido através de exame de gota espessa, tratamento quimioterápico dos indivíduos positivos e redução do contato com os mosquitos vetores utilizando-se mosquiteiros impregnados com inseticidas e, em alguns casos a borrifação de inseticidas. Assim, o tratamento da doença visa interromper o ciclo evolutivo do parasito em pontos chave (SVS/MS, 2010b):

O tratamento adequado tanto previne a ocorrência de casos graves e, conseqüentemente, a morte por malária, como elimina fontes de infecção para os mosquitos, contribuindo para a redução da transmissão da doença (FUNASA/MS, 2001). Nos casos de infecções por *P. vivax* são utilizadas duas principais drogas para o tratamento dos pacientes, a Cloroquina e a Primaquina.

A Cloroquina é uma 4-aminoquilonina com rápida atividade esquizotóxica sanguínea para todas as espécies e gametocitocida para *P. vivax* e *P. malariae*, também tem ação antipirética e anti-inflamatória e atua na digestão de produtos da hemoglobina, porém, não tem ação contra formas hepáticas (FUNASA/MS, 2001). O único tratamento atualmente utilizado contra as formas teciduais do *P. vivax* é a primaquina, uma 8-aminoquinolina que inibe a respiração mitocondrial do parasito. Ela é altamente ativa contra gametócitos de todas as espécies de malária humana e contra hipnozoítos de *P. vivax* (FUNASA/MS, 2001), porém apresenta índices elevados de toxicidade.

O tratamento de pacientes infectados com *P. vivax* com primaquina recomendado pela OMS dura 14 dias, por causa de sua baixa meia-vida, na dose de 0,25 mg/Kg associada a uma droga esquizotóxica e gametocitocida no caso, a Cloroquina, por três dias em uma dose total de 25 mg de base/Kg. Entretanto, no Brasil, para facilitar a adesão do paciente ao tratamento é recomendado o uso da primaquina por apenas 7 dias com uma dose de 0,5 mg/kg. Uma falha do tratamento (recrudescência) é caracterizada pelo aparecimento de parasitemia até o dia 28 após o início do tratamento (FUNASA/MS, 2001). No entanto, alguns autores têm questionado a eficácia desse regime de tratamento, e acredita-se que uma menor eficácia possa contribuir para o aumento da ocorrência de episódios de recaída e a possibilidade de seleção de cepas resistentes à primaquina (Pukrittayakamee *et al.*,

2010; Baird, 2009). Gestantes, crianças menores de 6 meses e indivíduos que possuem deficiência da enzima Glicose 6-fostato Desidrogenase (G6PD) com malária pelo *P. vivax* ou *P. ovale* devem receber apenas cloroquina para o seu tratamento, uma vez que a primaquina é contraindicada nessas situações pelo alto risco de hemólise (SVS/MS, 2010b).

Em geral, falhas terapêuticas na malária vivax podem ser causadas por fatores relacionados ao paciente (adesão, gravidade, genética, peso), ao parasito (resistência, virulência, carga) e às drogas (qualidade, regime) (Wells; Burrows; Baird, 2010), porém não há relatos na literatura de resistência do parasito à primaquina, resistência esta definida como a capacidade do parasito de sobreviver e se multiplicar na presença de concentrações de fármaco que normalmente destruiriam os parasitos ou preveniriam sua multiplicação (WHO, 2010).

O reaparecimento da parasitemia após o tratamento pode ter três diferentes origens: recrudesência, reinfecção ou recaída. A recrudesência é resultante de parasitos assexuais sanguíneos que sobreviveram ao tratamento (falha terapêutica). A reinfecção é originada de uma nova inoculação de esporozoítos pelo mosquito vetor. E, por último, a verdadeira recaída que se caracteriza pela ativação dos hipnozoítos no fígado (Figura 5) (White, 2011).

A grande dificuldade no estudo de resistência às drogas pelo *P. vivax*, além da ausência de cultivo contínuo, é a possibilidade de ocorrência de episódios de recaída que complicam o reconhecimento de parasitos resistente à terapêutica, sendo necessária a inclusão de uma metodologia que auxilie na diferenciação entre recrudesência, recaída e nova infecção.

1.4 Recaídas

Pacientes infectados com *P. vivax* foram descritos desde tempos antigos apresentando recidivas da doença sem sinal de exposição a uma nova picada do mosquito infectado (Thayer, 1897; Bignami, 1898; Manson, 1901). As recaídas eram descritas como recorrências da doença com um período longo de latência (meses) em relação à infecção inicial.

Inicialmente acreditava-se que as recaídas eram resultantes de esporos depositados nas vísceras do hospedeiro e permaneciam inertes até serem liberados

como resultado de algum agravo cuja natureza era desconhecida (Thayer, 1897). Em 1913, Bignami propôs que as recaídas derivavam da persistência de pequeno número de parasitos no sangue. Embora essa teoria explicasse a recorrência tardia de infecções por *P. malariae*, não conseguia explicar vários fatores nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale* (White, 2011). Quase 70 anos depois, Krotoski identificou, em tecido hepático, formas uninucleares de cerca de 4µm de diâmetro em espécies causadoras de episódios de recaída como *P. vivax*, mas não em *P. falciparum* (Krotoski, 1980; 1982; 1985; Garnham, 1988), que ficariam dormentes (“hypnos”) até o momento de sua ativação, que resultaria no reaparecimento de parasitemia e sintomas clínicos (reagudização da doença). Tais formas foram chamadas de hipnozoítos, porém os mecanismos de ativação dos mesmos ainda são desconhecidos. Desde então o termo “Recaída” é usado para descrever recorrências originadas da ativação de formas latentes do parasito da malária vivax (hipnozoítos) no fígado. O termo “recrudescência” se refere a recorrências originadas de parasitos sanguíneos que persistiram após o tratamento recomendado e que conseguiram se multiplicar e desenvolver levando ao reaparecimento de parasitemia detectável (White, 2011).

Estudos de modelos experimentais da época demonstraram que o período de incubação e latência e o número de recidivas era determinado, além de outros fatores, pelo número de esporozoítos inoculados na infecção primária (para revisão ver White, 2011). Porém sabe-se que cepas de *Plasmodium vivax* de regiões temperadas tem perfil de recaída distinto de cepas de regiões tropicais e subtropicais (figura 6).

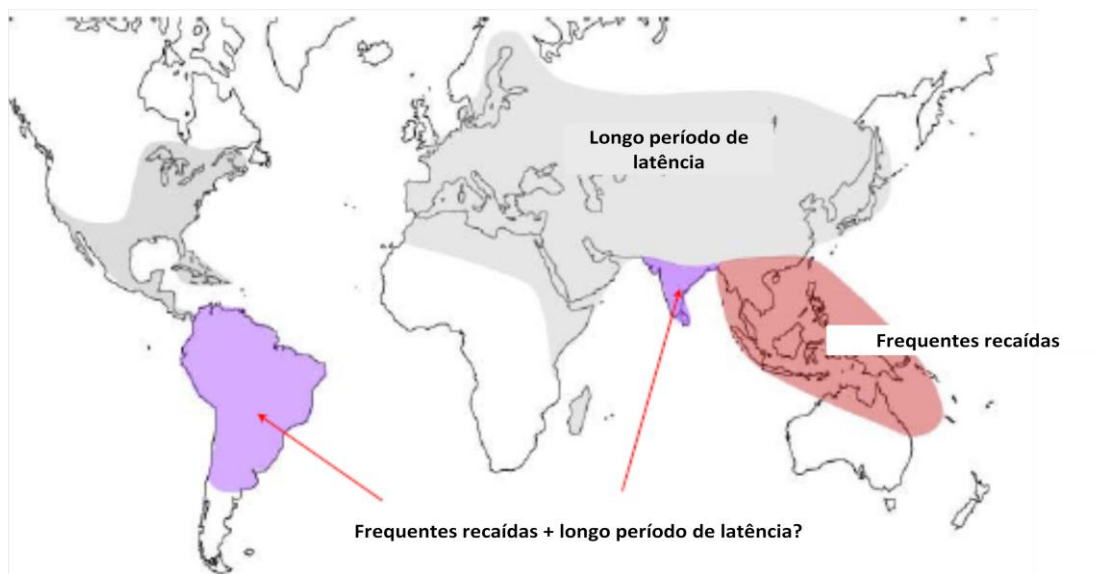


Figura 6. Caracterização de perfil de recaída quanto ao número e intervalo de tempo de ocorrência das recaídas nas diferentes regiões do mapa mundial. Figura modificada de White (2011).

Os períodos de incubação, o número de merozoítos por esquizonte sanguíneo, relações antigênicas, susceptibilidade às drogas, virulência e intervalo de recaídas diferem entre as cepas (White, 2011). De modo geral, as cepas de regiões tropicais e subtropicais são associadas com múltiplas recaídas que ocorrem com um curto intervalo de latência (3-5 semanas), enquanto as cepas de regiões temperadas são caracterizadas por poucos episódios de recaídas, com longos períodos de latência (5-10 meses) (Coatney *et al.*, 1950; Shute *et al.*, 1976). Entretanto, em algumas regiões como na Índia já foram relatados os dois perfis concomitantemente (Adak *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2006). Estes dados sugerem que existe uma variação na ativação dos hipnozoítos, que pode ser constituída por fatores do parasito e do hospedeiro (figura 7).

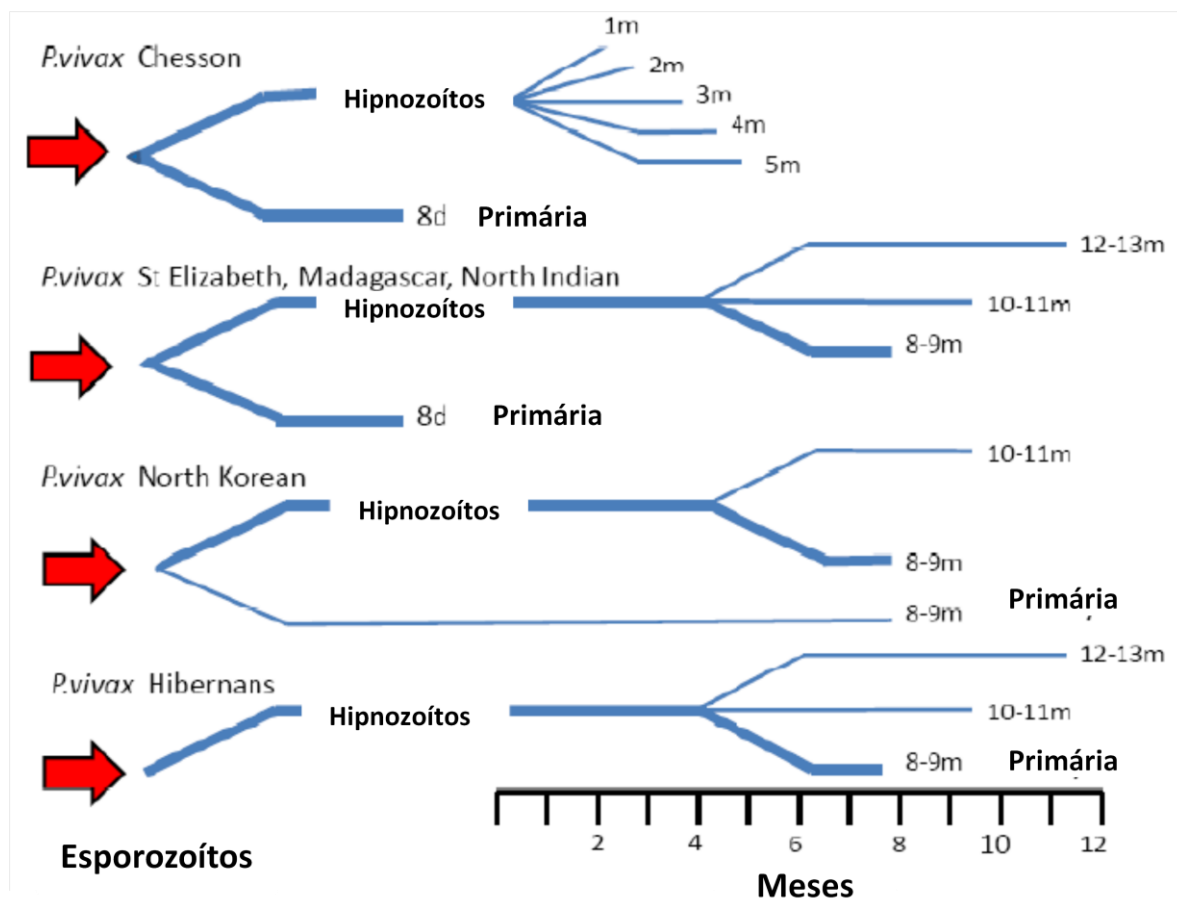


Figura 7. Cepas de *Plasmodium vivax* e o intervalo de tempo entre a infecção primária e o episódio de recaída descrito em meses. Figura modificada de White (2011).

1.4.1 Prováveis mecanismos de latência e ativação dos hipnozoítos

Várias são as hipóteses que tentam explicar os fatores responsáveis pela indução de latência e sinalização para ativação dos hipnozoítos. Alguns autores acreditam que infecções mistas (*P. vivax* e *P. falciparum*) aumentem a probabilidade de ocorrência de recaídas, pois, devido à inoculação simultânea das duas espécies, a tendência é que elas desenvolvam mecanismos de sobrevivência e conservação da espécie, no caso, o aumento do número de gametócitos (*P. falciparum*) e a formação de hipnozoítos (*P. vivax*) que podem permanecer latentes por longos períodos de tempo e por alguma razão serem ativados levando ao reaparecimento de parasitemia por *P. vivax* (Lin et al., 2011).

Outro estudo sugere que os responsáveis pela ativação dos hipnozoítos são os próprios mosquitos anofelinos. Acreditam que a picada de mosquitos não

infectados leva a uma sinalização para ativação dos hipnozoítos latentes, resultando em episódios de recaída (Huldén, 2008). Além disso, que a proporção de episódios de recaída aumenta em épocas de reprodução do vetor. Isso sugere que a dormência dos parasitos seja parte de uma coevolução do parasito com o mosquito, com o parasito causador da recaída coincidindo com a abundância sazonal do mosquito, propondo que este seja um mecanismo de sobrevivência do parasito e conservação da espécie (Wells; Burrows; Baird, 2010). Outros acreditam que outra enfermidade (que tenham respostas de citocinas associadas), um estímulo sistêmico, como a febre ou a inflamação, pode desencadear a ativação dos hipnozoítos (Levine, 1963; Mclester, 1945). Um desses casos é o próprio episódio de infecção aguda por malária. Supõe-se que cada episódio sintomático da doença é o estímulo ativador para a ocorrência da próxima recaída (White, 2011). Cada hipnozoíto geneticamente distinto seria programado para ser ativado em determinado momento, e que cada episódio de recaída seja causado por um clone latente mesmo que a infecção primária seja múltipla, resultando em uma ativação específica de uma única variante alélica (Chen, 2007). Os mecanismos de ativação dos hipnozoítos continuam desconhecidos e pouco se sabe sobre a biologia e diversidade genética dessa forma parasitária. Esses conhecimentos são importantes para o esclarecimento dos perfis de recaída, para o prognóstico da doença, padrões de resistência a drogas, controle da malária vivax e até mesmo no direcionamento da terapêutica da doença.

São escassos os estudos da literatura acerca de qual ou quais os fatores do hospedeiro poderiam estar relacionados com a ativação dos hipnozoítos. Em um estudo recente, utilizando modelo murino, foi demonstrada uma acentuada redução na parasitemia intra-hepática em reinfecções com altas parasitemias sanguíneas. Este mecanismo de controle de superinfecção parece ser independente da resposta imune inata ou adquirida e também não é decorrente do aumento de apoptose nos hepatócitos (Portugal *et al.*, 2011). Os dados sugerem um nutriente ou fator de crescimento do hospedeiro limitando a parasitemia hepática. Estudos anteriores tinham associado a disponibilidade de ferro à infecção tanto de eritrócitos como de hepatócitos. Assim a investigação de fatores associados ao metabolismo do ferro por esses autores identificaram a regulação da produção de hepcidina pelo hospedeiro como principal responsável pela homeostase do ferro cuja

disponibilidade é essencial para o completo desenvolvimento do parasito (Portugal *et al.*, 2011).

1.4.1.1 A homeostase do ferro e sua importância

Sabe-se que variações nos níveis de ferro de indivíduos susceptíveis à malária podem modular a frequência e a severidade dessa infecção (Spottiswoode; Duffy; Drakesmith, 2014). A disponibilidade de ferro é um fator limitante para o desenvolvimento parasitário visto que o uso de agentes quelantes de ferro como desferroxamina impedem o crescimento do parasito da malária (Raventos-Suarez, 1982; Fritsch *et al.*, 1985; Ferrer *et al.*, 2012; Pollack *et al.*, 1987). O ferro circulante no hospedeiro é obtido em menor parte, da dieta através da absorção do metal pelos enterócitos via uma proteína exportadora denominada como ferroportina, também conhecida como MTP1, e pela reciclagem do ferro proveniente da degradação do grupamento heme de hemácias danificadas ou senescentes, fagocitadas por macrófagos que será exportado para o meio extracelular pela ferroportina e transferrina (Spottiswoode; Duffy; Drakesmith, 2014). Dados da literatura sugerem que hemácias parasitadas de indivíduos com deficiência de ferro são fagocitadas mais facilmente comparadas às hemácias de indivíduos saudáveis (Matsuzaki-Moriya, 2011), porém se o ferro reciclado pelos macrófagos não for exportado para o meio extracelular ele fica acumulado no interior dessas células diminuindo ainda mais os níveis de ferro circulante.

A ferroportina é uma proteína altamente conservada envolvida na aquisição e transferência de ferro entre o meio intra e extracelular. Sua estrutura possui 571 aminoácidos, apresenta 20 domínios transmembrana e ambas as extremidades, -N e -C terminais, são citosólicas (Kasvosve, 2013). Ela é codificada pelo gene SLC40A1, localizado no cromossomo 2q32 e expressa em diversas células que exportam ferro iônico principalmente em enterócitos, macrófagos localizados no baço, fígado e medula óssea e também em hepatócitos (Donovan, 2005; Kasvove, 2013). Presente na membrana dessas células, a ferroportina atua diretamente no processo de homeostase do ferro e uma disfunção na proteína pode causar estados patológicos que variam desde o acúmulo ou deficiência de ferro na corrente

sanguínea ou até mesmo acúmulo do metal nos diferentes tecidos do organismo, principalmente no fígado.

A nível pós-traducional, a ferroportina é diretamente regulada pela hepcidina, um hormônio peptídico antimicrobiano de 25 aminoácidos (Figura 9) produzido primariamente por hepatócitos após estímulos de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-6 (Lee *et al.*, 2004; Nemeth *et al.*, 2004).

Mutações no gene codificador da ferroportina podem torná-la resistente à ação da hepcidina aumentando sua capacidade exportadora ou torná-la mais sensível à hepcidina diminuindo sua capacidade exportadora e acumulando ferro nos tecidos, estado patológico conhecido como hemocromatose tipo IV (Kasvove, 2013).

A ação do hormônio baseia-se na sua ligação à ferroportina, promovendo a internalização e degradação desse exportador por lisossomos, impedindo a liberação e saída do ferro reciclado dos macrófagos que seria utilizado principalmente no processo de eritropoiese gerando acúmulo de ferro nos tecidos e diminuindo a absorção de ferro da dieta pelos enterócitos que, por consequência, podem levar a diferentes quadros de anemia no paciente (figura 8) (Spottiswoode; Duffy; Drakesmith, 2014; Nemeth *et al.*, 2004; Ganz, 2011).

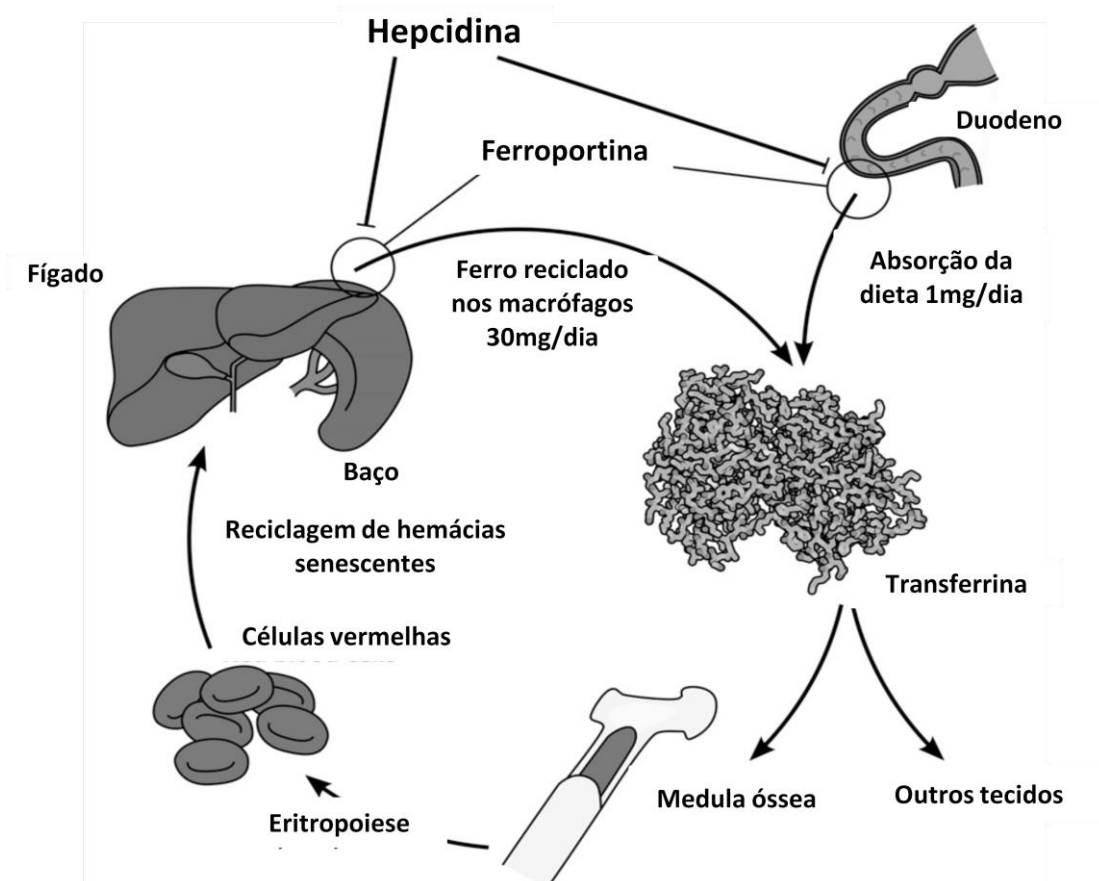


Figura 8. Ciclo de absorção e distribuição de ferro no organismo. Cerca de 1mg de ferro é obtido diariamente através da dieta, porém a maior parte do ferro do organismo, 30 mg, é obtida através da reciclagem do metal que será levado pela transferrina para os tecidos e para medula óssea onde será utilizado no processo de eritropoese (Spottiswoode *et al.*, 2012).

O hormônio é codificado pelo gene *hamp*, localizado no cromossomo 19q13, e produzido na forma de um pró-peptídeo de 84 aminoácidos que é clivados em 3 moléculas de 20, 22 e 25 aminoácidos sendo o último peptídeo a porção ativa do hormônio (Figura 9) (Roetto *et al.*, 2003; Delatycki *et. al.*, 2004).

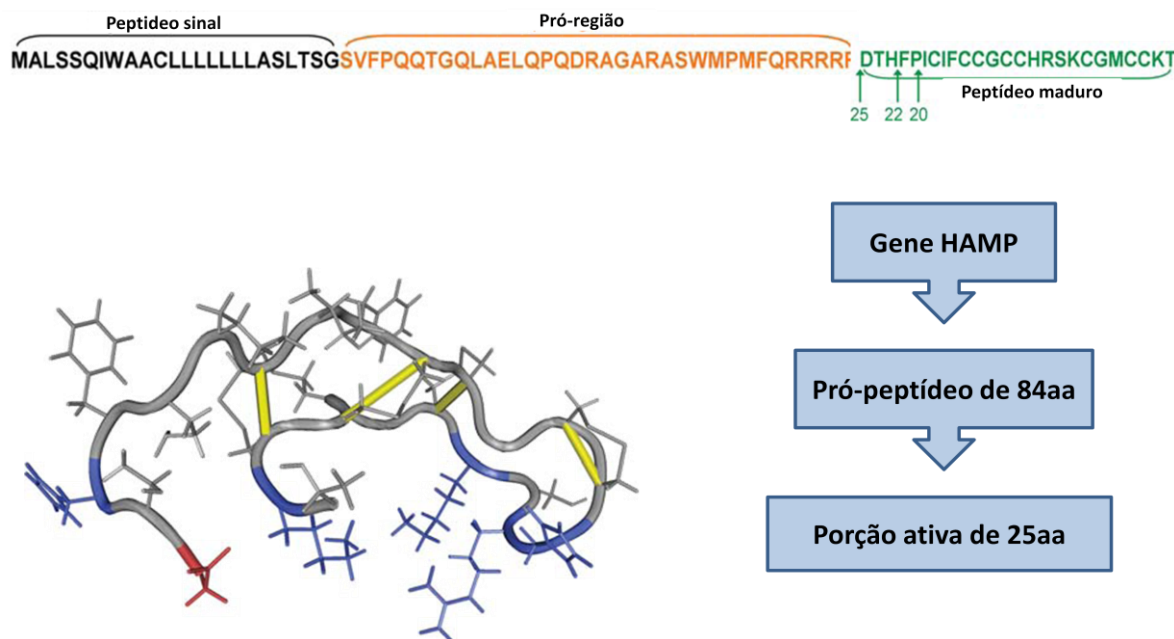


Figura 9. Sequência peptídica do hormônio Hepcidina codificada pelo gene *hamp*. O gene produz uma pré-proteína que após clivagem dá origem ao hormônio em sua forma madura e funcional composta de 25 aminoácidos.

Apesar de ser bem conservado, mutações nas regiões codificadoras do gene *hamp* e, principalmente no seu promotor podem alterar a expressão do hormônio o que leva a uma desregulação da homeostasia do ferro que podem causar estados patológicos no hospedeiro (Island *et al.*, 2009; Andreani *et al.*, 2009; Roetto *et al.*, 2003; Zaahl *et al.*, 2004; Delatycki *et al.*, 2004). A síntese da hepcidina é suprimida por estados de hipóxia e anemia (Andreani *et al.*, 2009; Nicolas *et al.*, 2002; Peyssonnaud *et al.*, 2007) e aumentada em casos de hiperferremia (Pigeon *et al.*, 2001; Nemeth *et al.*, 2009) e inflamação (Lee *et al.*, 2004; Nemeth *et al.*, 2004).

Alguns genes estão relacionados com a regulação da expressão de hepcidina, o gene HFE, descrito como gene cujas mutações mais conhecidas C282Y e H63D podem causar a hemocromatose clássica, doença que gera acúmulo de ferro no fígado e outros tecidos. Mutações nesse gene podem diminuir a expressão de hepcidina (Bridle *et al.*, 2003; Galello *et al.*, 2013) além de afetar a proteína transportadora transferrina. Mutações no gene TfR2, codificador da transferrina, enzima responsável pelo carregamento de ferro também causa hemocromatose afetando inclusive os níveis de hepcidina (Island *et al.*, 2009; Zaahl *et al.*, 2004; Ganz, 2011).

Em estudos genômicos de avaliação de genes relacionados ao metabolismo do ferro foi observado que os níveis de expressão e polimorfismos no gene *TMPRSS6* podem interferir nos níveis de hepcidina do indivíduo (Lee, 2009; An *et al.*, 2012). Esse gene codifica a proteína Matriptase-2, um potente inibidor da expressão do gene *hamp*. Um dos principais polimorfismos descritos na literatura A736V tem o efeito de aumentar os níveis de hepcidina e foi caracterizado como fator de risco genético para doenças de deficiência de ferro (An *et al.*, 2012; Pelusi *et al.*, 2013; Danquah *et al.*, 2014; Galesloot *et al.*, 2013).

1.4.1.2 A influência da homeostasia do ferro no níveis de hemoglobina durante a infecção malárica

A infecção pelo *P. vivax* gera um elevado grau de morbidade nos pacientes infectados e dentre os principais sintomas característicos da doença destaca-se a anemia (Nweneka *et al.*, 2010). Ela é definida como uma condição na qual há uma diminuição dos níveis de hemoglobina resultando na redução da capacidade carreadora de oxigênio do sangue (Nair & Iyengar, 2009). A anemia pode ter várias causas dentre elas a deficiência de ferro tanto do ponto de vista circulante quanto do ferro estocado na forma de ferritina (Anemia ferropriva). Uma delas é explicada pela liberação aumentada de citocinas inflamatórias que levam a uma elevação da produção de moléculas reguladoras da homeostasia do ferro, como a Hepcidina (Anemia por inflamação) cujo aumento gera uma restrição do ferro no plasma. Essa restrição é causada pelo sequestro do metal por macrófagos, enterócitos e hepatócitos (Howard *et al.*, 2007).

Em um estudo, foi analisada a prevalência e as causas da anemia em todo o mundo, verificou-se que a malária é a principal causadora de anemia (Kassebaum *et al.*, 2014). A anemia é avaliada pela dosagem de hemoglobina sanguínea e outros dados complementares como níveis de ferro e ferritina sanguíneos que fornecem informações importantes para prognóstico e direcionamento terapêutico dos pacientes.

Alguns estudos sugerem que a hepcidina é o principal regulador da anemia por inflamação, e sabe-se que infecções por *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* tendem a aumentar os níveis desse hormônio (de Mast *et al.*, 2009; Armitage

et al., 2009), entretanto, os altos níveis de hepcidina evitam superinfecções por *Plasmodium* (Portugal *et al.*, 2011). O seu papel na patogênese da malária vivax ainda não é bem caracterizado (Howard *et al.*, 2007), porém tem sido discutido. O rompimento das hemácias decorrente da infecção levaria a um aumento dos níveis de hepcidina estimulados por citocinas inflamatórias e moléculas características da infecção como a hemozoína, e este aumento do hormônio leva ao sequestro de íons ferro no interior dos macrófagos inibindo a eritropoiese. A diminuição da disponibilidade de ferro circulante e da formação de novas hemácias reduzem o desenvolvimento parasitário e o número de alvos para invasão pelo *Plasmodium*, funcionando como uma molécula participante da imunidade inata do indivíduo, que controla a parasitemia até que a imunidade adaptativa seja desenvolvida (Portugal; Drakesmith; Mota, 2014). Além disso, a hepcidina também impede o desenvolvimento das formas exoeritrocíticas pelo acúmulo do ferro no sistema reticuloendotelial, porém em infecções por *Plasmodium* sp ocorre um efeito de redistribuição desse ferro onde a maior parte fica retida no baço e em menor parte nos hepatócitos, essa limitação do acesso das formas exoeritrocíticas ao ferro inibe o crescimento parasitário que pode ser restituído caso os níveis de hepcidina voltem ao normal (Portugal; Drakesmith; Mota, 2014). Os estudos que relacionam a hepcidina e a malária são recentes e na maioria dos casos esta relação é verificada em indivíduos portadores de infecções assintomáticas ou em modelos *in vitro* (de Mast *et al.*, 2009; Armitage *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011).

1.5 Caracterização molecular dos parasitos nas infecções por *P. vivax*

Análises epidemiológicas da diversidade genética e estrutura populacional dos plasmódios são essenciais para o entendimento da dinâmica da transmissão da malária e para o desenvolvimento de vacinas maláricas bem como para a identificação de resistência aos antimaláricos (Brito & Ferreira, 2011).

A caracterização molecular dos parasitos das infecções primárias e episódios de recaída é uma importante ferramenta para auxiliar na sua distinção entre uma nova infecção (resultante de nova picada infectante de anofelinos) e de episódios de recrudescência ou falha no tratamento. Inicialmente acreditava-se que geralmente os parasitos da recaída eram geneticamente iguais aos da infecção primária,

constituindo um subgrupo destes parasitos (Craig *et al.*, 1996; Kirchgatter and Del Portillo 1998; Khusmith *et al.*, 1998; Imwong *et al.*, 2005; Bruce *et al.*, 1999). Entre estes trabalhos o único realizado no Brasil, utilizando o marcador MSP-1 para estudar 10 indivíduos, foram encontrados parasitos heterólogos em apenas 2 deles (Kirchgatter; Del Portillo, 1998). Entretanto, trabalhos mais recentes utilizando uma ampla análise molecular com marcadores mais polimórficos têm sugerido uma alta taxa de parasitos heterólogos nas recaídas (Imwong *et al.*, 2007; Van den Eede *et al.*, 2010).

Um dos marcadores moleculares utilizados nos estudos populacionais de *P. vivax* são SNPs (single nucleotide polymorphisms – polimorfismos de base única) em genes codificadores de antígenos. Como os antígenos sofrem a ação do sistema imune do hospedeiro seus genes codificadores estão sob forte pressão seletiva positiva, não sendo dessa forma considerados marcadores neutros e, por isso, não são bons marcadores evolutivos. Assim, os marcadores mais comumente utilizados em estudos de genética de populações são os microssatélites.

1.5.1 Microssatélites

Microssatélites são pequenas repetições em tandem de 2-6 bp muito utilizados para estudos de diversidade genética por serem hipervariáveis, co-dominantes e loci específicos (Russell, 2006). Sua variabilidade não está sujeita à pressão do sistema imune, portanto são considerados marcadores neutros ou quase neutros. Esta variabilidade provém do “slippage” ou derrapagem da DNA polimerase no momento da replicação do DNA. Também são utilizados na genotipagem de infecções múltiplas por plasmódios na qual, pela intensidade de fluorescência de cada pico, consegue-se diferenciar o alelo predominante de cada infecção (Havryliuk & Ferreira, 2008; Havryliuk *et al.*, 2009).

Poucos marcadores genéticos, a maioria ortólogos de genes codificadores de antígenos previamente identificados do *P. falciparum* são usados nos estudos populacionais do *P. vivax* (Bruce *et al.*, 2000) em contraste com a abundância de marcadores para *P. falciparum*, como por exemplo, mais de 1.000 microssatélites e centenas de polimorfismos de tamanho de restrição e polimorfismos de base única (SNPs). Para *P. vivax* já foram descritos na literatura como polimórficos em isolados

de campo cerca de 160 microssatélites (Leclerc *et al.*, 2004; Karunaweera *et al.*, 2008; Carlton *et al.*, 2008).

A princípio, acreditava-se que a variação polimórfica dos microssatélites de *P. vivax* era pequena entre isolados de diferentes regiões do mundo (Leclerc *et al.*, 2004). Entretanto, em estudos recentes, alguns autores descrevem a grande diversidade genética do *P. vivax* utilizando microssatélites altamente variáveis (Imwong *et al.*, 2006; 2007; Karunaweera *et al.*, 2007, 2008). A diferença entre estes estudos foi atribuída ao tamanho do arranjo do microssatélite que é diretamente proporcional à sua variabilidade (Imwong *et al.*, 2006).

1.5.2 Proteínas de superfície do merozoíto

As proteínas de superfície do merozoíto (MSP) são uma grande família de proteínas de superfície envolvidas na interação inicial entre os parasitos e as células vermelhas do sangue. Nove MSPs têm sido caracterizadas em *P. vivax*. Algumas MSPs são altamente polimórficas como a MSP1 e MSP3- α , outras mostram variabilidade limitada como MSP4, MSP7 e MSP10 (Brito & Ferreira, 2011).

1.5.2.1 Proteína de superfície do merozoíto 1 (MSP1)

A MSP1 é um antígeno imunodominante de 200kDa expresso na superfície do merozoíto. É formado de seis domínios altamente polimórficos flanqueados por sete sequencias conservadas. Em estudos de polimorfismos genéticos em isolados de *P. vivax* foi demonstrado que os blocos 1, 3 e 5, ao nível proteico são conservados com poucas substituições dimórficas, enquanto os blocos 2, 4, 6 e 10 são altamente variáveis (Brito & Ferreira, 2011). Além disso, essa proteína tem maior variabilidade em *P. vivax* em relação ao *P. falciparum* (Russell *et al.*, 2006). Sua alta diversidade pode ser resultado de recombinações intragênicas nas regiões polimórficas entre os tipos de alelos dimórficos ou por pressão seletiva do sistema imune (Brito & Ferreira, 2011).

A MSP1 tem sido usada em estudos de diversidade no estudo de recaídas e para genotipar isolados de diferentes cepas originadas de regiões geográficas distintas (Kim *et al.*, 2006). No Brasil, foi realizado um estudo a nível molecular

utilizando essa proteína na caracterização das recaídas e em cerca de 20% dos casos já relatados foram identificados parasitos distintos da infecção primária (Kirchgatter; Del Portillo, 1998) e a diversidade genética dos isolados era elevada assim como em estudos de amostras tailandesas (Cui *et al.*, 2003) e indianas (Kim *et al.*, 2006). Entretanto, na Coréia, relativamente baixa diversidade foi encontrada na PvMSP1 de pacientes que apresentaram recorrências da doença (Lim *et al.* 2000).

2 JUSTIFICATIVA

A malária é uma doença parasitária que ocupa posição de destaque no panorama mundial. Apesar da redução no número de casos, a doença continua sendo um grave problema de saúde pública.

Embora a malária causada por *P. vivax* seja a principal encontrada nas Américas e na Ásia, ela é ainda pouco estudada, possivelmente por esta espécie ser menos virulenta que *P. falciparum* e, devido às dificuldades de sua manutenção em cultivo contínuo, o que também limita os conhecimentos a cerca da biologia e da diversidade genômica do *P. vivax*.

Plasmodium vivax apresenta uma particularidade importante em seu ciclo biológico que afeta diretamente o controle da transmissão da doença, ele é capaz de desenvolver formas latentes (hipnozoítos) no tecido hepático que, quando ativadas, podem levar a uma recaída da doença (recaída). Além das dificuldades encontradas para o controle da doença como resistência dos vetores aos inseticidas e dos parasitos às drogas, as recaídas constituem um reservatório do parasito que dificulta o controle da doença. Assim, a dificuldade de distinção entre recaída, recrudesência e uma nova infecção tem se tornado um empecilho para os estudos de resistência as drogas, eficácia terapêutica e até mesmo para o desenvolvimento de novas drogas.

A caracterização molecular dos parasitos das infecções agudas e episódios de recaída é uma importante ferramenta para auxiliar na distinção entre nova infecção e recrudesência ou uma recaída. Tem sido demonstrado na literatura que geralmente os parasitos encontrados nas recaídas são geneticamente iguais aos da infecção primária, constituindo um subgrupo destes parasitos (Craig; Kain, 1996). Entretanto, nos estudos recentes isso não foi observado, na maioria dos casos o parasito causador da infecção primária era geneticamente distinto do parasita da recaída (Imwong *et al.*, 2007; Restrepo *et al.*, 2011, Véron *et al.*, 2009).

Poucos estudos foram realizados com amostras de *P. vivax* do Brasil. Um deles utilizou apenas um marcador (MSP-1) para estudar 10 indivíduos, encontrando parasitos homólogos na maioria das recaídas (Kirchgatter; Del Portillo, 1998). Outro estudo utilizou microssatélites e encontrou principalmente parasitos heterólogos nas recaídas (Orjuela-Sánchez *et al.*, 2009). Esses dados confirmam a necessidade de

se ampliar os estudos moleculares dos parasitos encontrados nos pacientes que sofreram recaídas de malária por *P. vivax* no Brasil. Além disso, cada estudo utiliza um tipo diferente de marcador. Assim, para facilitar a comparação com os estudos prévios foram incluídos neste estudo, além dos microssatélites também um gene codificador de antígeno polimórfico (MSP-1).

Os mecanismos que levam à ativação dos hipnozoítos e desenvolvimento de recaídas ainda são desconhecidos, porém algumas teorias já são descritas para explicação desse fenômeno. Uma delas está relacionada à disponibilidade de íons ferro no hospedeiro. A restrição de ferro circulante diminui o número e o tamanho dos parasitos durante a infecção, o que poderia, por pressão e necessidade de sobrevivência do parasito levá-lo ao desenvolvimento das formas latentes.

Entender o mecanismo da manutenção da homeostasia do ferro pode contribuir na elucidação da relação desse íon e das moléculas que participam do seu controle no desenvolvimento das recaídas e no desenvolvimento de um dos principais sintomas da infecção, a anemia.

Uma das principais proteínas envolvidas na disponibilidade de ferro circulante é a hepcidina, um hormônio que regula a absorção de ferro da dieta e a liberação de ferro dos macrófagos para a corrente sanguínea. Sabe-se que os níveis desse hormônio estão aumentados durante as infecções por *P. vivax* e *P. falciparum*, mas não se sabe qual a sua influência e sua relação com a infecção malárica.

Entender o papel da hepcidina na patogênese da malária vivax pode contribuir no entendimento do desenvolvimento de latência e ativação dos hipnozoítos bem como no estabelecimento de estratégias terapêuticas que diminuam a morbidade da doença ou até mesmo na descoberta de novas drogas que eliminem o parasito. Porém não foram encontrados dados na literatura que caracterizam a hepcidina em infecções agudas causadas pelo *Plasmodium vivax* e infecções causadas pela reagudização da doença pela ativação de hipnozoítos.

Através deste estudo pretende-se entender melhor a dinâmica de transmissão da doença, com destaque para o entendimento dos episódios de recaída e sua diferenciação em relação à recrudescência e reinfecção, bem como a relação da homeostasia do ferro no desenvolvimento dessas recaídas. Esses resultados serão importantes no estabelecimento de novas estratégias e metodologias de controle da

malária nas regiões endêmicas, principalmente no delineamento de estratégias terapêuticas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar a variabilidade genética de isolados de amostras pareadas infecção primária/recaídas e sua reatividade aos principais antígenos do *Plasmodium vivax* e investigar a associação entre a homeostase do ferro, particularmente da hepcidina e sua associação com a ativação dos hipnozoítos.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar os perfis de um painel de marcadores moleculares dos isolados de *P. vivax* provenientes de amostras pareadas: parasitos da infecção primária e do(s) episódio(s) de recaída dos mesmos indivíduos.
- Comparar os perfis de genotipagem obtidos das amostras pareadas buscando identificar marcadores moleculares de recaída.
- Analisar a diversidade genética das duas populações de parasitos estudadas.
- Determinar a presença de infecção múltipla nas amostras estudadas.
- Estabelecer um número mínimo de marcadores necessários para detecção de infecções múltiplas.
- Caracterizar do ponto de vista bioquímico a infecção pelo *P. vivax*, incluindo as dosagens relacionadas à homeostase do ferro.
- Identificar mutações no gene codificador da proteína envolvida na homeostase do ferro, hepcidina.
- Estabelecer relação entre parâmetros bioquímicos e moleculares com a anemia malárica e com a ocorrência dos episódios de recaída.
- Correlacionar a presença de mutações no gene *hamp* com a susceptibilidade aos episódios de recaída e a presença de anemia.
- Avaliação da resposta imunológica humoral contra os principais antígenos do *P. vivax*, comparando a reatividade nas infecções primárias e recaídas de amostras pareadas.

4 METODOLOGIA

4.1 Descrição das amostras

Amostras de sangue coletadas de 30 pacientes que tiveram infecção primária e recaída(s) por *P. vivax*, clinicamente acompanhados no Hospital Universitário Júlio Muller/MT em Cuiabá/MT foram selecionadas de biobancos da instituição. O diagnóstico dos pacientes foi feito através de gota espessa a partir da qual também foi possível terminar a parasitemia desses pacientes. Além do exame de gota espessa, o hemograma permitiu a obtenção de alguns dados de caracterização clínica dos pacientes como níveis de hemoglobina. Esses dados cadastrados no biobanco foram selecionados para compor este estudo e para avaliação da influência destas variáveis no objeto de estudo. Os pacientes foram tratados de acordo com o que foi preconizado pelo Ministério da Saúde (3 dias de tratamento com Cloroquina a 25mg/kg totalizando 75mg e 7 dias de tratamento com Primaquina a 30mg), e sofreram episódios de recaída da doença. Para serem incluídos neste estudo os episódios de recaída deveriam ter ocorrido com mais de 30 dias após o tratamento (eliminar recrudescência) e o paciente deveria relatar que não retornou às áreas endêmicas até o momento da ocorrência do episódio de recaída, já que o hospital estava localizado em área sem transmissão de malária (Cuiabá). (eliminar reinfecções). As amostras foram coletadas no período de 2001 a 2009 e os locais de contágio foram amplamente dispersos variando de 90 km a mais de 3.500 quilômetros de distancia de Cuiabá (média de 1.205 km).

As amostras foram coletadas de adolescente/adultos (14-63 anos – idade média de 37 anos) do sexo masculino e feminino que procuraram o hospital durante uma infecção aguda de malária, portanto, as amostras selecionadas eram de infecções sintomáticas e a primeira coleta de sangue e diagnóstico de malária do paciente no hospital foi considerada infecção primária, sendo somente 7 dos 30 pacientes analisados primo infectados, ou seja, aquela infecção era resultante de primeira inoculação de esporozoítos na vida do indivíduo.

Para complementar o estudo, amostras de pacientes residentes de área endêmica, no município de Remansinho/AM, ativamente acompanhados por um período de 6 meses foram gentilmente cedidas pelo Dr. Marcelo Urbano Ferreira.

Foram recebidas amostras de DNA para a etapa de amplificação e sequenciamento do gene codificador da hepcidina descrita nos itens seguintes. As amostras totalizavam 36 indivíduos dentre os quais 18 não sofreram episódio de recaída e 18 apresentaram um ou mais episódios de recaída sendo utilizada apenas a amostra correspondente à infecção primária dos pacientes. Detalhes da área endêmica e perfil da população encontram-se publicados (Barbosa *et al.*, 2014, Batista *et al.*, 2014).

De todos os pacientes foram utilizadas amostras de sangue para extração do DNA e amostras de soro ou plasma para realização de ensaios sorológicos e dosagens bioquímicas.

As amostras foram separadas em dois grupos: amostras de área sem transmissão (Cuiabá) e amostras de área endêmica (Remansinho). Cada grupo de amostras foi utilizado para realização de diferentes etapas deste estudo (figura 10)

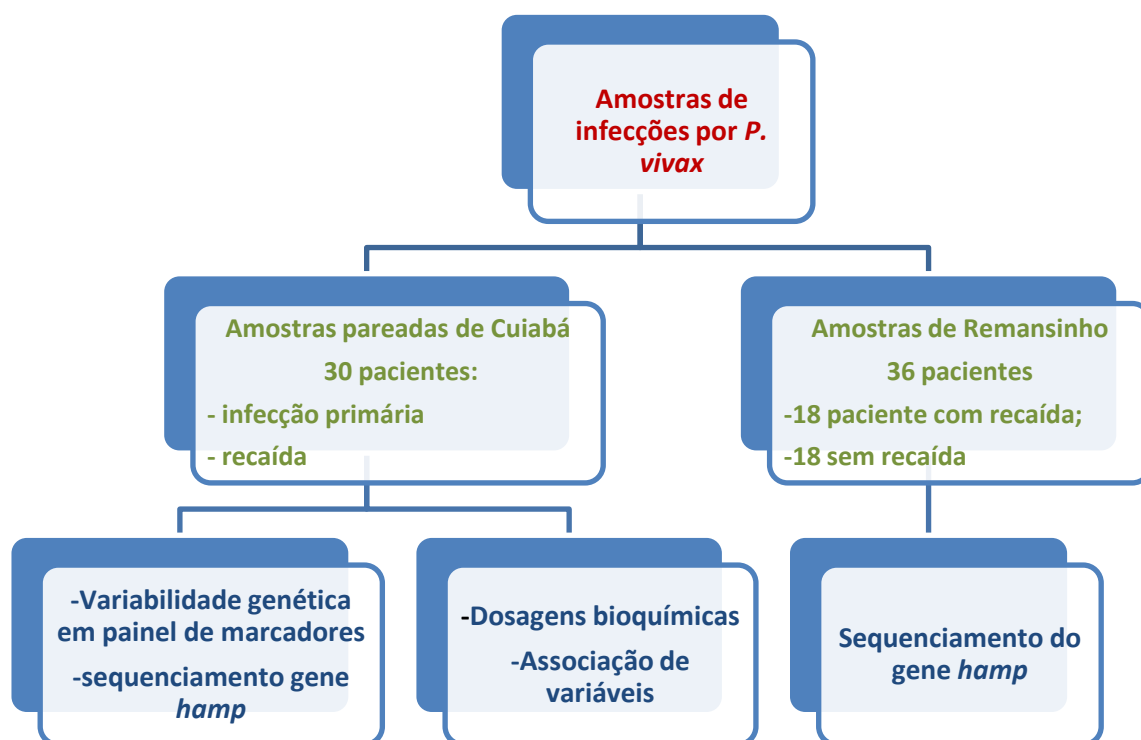


Figura 10. Grupos de amostras e os objetivos de sua utilização na pesquisa. No primeiro nível as amostras foram obtidas de pacientes infectados pelo *P. vivax*. No segundo nível os subgrupos de amostras e o número de pacientes. No terceiro nível, os objetivos de utilização dessas amostras.

Os aspectos éticos e metodológicos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ (documentos 08/2010 e 05/2010), de acordo com a resolução do

Ministério da Saúde brasileiro 196/96, e pelo Comitê de Ética de Pesquisa envolvendo seres humanos da Organização Mundial de Saúde – OMS/WHO (SCRIHS) (Anexo 1).

4.2 Extração do DNA

O DNA genômico dos pacientes foi extraído do sangue total das amostras coletadas usando o kit para extração Puregene Blood Kit, Qiagen (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante. Brevemente, para cada 1 mL de sangue total 3 mL de solução de lise para eritrócitos foram adicionados e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente a mistura foi centrifugada a 2000 $\times g$ por 10 minutos; o sobrenadante então foi removido. O sedimento foi ressuspenso em 1 mL de solução de lise celular. Foram adicionados 333 μ L de solução de precipitação de proteína ao lisado celular e esta mistura homogeneizada. Posteriormente foi realizada uma centrifugação a 2000 $\times g$ por 10 minutos e, depois o sobrenadante foi colocado em um tubo contendo 1 mL de isopropanol. Esta solução foi homogeneizada e centrifugada a 2000 $\times g$ por 3 minutos. O sobrenadante então foi descartado e foi adicionado ao sedimento 1 mL de etanol 70%. Outra centrifugação foi realizada a 2000 $\times g$ por 1 minuto e o sobrenadante novamente descartado. Finalmente foram adicionados 100 μ L de solução de hidratação de DNA ao sedimento. O DNA foi hidratado incubando-o a 65°C por 1 hora ou 16 horas em temperatura ambiente. O DNA foi dosado no espectrofotômetro NanoDrop e então armazenado a -20°C.

4.3 Amplificação e genotipagem dos marcadores moleculares

Os parasitos foram genotipados utilizando os marcadores da MSP1 (bloco 02 e bloco 10) (Koepfli *et al.*, 2009) e 08 loci de microssatélites identificados no laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou (Rezende *et al.*, 2010). Os loci encontram-se amplamente distribuídos pelos cromossomos do *P. vivax* (cromossomos 2, 3, 6, 7, 8, 12, 13 e 14) (Tabela 1) e com baixo desequilíbrio de ligação entre eles. Os microssatélites MS1 e 2 possuem repetições de dinucleotídeos (GT, CA), os microssatélites MS3 a 6 possuem repetições de

trinucleotídeos (CAT, TGA, TAA) e os microsatélites MS7 e 8 possuem repetições de tetranucleotídeos (TGTA, CATA).

Tabela 1 Caracterização dos marcadores moleculares

Microsatélite	Cromossomo	Unidade repetitiva	Variação no tamanho do	Número de alelos	TOP HIT	Posição no genoma
MS01	12	GT9	224-248	5	Adaptador relacionado ao complexo protéico gama 1 subunidade 2 (NC_009917)	2075887-2076132
MS02	3	CA12	290-312	10	Proteína hipotética (NC_009908)	782947-783248
MS04	6	TA21	130-174	12	Não codificadora	1027329-1027483
MS05	3	CAT10	173-215	10	Proteína hipotética (NC_009908)	30333-30515
MS06	14	TGA19	194-298	12	Proteína hipotética (NC_009919)	2835596-2835833
MS07	2	TAA22	349-388	8	Não codificadora	152239-152633
MS08	13	TGTA7	249-325	7	Não codificadora	1561308-1561621
MS11	8	CATA49	284-560	31	Não codificadora	840626-840999
MSP1bl2	7	Putaporntip <i>et al.</i> (2002)	352-460	7	Principal antígeno de superfície do estágio sanguíneo Pv200	1157742-1163137
MSP1bl10	7	Putaporntip <i>et al.</i> (2002)	226-329	12	Principal antígeno de superfície do estágio sanguíneo Pv200	1157742-1163137

A reação em cadeia da polimerase ou PCR foi realizada em termociclador Eppendorf Gradient, utilizando a enzima Taq polimerase recombinante (Invitrogen). As temperaturas de anelamento dos iniciadores e a concentração de cloreto de magnésio variaram de 50°C a 60°C e de 0,75mM a 1,50mM, respectivamente (Tabela 2). O resultado da amplificação foi visualizado em gel de agarose corado pelo brometo de etídio utilizando aparelho transiluminador.

Tabela 2 Iniciadores e condições de amplificação

INICIADOR	FORWARD	REVERSE	TM (°C)	[MG ⁺] (MM)
PvMS1	5' CTATCTGAGGAATGGGGA 3'	5' ATTTACTATGACGAAGGTGA 3'	53,4	1,5
PvMS2	5' CATCATTTGGGTAAGTCGGG 3'	5' GCAGCCACAAAATCAACACC 3'	60	1,5
PvMS4	5' TTTATTTCCCCCTTTGCC 3'	5' AAATGGATGTTCTTGTCAA 3'	55,7	1
PvMS5	5' TGCTATTTGCTCGGTCTGT 3'	5' GAGCGTTATCATCATTAG 3'	56	1,5
PvMS6	5' ACACATTTGACACAGTTCC 3'	5' ATGCCCTGGTCCCTACAA 3'	58,6	1,5
PvMS7	5' GTATTCCCGTCTTGTC 3'	5' CTTTCTCCGTTCTTATTCT 3'	56	1,5
PvMS8	5' TCCGTTGTTTTGTGCCC 3'	5' CACTTGTTTCGTTCCGCTC 3'	60	1,5
PvMS11	5' CGATGCGTTCACCTGGAT 3'	5' TATTCTTCTCCCCTCGTG 3'	54	0,75
MSP1bl2	5' GACGATATTGAAAATTGGA 3'	5' CTCCTTCAGCACTTTCACGCGCTT 3'	63	3
MSP1bl10	5' CAAGCCTACCAAGAATTGATCCCCAA 3'	5' ATTACTTTGTCGTAGTCTCGGCGTAGTCC 3'	60	3

Os iniciadores senso foram adquiridos com fluoresceína na extremidade 5' para realização da genotipagem no sequenciador automático, onde os produtos de PCR amplificados foram adicionados aos poços de uma placa de 96 poços do modelo “Ultraamp™ Skirted 96 PCR Plate” (marca Sorenson BioScience TNC). A cada poço foram adicionados Tween 20 a 0,1%, 0,3 µL de padrão de peso molecular, MegaBACE™ ET550-R Size Standard (GE Healthcare), com todos os seus fragmentos marcados com ET-ROX e 2-5 µL de produto de PCR para um volume final de 10 µL. Após a separação das amostras por eletroforese capilar os resultados foram analisados utilizando o programa MegaBACE Fragment Profiler versão 1.2, para identificação dos tamanhos exatos dos fragmentos previamente amplificados. Pelo fato do parasito ser haploide na fase sanguínea do ciclo, a presença de dois picos numa mesma amostra, foi considerada como uma evidência de infecção múltipla. O *cut off* mínimo para a altura dos picos foi de 150 unidades de fluorescência arbitrária (rFu). Na presença de dois ou mais picos, o que obteve a maior altura foi considerado o alelo predominante.

4.4 Clonagem dos fragmentos

Foram clonados fragmentos de amplicons de 2 marcadores (escolhidos aleatoriamente) de 4 pacientes para busca de infecções múltiplo-clone. Para a realização da técnica, os produtos da amplificação por PCR anteriormente descrita foram clonados no vetor pGEM-T Easy vector, conforme instruções do fabricante.

Escherichia coli da cepa TOP10 quimicamente competentes foram transformadas com o plasmídeo recombinante. Em um tubo de microcentrífuga foram incubados 2 µL do produto da reação de ligação com 50 µL de células competentes por 30 minutos no gelo. Rapidamente o tubo foi transferido para o banho-maria a 42°C por 45 segundos e imediatamente o tubo foi recolocado ao gelo por 2 minutos. Foram adicionados 500 µL de meio LB líquido (NaCl 10 g/L, Triptona 10 g/L, Extrato de levedura 5 g/L) ao tubo, que foi incubado a 37°C, sob forte agitação por 1 hora. Em seguida as células foram plaqueadas em meio LB-ágar (NaCl 10 g/L, Triptona 10 g/L, Extrato de levedura 5 g/L, Ágar 20 g/L pH 7,0) com 100 µg/mL de ampicilina e mantido a 37°C 12-16 h.

As colônias resultantes foram selecionadas, repicadas com o auxílio de palitos autoclavados e incubadas individualmente em 2 mL de meio LB líquido (NaCl 10 g/L, Triptona 10 g/L, Extrato de levedura 5 g/L) com 100 µg/mL de ampicilina a 37°C, sob forte agitação por 12-16 hs (cultura saturada). Foram selecionadas todas as colônias positivas de cada transformação para extração plasmidial, amplificação dos clones e posteriormente os amplicons foram submetidos à genotipagem conforme protocolo descrito anteriormente.

A extração de DNA plasmidial foi realizada a partir do sistema Quiaprep (Quiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, 1 mL de cada cultura saturada foram centrifugados por 10 minutos a 9000 rpm. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 250 µL de tampão P1 (Buffer P1 + RNase). Em seguida, 250 µL de tampão P2 foram adicionados e os tubos homogeneizados por inversão de 4 a 6 vezes. Foi acrescentado à mistura o tampão N3 e imediatamente os tubos foram homogeneizados por inversão de 4 a 6 vezes. Após a homogeneização, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 13000 rpm. O sedimento foi descartado e o sobrenadante aplicado em colunas oferecidas pelo Kit. Após centrifugação das colunas por 1 minuto a 13000 rpm o conteúdo do tubo foi descartado. A coluna foi lavada com 500 µL de Tampão PB e novamente centrifugada por 1 minuto a 13000 rpm e ao final, o conteúdo do tubo foi descartado. Foram adicionados 750 µL de tampão PE (Buffer PE + álcool etílico 96%) e durante 1 minuto foram centrifugados a 13000 rpm descartando o conteúdo do tubo no final. A coluna foi colocada em tubo de microcentrífuga e o plasmídeo eluído com 50 µL de água destilada e deionizada esterilizada. Foi realizada a amplificação

dos fragmentos específicos por PCR de acordo com as condições descritas no item 2.

Para verificar infecções múltiplas e da possível derrapagem da polimerase durante a amplificação dos microssatélites, o que levaria a resultados errôneos causados pela presença de artefatos (Stutter bands), os tamanhos de amplicons obtidos a partir de plasmídeos recombinantes contendo os produtos de PCR clonados foram comparados com os tamanhos dos amplicons do DNA original.

4.5 Análise dos resultados da genotipagem

Calculou-se a diversidade genética (heterozigosidade esperada, H_E), que pode ser definido como a probabilidade de que um par de alelos obtidos aleatoriamente da população serem distintos, usando Arlequin 3.0 software (Excoffier *et al.*, 2007) e a diversidade genética dos parasitas primários e recaídas foi comparada usando ANOVA.

4.6 Amplificação e sequenciamento do gene *hamp*

Para a amplificação do gene foram desenhados iniciadores que contemplavam os peptídeos que são clivados de 20, 22 e 25 aminoácidos, correspondente à porção do peptídeo maduro e funcional.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em termociclador Veriti® 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems®) utilizando os iniciadores Senso 5' AGG TTG CCG GGA GCC AGT CT 3' e anti-senso 5' CCA GCC CCA CAT GAC CCA CC 3' na temperatura de anelamento de 65°C e concentração de 0,25 picomoles de cada iniciador. A concentração de magnésio padronizada foi de 1,5mM e volume final de reação de 50µL. O produto da amplificação foi visualizado em gel de agarose a partir da coloração das amostras com corante GelRed (Biotium).

O produto amplificado foi purificado utilizando solução de Polietilenoglicol (PEG 20%) a 20% para eliminação de bandas de tamanhos pequenos (<300-400 pb). Os produtos da PCR foram transferidos para microtubos e foi adicionado o mesmo volume de solução PEG 20% homogeneizando o conteúdo. Os tubos foram deixados em banho-maria a 37°C por 15 minutos e posteriormente centrifugados por

15 minutos a uma velocidade de 13.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e descartado e, ao precipitado, foram adicionados 125µL de etanol 80% v/v. Os tubos foram centrifugados e o sobrenadante retirado novamente. Para evaporação dos resíduos de etanol restantes os tubos foram deixados à temperatura ambiente até não restarem vestígios do álcool. O DNA foi reidratado utilizando água tipo Mili-Q em volume proporcional ao volume inicial de DNA.

Para a reação de sequenciamento, foi utilizado o kit Big Dye® Terminator v3.1 cycle sequencing (Applied Biosystems, Califórnia, USA). As reações foram conduzidas com um volume final de 10 µL utilizando-se em torno de 100 ng de DNA purificado, 3,3 µM de iniciador (senso ou anti-senso), 1 µL do mix Big Dye® Terminator e seu tampão. As reações foram realizadas no termociclador Veriti® 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), sendo as condições da amplificação: 96°C por um minuto, 35 ciclos a 96°C por quinze segundos, 65° C por quinze segundos e 60° C por quatro minutos.

Para precipitação do DNA, em cada poço da placa MicroAmp 96-well Reaction plate (Applied Biosystems, Califórnia, USA) foram adicionados 1 µL de EDTA 125 mM, 1 µL de acetato de amônio 7,5 M e 50 µL de etanol absoluto PA gelado. Em seguida, a placa foi selada e homogeneizada 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 µL de etanol 70% gelado. A placa foi centrifugada por 15 minutos a 3700 rpm 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 no sequenciador automático de DNA ABI 3730 através da plataforma de sequenciamento da CPqRR - FIOCRUZ.

4.7 Análise dos dados de sequenciamento

Os dados brutos obtidos do sequenciador foram analisados individualmente pelo Chromas Lite versão 2.1.1 (Technelysium 1998 – 2012), que fornece o “*base-*

calling”, onde é possível avaliar a qualidade dos cromatogramas gerados pelo sequenciador automático, sendo considerado apenas um valor de Phred acima de 30. Os alinhamentos das sequências foram realizados com o software de alinhamento múltiplo *ClustalW* e *CAP3* (Thompson *et al.*, 1994), dentro do pacote de programas *BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9* (Hall, 1999). No *BioEdit* foi realizada, quando necessário, a edição manual do alinhamento dos genes sequenciados.

4.8 Dosagem sorológica de hepcidina

Para dosagem dos níveis de hormônio hepcidina foi utilizado soro ou plasma de pacientes e o Kit comercial de ensaio imunoenzimático (ELISA) para hepcidina (Uniscience, Life Science Inc.) e foi desenvolvido conforme instruções do fabricante.

Para os 30 pacientes de amostras pareadas provenientes de área sem transmissão de malária (Cuiabá) as dosagens foram feitas individualmente para comparação dos níveis de hepcidina nos diferentes momentos de infecção (primária e recaída).

Primeiramente, o padrão liofilizado foi reconstituído com 1 mL do diluente de padrão, ambos fornecidos pelo kit e deixado em repouso por uma hora antes da sua utilização nos ensaios. A concentração do padrão nessa solução estoque é de 16.000 pg/mL. Essa solução foi diluída para 4.000 pg/mL que foi a maior concentração da curva padrão além das diluições seriadas em 7 microtubos contendo 110 µL de diluente de padrão. Foram feitas diluições de 2.000 pg/mL, 1.000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL e 0 pg/mL.

As amostras foram diluídas 100-300x em PBS 1X e foram distribuídos 100 µL das amostras nos poços da placa de 96 poços sensibilizada com anticorpos anti-hepcidina e mantidas a 37°C por um período de incubação de 2 horas e posteriormente a placa foi invertida para descarte do líquido residual.

Durante a incubação foi preparada a solução de detecção A conforme orientação do manual do kit a partir da diluição do reagente de detecção A com o diluente de ensaio A. Foram adicionados 100 µL de solução de detecção A em cada poço seguida de incubação da placa a 37°C por 1 hora. Após esse período a placa foi invertida para descarte do líquido e submetida a um processo de 3 lavagens

consecutivas com o tampão de lavagem fornecido e inversão da placa para retirada dos resíduos.

Durante a incubação foi preparada a solução de detecção B conforme orientação do manual do kit a partir da diluição do reagente de detecção B com o diluente de ensaio B. Foram adicionados 100 µL de solução de detecção B em cada poço seguida de incubação da placa a 37°C por 30 minutos. Após este período a placa foi invertida, o líquido foi descartado e a placa foi submetida a 5 processos de lavagem consecutivos utilizando o tampão de lavagem.

Foram adicionados 90 µL de solução TMB (temperatura ambiente) em cada poço e a placa foi incubada a 37°C por 30 minutos na ausência de luz. Posteriormente foram adicionados 50 µL de solução de parada em cada poço seguida da leitura da placa em leitor de ELISA utilizando filtro de 450 nm.

Os valores de absorbância das diluições do padrão foram utilizados para construção de curva padrão e aplicação de método de regressão linear. Foi obtida equação da reta e, a partir desta, foi possível calcular os valores de concentrações da hepcidina nas amostras.

4.9 Dosagem de ferro

As dosagens bioquímicas de ferro foram feitas utilizando kit para determinação de ferro por metodologia colorimétrica de ponto final utilizando ferrozina (Analisa, Gold Analisa Diagnóstica Ltda). Primeiramente a solução calibradora do kit foi reconstituída com 3mL de água destilada/deionizada e deixada em repouso por 30 min. Os volumes de amostra e reagentes foram ajustados para dinamizar as análises em placas de 96 poços. Foram identificados nas placas os poços equivalentes às soluções de “Branco”, “Calibrador” e “Amostra”.

Para cada poço foi adicionado 80µL de tampão contendo tioureia 30 mmol/L e surfactantes em tampão pH 4,5 400 mmol/L e 10 µL do teste correspondente à identificação do poço: branco (água deionizada), calibrador ou amostra. Após homogeneizar, foram feitas as leituras fotométricas em comprimento de onda de 560nm. A primeira leitura de absorbância correspondente ao calibrador foi denominada AC1 e das amostras At1. Após a primeira leitura, foram adicionados 20µL de reagente ferrozina contendo 10mmol/L de ferrozina e 32,6mmol/L de ácido

ascórbico em tampão 50mmol/L pH 4. A mistura foi homogeneizada e incubada a 37°C por 5 min.

Foram feitas novas leituras fotométricas em 560nm e a segunda absorbância do calibrador foi denominada AC2 e das amostras At2. Como essa metodologia obedece à lei de Lambert-Beer, podem-se efetuar os cálculos através do fator de calibração (FC) sendo que o fator de correção dos volumes de At1 e At2 foram aplicados. Os cálculos aplicados foram:

CC = Concentração do Calibrador em µg/dL (211 µg/dL)

CT = Concentração das amostras em µg/dL

$\Delta C = AC2 - AC1$

$\Delta T = At2 - At1$

$FC = CC \div \Delta C$

$CT = FC \times \Delta T$

4.10 Dosagem de ferritina

As dosagens bioquímicas de ferritina foram feitas utilizando kit para determinação de ferritina por turbidimetria (Analisa, Gold Analisa Diagnóstica Ltda). O teste baseia-se na aglutinação das partículas de látex recobertas com anticorpos anti-ferritina humana pela ferritina presente na amostra de soro. A concentração de ferritina na amostra é proporcional à aglutinação obtida, que é medida por turbidimetria.

O reagente padrão do kit contendo soro humano liofilizado foi reconstituído com 3 mL de água destilada ou deionizada. Também foi previamente preparado o reagente de trabalho através da mistura do tampão fornecido (glicina 170 mmol/L, cloreto de sódio 100 mmol/L e azida sódica 14,6 mmol/L, pH 8,2) e do Látex Ferritina também fornecido (suspensão de partículas de látex sensibilizadas com anti-ferritina humana e azida sódica 14,6 mmol/L) na proporção de 2:1 respectivamente.

O reagente de trabalho foi pré-aquecido a 37°C e o zero da absorbância foi ajustado com água deionizada. Os volumes de amostra e reagentes foram ajustados para dinamizar as análises em placas de 96 poços. Foram identificados nas placas os poços equivalentes às soluções de “Padrão” e “Amostras”.

Para cada poço foram adicionados 100µL de Reagente de trabalho previamente preparado e 3µL do teste correspondente à identificação do poço: padrão ou amostra. Foi utilizada uma curva padrão construída a partir da diluição da solução padrão de concentração conhecida (561µg/L) com solução salina 0,9% nos fatores de diluição de 0,125; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0.

A mistura foi homogeneizada e a placa colocada no porta-placas termostaticado a 37°C aguardando 10 segundo para realização da primeira leitura fotométrica (A1) em comprimento de onda de 540nm. Após 5 min foi feita nova leitura fotométrica (A2) do padrão e das amostras a 540nm.

A concentração das amostras foi obtida pela interpolação dos valores da diferença entre as absorbâncias A2 e A1 respectivamente no gráfico da curva-padrão ou pela utilização do fator de calibração.

4.11 Antígenos recombinantes (PvDBP, PvMSP119 , PvAMA1)

A PvDBP é produzida rotineiramente no laboratório conforme protocolo de Cerávolo e colaboradores (2005). Ela foi expressa em *Escherichia coli* linhagem BL21 (DE3) Star, transformada com o plasmídio recombinante contendo as regiões II a IV do gene da PvDBP (aminoácido 177 ao 815), após adição de IPTG (concentração final de 0,1mM) e mantida sob agitação durante 3 horas a 37 °C. Em seguida a cultura foi centrifugada e o sedimento bacteriano, congelado. A lise celular e a posterior purificação da proteína foi realizada em cromatografia de afinidade utilizando a matriz Sepharose Gluthatione 4B (GE Healthcare Life Science), associado à eletroeluição para remoção de uma proteína contaminante de 70 kDa de *E. coli*, conforme protocolo descrito por Cerávolo *et al.* (2005). Posteriormente, a PvDBP recombinante foi quantificada em Nanodrop e armazenada em -70 °C até a sua utilização nos ensaios de ELISA.

As proteínas PvMSP1₁₉ e PvAMA1 recombinantes foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Irene Soares da Universidade de São Paulo (USP).

4.12 Ensaio Imuno Enzimático (ELISA)

A detecção de anticorpos anti-PvDBP, anti-PvMSP1₁₉ e anti-PvAMA1 em plasmas das amostras pareadas primárias/recaídas foi realizada pela técnica de ELISA (Cerávolo *et al.*, 2005, Soares *et al.*, 1999, Rodrigues *et al.*, 2005). Resumidamente, rPvDBP, rPvMSP1₁₉, rPvAMA1 foram utilizadas para sensibilizar placas de 96 orifícios nas concentrações de 5 µg/mL, 1µg/mL e 1µg/mL, respectivamente, e mantidas a 4°C por 12 horas. Posteriormente, as placas foram bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS 1 x pH7,2 + 0,05% Tween20 + 5% leite em pó desnatado) por 1 hora. Em seguida, soros diluídos em PBS 1X na proporção de 1:100 foram adicionados à placa e incubados durante 1 hora a 37 °C. Após a incubação, as placas foram lavadas (PBS 1X + Tween) e 100µL do conjugado anti-IgG humano ligada à peroxidase (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:4.000 foram adicionados. A revelação foi realizada com OPD 200µmole/pastilha (Sigma-Aldrich). Paralelamente a rPvDBP, a Glutathione S Transferase (GST) (Sigma-aldrich) também foi utilizada nos ensaios de ELISA, uma vez que a rPvDBP foi produzida fusionada à GST. Os valores de densidade óptica (DO_{490nm}) de cada soro testado contra a PvDBP foi subtraído da DO_{490nm} da GST do soro correspondente para se obter a DO_{490nm} real. A rPvMSP1₁₉ e a rPvAMA1 foram produzidas fusionadas à cauda de histidina (6xHis). O cálculo do ponto de corte (*cut off*) para cada proteína foi calculado utilizando a média da DO_{490nm} de 30 soros de indivíduos negativos (oriundos de área não endêmica) mais 3 vezes o desvio padrão, cujos valores de *cut off* para PvDBP, PvMSP1₁₉ e PvAMA1 foram de 0,200, 0,200 e 0,210 respectivamente.

Os índices de reatividade de cada amostra foram obtidos pela divisão dos valor de OD das amostras pelos valores de ponto de corte (*cut-off*) dos controles de cada proteína.

4.13 Análises estatísticas

Foram utilizados os testes AMOVA e para análise da diversidade genética dos isolados. Também foi utilizado o Teste de Shapiro Wilk para avaliação da distribuição dos dados nas variáveis: Dosagem de hepcidina; parasitemia; níveis de

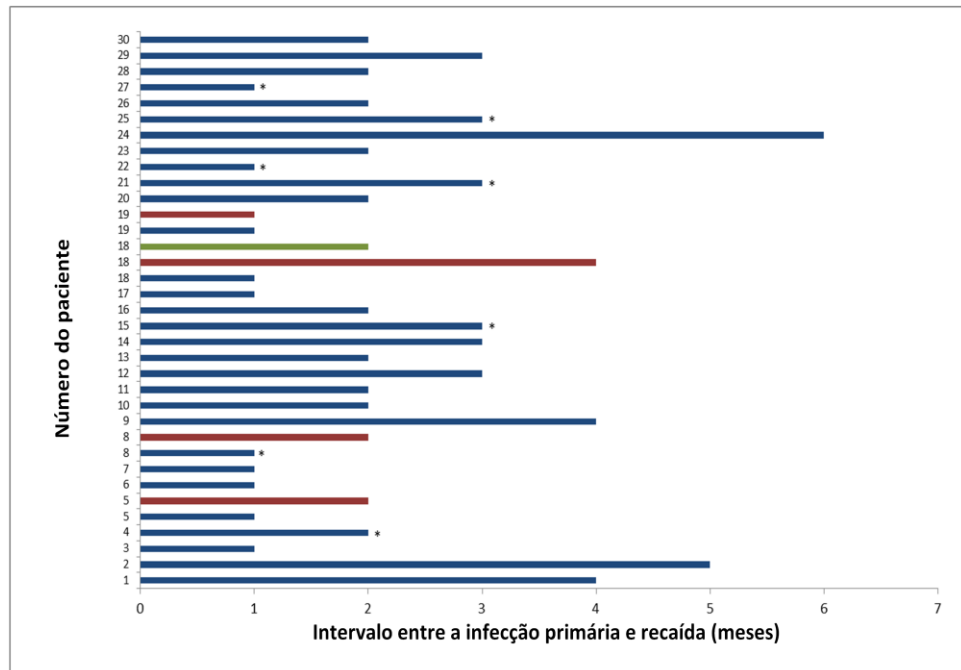
hemoglobina; níveis de ferro; níveis de ferritina; número de plaquetas; número de leucócitos. Além desse, também foi utilizado o Teste de Wilcoxon e teste T de Student para comparação dos dados pareados entre infecção primária e recaídas e os Testes de correlação de Spearman ou Pearson para avaliação de correlações e associações das variáveis. As análises estatísticas foram realizadas na plataforma R em colaboração com a Dra. Taynãna César Simões do Serviço de Apoio em métodos quantitativos do Centro de Pesquisas René Rachou.

5 RESULTADOS

5.1 Descrição das amostras

Foram selecionados 30 pacientes de idade entre 14 a 64 anos, do biobanco do Hospital Universitário Julio Muller residentes em área sem transmissão de malária, mas que ao viajarem para área endêmica foram infectados pelo *Plasmodium vivax* (Ver tabela S1 do artigo em anexo). Dentre esses pacientes, 7 foram infectados pela primeira vez pelo *Plasmodium vivax*, sendo esses indivíduos considerados como primoinfectados, os outros 23 já sofreram malária em algum momento da vida. As amostras obtidas das infecções agudas destes indivíduos foram consideradas infecções primárias, porém não necessariamente a primeira malária da vida. Os pacientes foram tratados conforme recomendação do Ministério da Saúde, porém em períodos variáveis de tempo apresentaram um ou mais episódios de recaída (Figura 11). Nas amostras estudadas o intervalo de ocorrência de recaídas foi na sua maior parte entre 2,3 meses após o tratamento do paciente, corroborando os dados da literatura de cepas de regiões tropicais como o Brasil (figura 11).

A



B

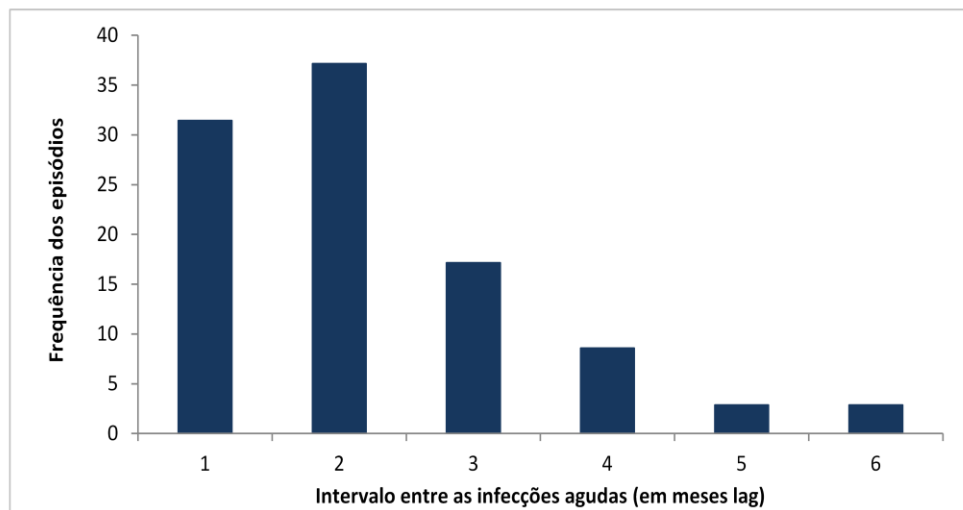


Figura 11. Intervalo entre as infecções agudas de malária (primárias e recaídas). (A) Cada linha representa um paciente identificado pelo seu número, linhas com o mesmo número de paciente representam mais de um episódio de recaída. Alguns pacientes apresentaram um segundo episódio de recaída (vermelho) e até um terceiro (verde) Os asteriscos representam os indivíduos primoinfectados. (B) Frequência dos intervalos das recaídas. Os intervalos são representados em meses lag (1=0,5-1,5 meses; 2=1,5-2,5 meses; e assim por diante).

Foram selecionados através do banco de dados possíveis variáveis relacionadas aos pacientes selecionados, tais como níveis de hemoglobina, parasitemia, idade e a classificação da infecção (se primária ou recaída).

5.2 Variabilidade genética dos isolados

Foi estudada a variabilidade genética de parasitos de 30 indivíduos em dois momentos de infecção: primária e recaída. Desses, 26 apresentaram um único episódio de recaída, os outros 4 apresentaram 2 ou mais episódios de recaída. No total foram obtidas 65 amostras de infecções agudas por *P. vivax*.

O estudo das amostras utilizando um painel de 10 marcadores moleculares revelou uma alto nível de diversidade haplotípica (Diversidade haplotípica = 0.9957 ± 0.0037), sendo encontrados 57 haplótipos únicos e uma diversidade genética avaliada pelo índice de heterozigosidade esperada que variou de 0,48 a 0,96 entre os loci (média = 0.77 ± 0.13), que não foi significativamente diferente entre os grupos de infecções primárias e recaídas (teste de AMOVA, $p=0.7116$). Nas infecções primárias o índice de heterozigosidade esperada (H_E) foi de 0.779 ± 0.129 , em contrapartida, os episódios de recaída foram subdivididos em grupos de primeira recaída e segunda recaída. No grupo de primeira recaída o H_E foi de 0.798 ± 0.115 enquanto na segunda recaída de $H_E = 0.810 \pm 0.197$ (AMOVA $p=0.7116$).

Nas análises dos gráficos da genotipagem, em grande parte das infecções foram observados mais de um pico de fluorescência por loci, o que representa a presença de mais de uma variante genética de parasitos. O pico de maior nível de fluorescência foi considerado o alelo predominante naquele momento da infecção.

Quando avaliado somente o alelo predominante da infecção, o número de alelos detectados por cada marcador variou de 5 a 12, com exceção do marcador MS11 que detectou 31 alelos (figura 12). Porém quando considerados os outros alelos encontrados nas infecções classificados como raros, que no total foram 14, essa variação ficou entre 9-10 alelos por marcador.

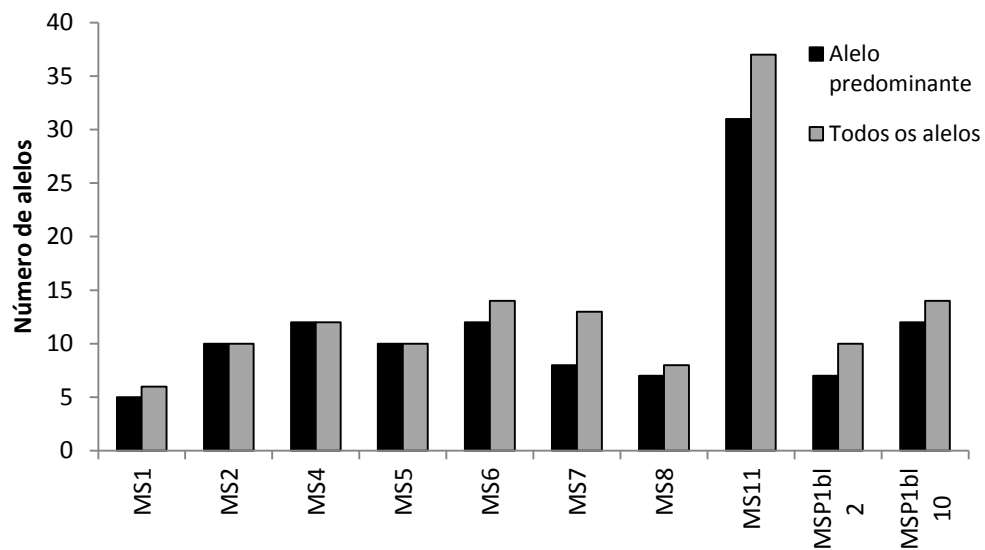


Figura 12. Número de alelos por marcador considerando apenas o alelo predominante (preto) ou todos os alelos detectados (cinza).

Considerando apenas os alelos predominantes, os parasitos foram classificados de acordo com a presença de alelos idênticos nas recaídas em comparação às primárias nos diferentes marcadores em: (a) Parasitos totalmente homólogos – em todos os marcadores os alelos eram de mesmo tamanho; (b) Parasitos homólogos - ≥ 8 marcadores apresentavam os mesmo alelos; (c) Parasitos heterólogos - > 2 marcadores com alelos diferentes; e, (d) Totalmente heterólogos – todos os marcadores com alelos diferentes. Com base nesse critério foi observado que, em amostras pareadas de infecções primárias e recaídas os haplótipos encontrados foram heterólogos em 46% dos casos. Em contrapartida, em pacientes onde os haplótipos da infecção primária e da recaída foram totalmente homólogos ou homólogos (pelo menos 8 marcadores com alelos iguais) somam 54% dos dados. Não foram encontradas amostras pareadas com parasitos de haplótipos totalmente heterólogos (figura 13). Nos pacientes primoinfectados, os parasitos presentes nas recaídas foram homólogos em relação aos parasitos da infecção primária.

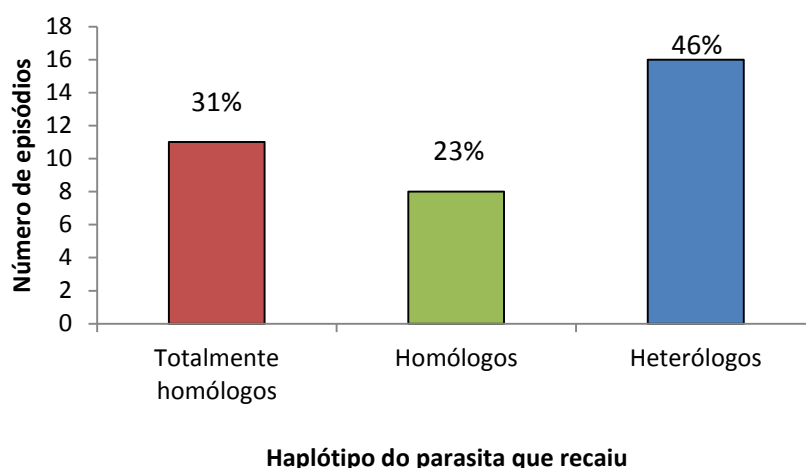


Figura 13. Genotipagem de 10 marcadores moleculares e comparação dos haplótipos parasitários em amostras pareadas de infecções primárias e recaídas de 30 indivíduos. Parasitos totalmente homólogos apresentam o mesmo haplótipo do parasito nos dois momentos de infecção. Parasitos homólogos ou heterólogos tem de 80-90% de igualdade ou diferença respectivamente, dos haplótipos no painel de 10 marcadores.

Uma das hipóteses que explicaria o alto número de parasitos heterólogos nas infecções seria a existência de um efeito de flutuação da predominância dos alelos nos diferentes momentos de infecção. Essa variação poderia ser decorrente de uma diferença na capacidade de detecção dos alelos raros de parasitos homólogos que no momento de coleta das amostras não se apresentavam em níveis de predominância entre as variantes. A diferença foi claramente visualizada em 4 pacientes com múltiplas recaídas onde pode-se observar que há flutuação dos alelos predominantes entre os episódios de infecção aguda da doença. Foram encontrados de 2 a 6 alelos predominantes diferentes para cada marcador. Em 65% (26 de 40) dos casos, o alelo predominante da infecção primária também era dominante nos episódios de recaída. Dos casos em que o alelo predominante não era o mesmo na infecção primária (14 de 40), em 9 os alelos eram idênticos entre as recaídas. No total, foram encontrados 10 diferentes haplótipos (H1 a H10) e somente um paciente apresentou o mesmo haplótipo durante todos os episódios de infecção, paciente 17 (figura 14).

5.3 Identificação de alelos raros

Para verificar se o alelo heterólogo predominante na recaída poderia ser um alelo raro da primária foram selecionados 4 pacientes e destes, o produto da amplificação de dois marcadores moleculares, escolhidos aleatoriamente para cada paciente, foram clonados e foram selecionadas e genotipadas todas as colônias positivas de cada produto clonado. Os alelos de cada colônia foram identificados e a determinação do alelo predominante foi feita pelo maior número de colônias correspondente aquele alelo. Foram encontradas infecções múltiplas (mais de uma variante do parasito) tanto nas infecções primárias quanto em recaídas em 75% dos casos e foram encontrados até 4 alelos em algumas infecções (figura 15).

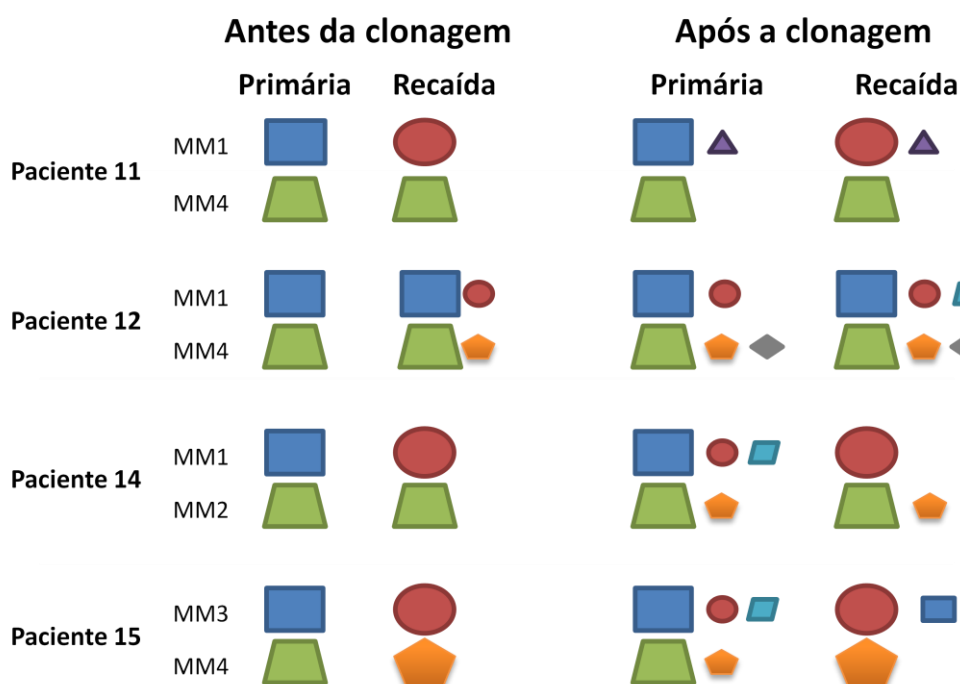


Figura 15. Perfil genotípico de quatro pacientes em uma análise dos alelos encontrados em diferentes marcadores antes e após a realização da clonagem. Cada uma das formas representa um alelo e a presença de mais de um alelo caracteriza a infecção múltipla. O tamanho das formas representa a predominância dos alelos. Antes da clonagem a detecção dos alelos e determinação do predominante foi feita pela altura dos picos, após a clonagem na detecção e determinação do alelo predominante foi considerado o número de colônias de cada alelo. Os alelos foram avaliados nos diferentes marcadores MM1, MM4, MM2 e MM3.

Foram observados diferentes padrões de recaídas antes e após a clonagem das amostras como, por exemplo, a detecção de alelos predominantes nas infecções primárias e recaídas distintos antes da clonagem e a presença de alelos raros idênticos em ambas as infecções detectados somente após a clonagem (Figura 15, paciente 11-MM1). Também foram encontrados perfis de alelos predominantes distintos nas infecções antes da clonagem, porém a detecção do alelo predominante na recaída, como raro na infecção primária após clonagem (Figura 15, paciente 14-MM1 e paciente 15-MM3). Alguns alelos se apresentavam sempre como alelos raros em ambas as infecções (Figura 15, paciente 12-MM1 e MM4; e paciente 14-MM2) ou que foram detectados em apenas uma das infecções (Figura 15, paciente 11-MM1, paciente 12-MM1 e MM4; paciente 14-MM1 e paciente 15-MM3).

Como o processo de clonagem revelou alelos raros não detectados antes da clonagem e que em muitos casos o alelo presente na recaída apenas não foi detectado na infecção primária, todos os dados de genotipagem realizados antes do processo de clonagem foram re-analisados para tentar identificar os alelos raros clonados. Assim, surgiu uma nova questão sobre qual o critério utilizar na detecção do alelo raro. A princípio uma infecção só seria considerada múltipla se o pico de menor nível de fluorescência representasse no mínimo $\frac{1}{4}$ do nível de fluorescência do pico predominante. Após a nova análise foi observado que os alelos raros detectados na clonagem estavam presentes na genotipagem antes da clonagem, porém com nível de fluorescência muito inferior em relação ao pico predominante. Na figura 16A pode-se observar dois alelos detectados pela genotipagem sendo que o pico de menor nível de fluorescência representa $\frac{1}{3}$ do pico de maior fluorescência, os dois foram considerados alelos e a infecção múltipla. No gráfico inferior (figura 16B) são detectados 2 picos porém de níveis de fluorescência muito distintos, sendo o menos fluorescente 25x menor do que o mais fluorescente.

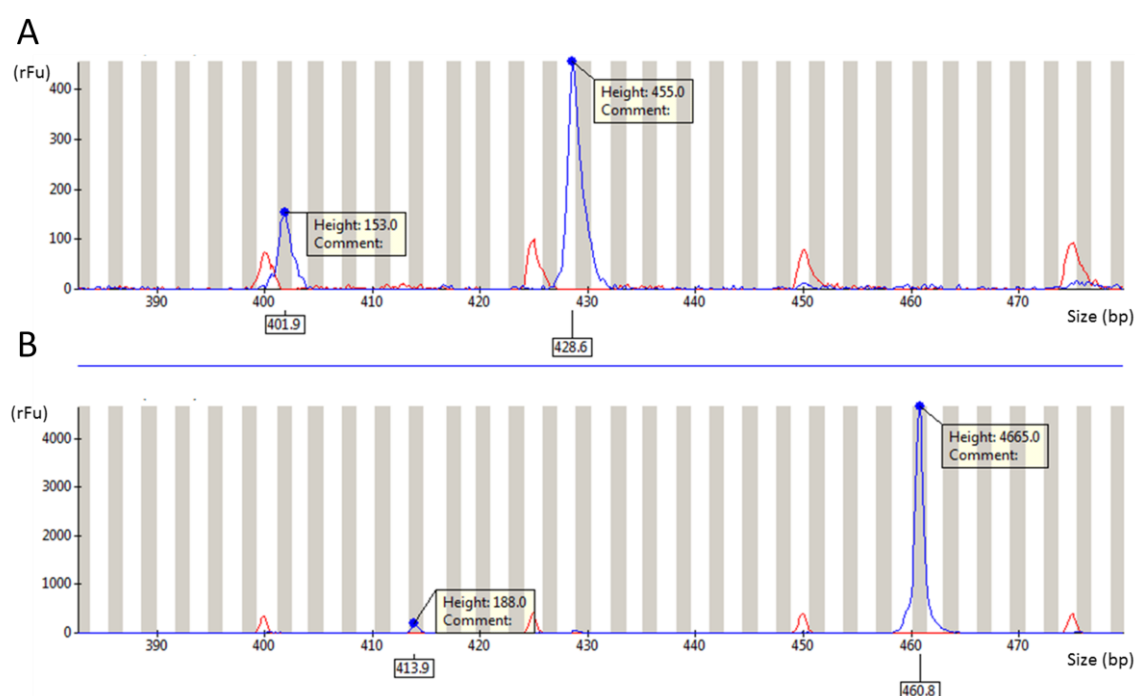


Figura 16. Genotipagem de duas amostras de infecções primárias de diferentes pacientes com perfis distintos para o mesmo marcador MSP1bloco2. (A) Infecção múltipla detectada por dois picos de fluorescência sendo o menor pico equivalente a um terço da altura do pico predominante. (B) Infecção múltipla detectada em que o pico predominante é 25x maior que o pico secundário. O tamanho dos fragmentos esta representado no eixo X e o nível de fluorescência da amostra no eixo Y, os picos em vermelho representam o marcador molecular usado como referência na eletroforese capilar.

Após esta análise, os critérios de determinação de infecção múltipla foram repensados e foram analisados os critérios já descritos na literatura para determinação de infecção múltipla. Alguns autores determinam que a infecção múltipla é considerada se o pico de menor fluorescência representar $1/3$ da fluorescência do predominante (33%), outros acreditam que deve representar $1/4$ (25%). Após análises das clonagens e das fluorescências, neste trabalho os picos foram considerados alelos se o nível de fluorescência fosse igual ou superior a 150 rFu definido como o cut-off de detecção. Foram avaliados, de acordo com esses três critérios a capacidade de detecção de infecções múltiplas por cada um deles. Foi observado que a capacidade de detecção utilizando o critério de níveis iguais ou superiores ao cut-off aumentava e era capaz de detectar quase 100% das infecções múltiplas (figura 17).

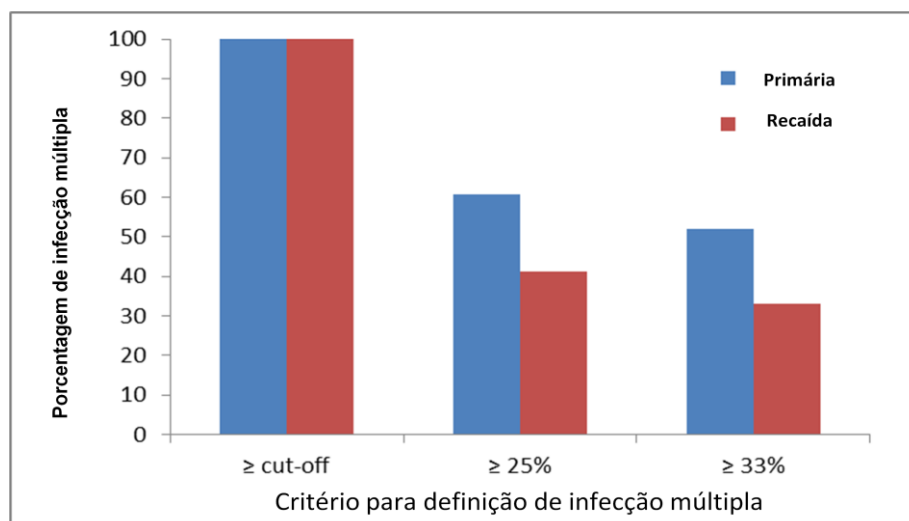
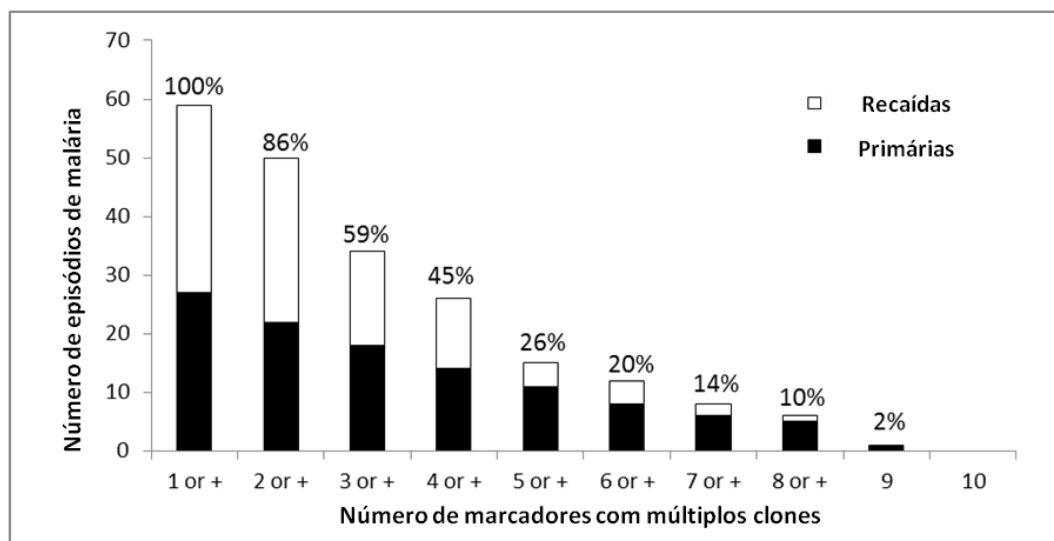


Figura 17. Comparação das infecções múltiplas detectadas usando diferentes critérios. Foram avaliadas as detecções utilizando o critério de $\geq 33\%$ (1/3), $\geq 25\%$ (1/4) ou $\geq$ cut-off (150 rFu) nos episódios de infecções primárias ou recaídas.

Além da utilização do critério de cut-off também foi avaliada a capacidade de cada marcador molecular de detecção de infecções múltiplas e quantos marcadores seriam necessários para detectar todas as infecções múltiplas tendo como base os resultados observados após a clonagem de algumas amostras, que aumentou a sensibilidade de detecção de alelos anteriormente não identificados e alelos raros. Foi observado que com a combinação de 5 marcadores moleculares é possível fazer a identificação de 100% das infecções múltiplas (figura 18).

A



B

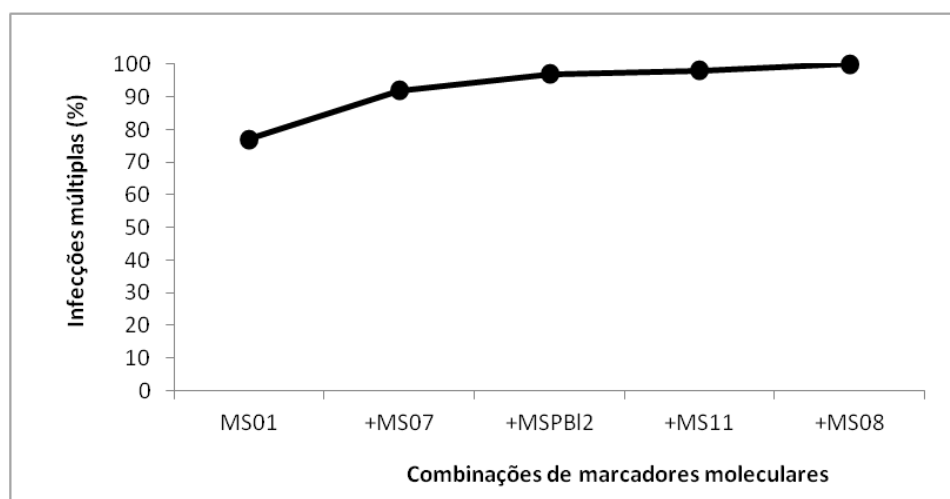


Figura 18. Identificação de infecções múltiplas por marcadores moleculares e suas combinações. (A) Capacidade de identificação múltipla por diferentes marcadores. (B) Combinação de marcadores para detecção de infecções múltiplas.

5.4 Amplificação e sequenciamento do gene *hamp*

O DNA foi extraído a partir de sangue total dos pacientes e foi utilizado para amplificação da região codificadora do gene *hamp* por PCR, gerando um fragmento de cerca de 550pb (Figura 19).

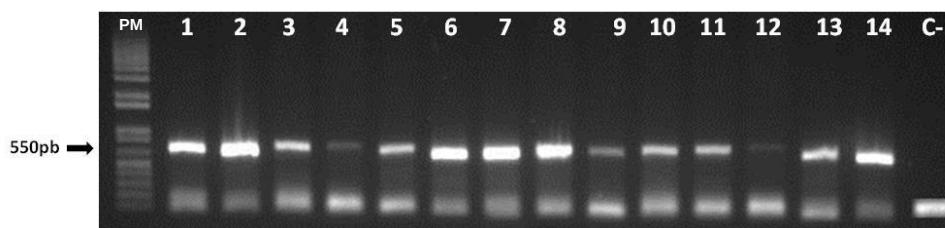


Figura 19. Produto amplificado do gene *hamp*. Imagem ilustrativa do resultado da amplificação de 14 amostras cujo tamanho foi identificado pela utilização de um peso molecular (PM) de fragmentos de pesos conhecidos e o controle negativo da reação na ausência de DNA (C-).

O produto amplificado foi purificado e sequenciado para identificação de polimorfismos nesse gene. A sequência do gene *hamp* de todos os pacientes foi obtida e foi feito alinhamento através do programa Clustal W utilizando como referência a sequência depositada no Genbank NG_011563.1 correspondente ao gene *hamp*. Não foi encontrado nenhum polimorfismo na análise das sequências do alinhamento. A região correspondente ao peptídeo maduro e funcional da proteína mostrou-se fortemente conservada entre os pacientes das diferentes regiões analisadas (Figura 20).

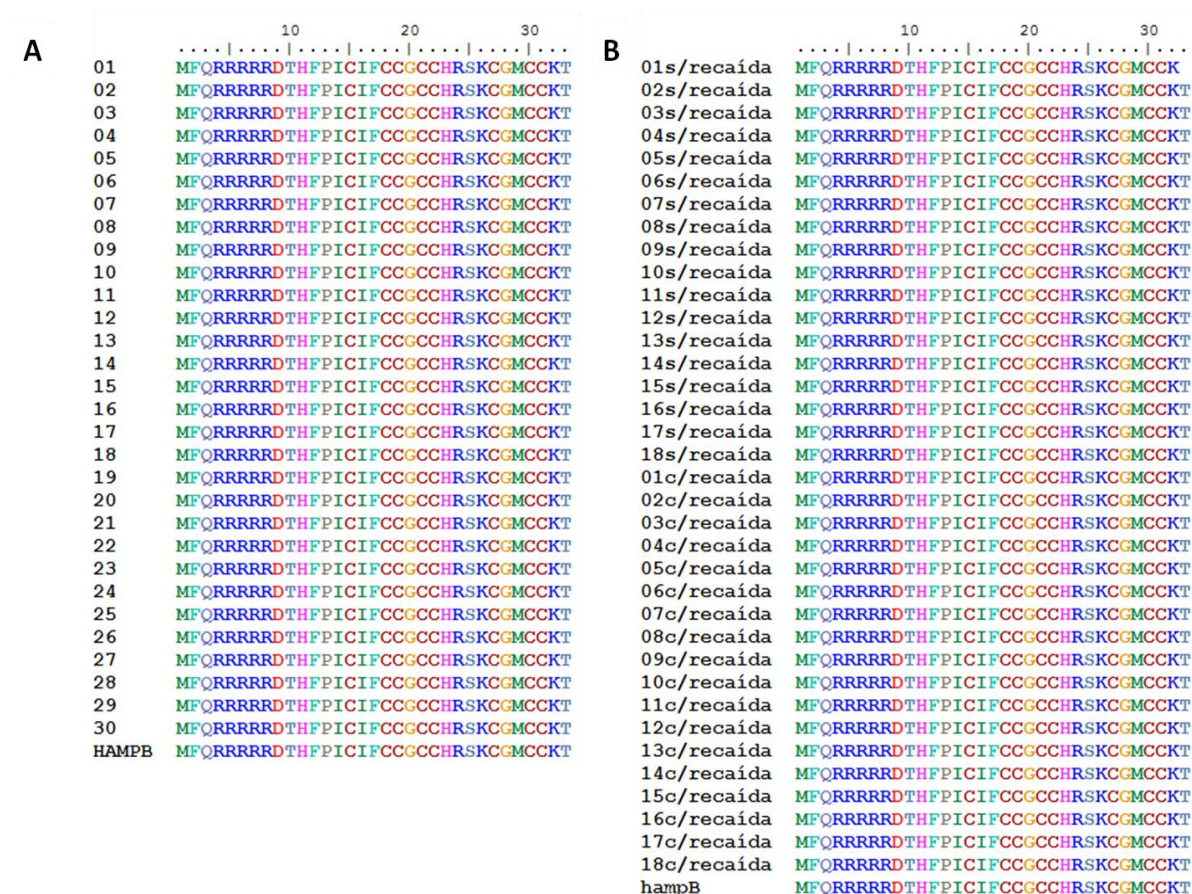


Figura 20. Alinhamento da sequência proteica codificada pelo gene *hamp* em pacientes de área sem transmissão (A) e pacientes de área endêmica (B) comparados a sequência depositada no GenBank (HAMPB).

5.5 Dosagens de hepcidina

As dosagens dos níveis de hepcidina foram determinadas utilizando um kit de ELISA comercial (Uniscience, Life Science Inc.) nas amostras de soro ou plasma dos 30 pacientes de Cuiabá.

Nas amostras pareadas foram realizadas dosagens na infecção primária e na recaída do paciente. O nível médio de hepcidina nas amostras de infecções primárias foi de 404,7 ng/mL enquanto nas recaídas o nível médio foi de 339,3 ng/mL. Não foi observada diferença entre as dosagens de recaídas de ocorrência recente (até 35 dias) e recaídas tardias (acima de 35 dias). Os dados não seguem uma distribuição normal dentro dos grupos de infecção primária e recaída sendo então avaliada a mediana dos dados. Não foi observada diferença estatística entre os grupos em relação à mediana da dosagem de hepcidina (Figura 21).

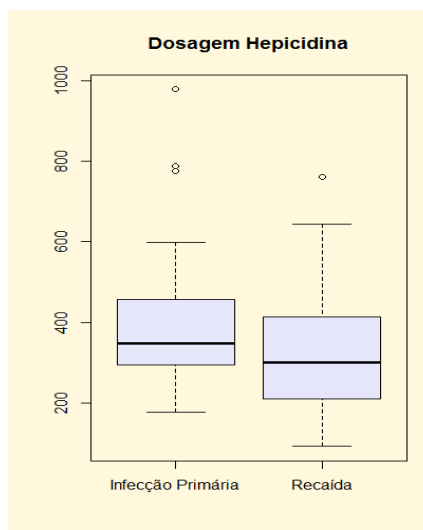


Figura 21. Teste de Wilcoxon para dados pareados e teste de correlação de Spearman para dosagem de hepcidina. Ao lado esquerdo o Teste de Wilcoxon mostra que não há diferença significativa entre os grupos (p-valor=0,1461). Ao lado direito o Teste de correlação de Spearman não demonstra correlação linear entre os grupos (p-valor: 0,1576).

5.6 Dosagens de ferro

As dosagens de ferro foram feitas a partir de amostras de soro ou plasma dos pacientes pelo método de colorimetria. Foram dosadas apenas as amostras de área sem transmissão de malária devido à disponibilidade de soro ou plasma suficientes.

A média de ferro circulante nas amostras de infecção primária foi de 85,5 µg/dL e nos episódios de recaída de 92,5 µg/dL. A variável nível de ferro não seguiu uma distribuição normal nos dois grupos, somente no grupo de infecções primárias e não foi observada diferença significativa entre os grupos em relação à mediana das dosagens (Figura 22).

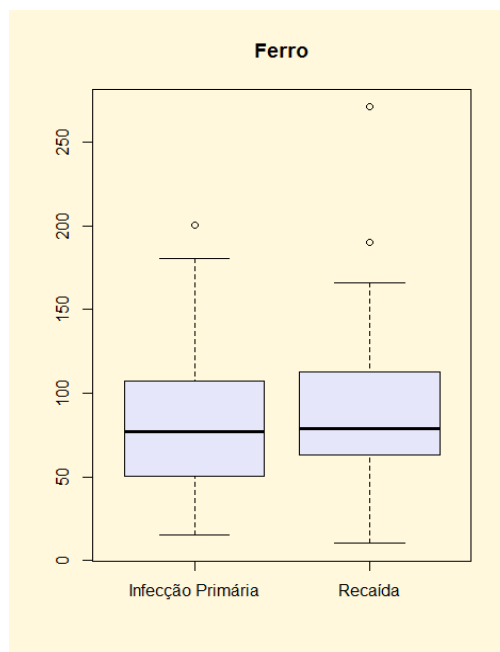


Figura 22. Comparação dos níveis de ferro nos diferentes momentos de infecção. O Teste de Wilcoxon para dados pareados: p-valor=0,6956 demonstra que não há diferença entre os grupos, em relação à quantidade mediana de ferro.

5.7 Dosagem de ferritina

As dosagens de ferritina foram feitas a partir de amostras de soro ou plasma dos pacientes pelo método de turbidimetria. Foram dosadas apenas as amostras de área sem transmissão de malária devido à disponibilidade de soro ou plasma suficientes.

A média de ferritina circulante nas amostras de infecção primária foi de 314 µg/L e nos episódios de recaída de 416,7 µg/L. A variável ferritina não seguiu uma distribuição aproximadamente normal nos dois grupos, somente no grupo de infecções primárias e não foi observada diferença significativa entre os grupos em relação à mediana das amostras. Foi demonstrada uma correlação linear fraca ($r_s = 0,36$) nos diferentes momentos de infecção com significância de 10% (p-valor: 0,0805) (Figura 23).

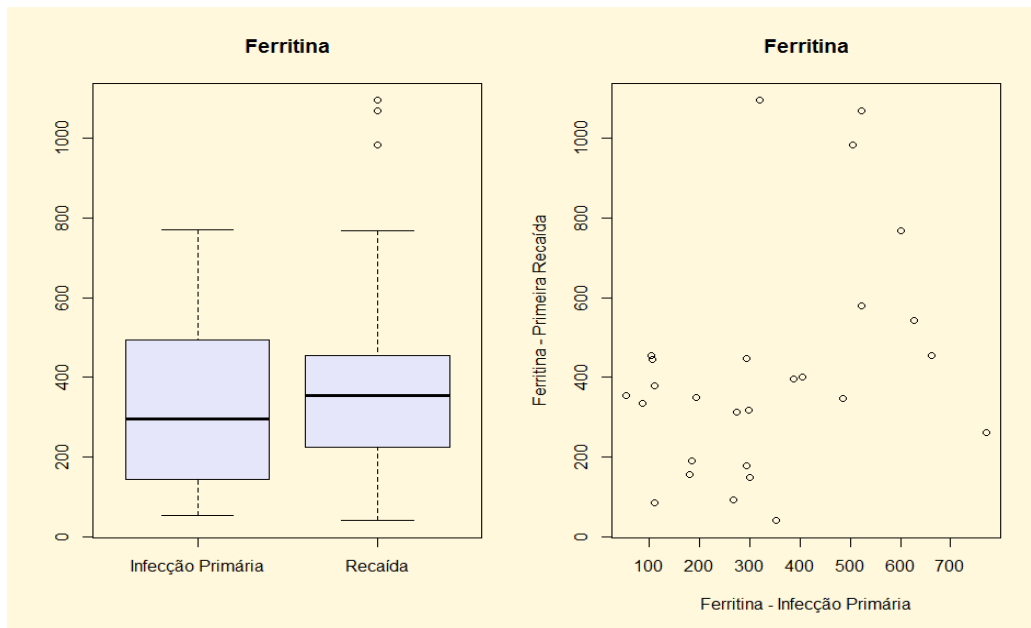


Figura 23. Níveis de ferritina nos diferentes grupos. O Teste de Wilcoxon para dados pareados: p-valor=0,1855 mostra que não há diferença entre os grupos, em relação à quantidade mediana de ferritina. Porém há correlação linear de $r_s=0,36$ entre infecção primária – recaída com significância de 10% (Teste de correlação de Spearman: p-valor: 0,0805).

5.8 Análise das variáveis do estudo

Foram adquiridas informações sobre as amostras pareadas que podem ser variáveis que se relacionem ao objeto de estudo, como idade dos pacientes, parasitemia e níveis de hemoglobina. Foi feita avaliação de cada variável nos diferentes momentos de infecção (Tabela 3) e posteriormente uma busca de associações entre as variáveis juntamente com as dosagens realizadas de hepcidina, ferro e ferritina.

Tabela 3. Estatísticas sumárias de cada variável nos diferentes momentos de infecção

Variável	Mínimo	Quartil 1	Mediana	Média	Desvio-padrão	Quartil 3	Máximo	Missing
<u>Infecção Primária</u>								
Dosagem	177,1	294,7	347,3	404,7	187,2	450,7	978,3	-
Idade	14,0	23,8	32,0	34,1	13,8	42,0	63,0	-
Parasitemia	22,0	658,8	1258,0	2034,1	2031,0	2602,5	8238,0	-
Hemoglobina	7,6	12,0	13,1	12,8	1,92	14,0	15,7	2
Ferro	15,0	50,2	77,2	85,5	48,6	106,9	200,4	-
Ferritina	54,4	161,9	294,9	325,0	199,0	490,2	771,0	-
IR_DBP	0,25	0,57	1,08	1,13	0,65	1,50	2,67	1
IR_MSP1	0,18	0,88	2,94	2,62	1,70	3,96	5,04	1
IR_AMA	0,30	0,74	1,38	1,57	1,03	2,31	3,38	1
<u>Recaída</u>								
Dosagem	92,1	211,6	300,6	339,3	168,8	399,5	760,6	-
Idade	14,0	24,8	32,0	34,3	13,7	42,0	63,0	-
Parasitemia	15,0	610,0	1680,0	2055,0	1765,0	2843,0	5740,0	1
Hemoglobina	10,0	12,6	13,7	13,7	1,78	15,0	16,8	3
Ferro	10,2	63,1	79,0	92,5	54,2	112,6	270,9	1
Ferritina	40,3	225,5	354,3	414,3	280,9	454,5	1095,2	1
IR_DBP	0,28	0,84	1,12	1,17	0,46	1,40	2,13	1
IR_MSP1	0,24	1,49	3,09	2,78	1,52	4,04	4,85	1
IR_AMA	0,62	1,19	1,50	1,72	0,77	2,19	3,30	1

Na avaliação da variável idade foi observada uma distribuição aproximadamente normal dos dados na curva padrão, porém notou-se que a maioria dos pacientes que foram infectados pelo *P. vivax* e que sofreram recaídas tem entre 20 e 40 anos (Figura 24).

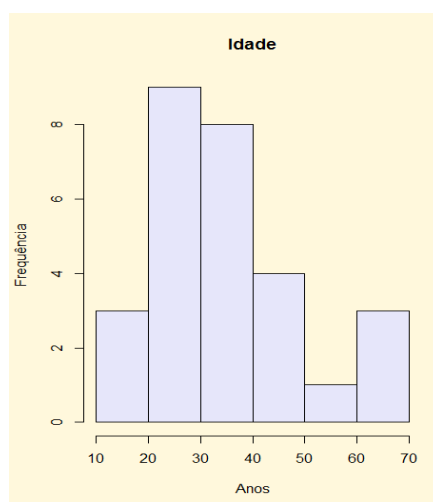


Figura 24. Distribuição de dados referentes à idade dos pacientes na curva-padrão. A variável segue uma distribuição aproximadamente normal (Teste de Shapiro Wilk: p-valor = 0,05484).

A variável parasitemia não segue uma distribuição aproximadamente normal nos grupos avaliados. Quando avaliado se existe diferença significativa entre a mediana de parasitemia entre os grupos, não foi observada diferença significativa entre os grupos e não houve correlação linear entre os grupos (Figura 25).

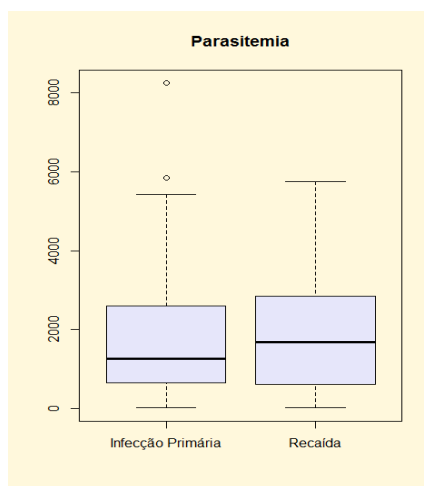


Figura 25. Comparação da parasitemia nos diferentes momentos de infecção. Foi aplicado o Teste de Wilcoxon para dados pareados: p-valor=0,9191 onde foi observado que não há diferença entre os grupos, em relação à mediana da parasitemia.

Os níveis de hemoglobina encontrados nos pacientes seguem uma distribuição normal na curva e apresentam uma média de 12,8 g/dL nos pacientes de infecções primárias e 13,7 g/dL nos pacientes de recaídas. A hemoglobina se apresenta significativamente mais elevada nos episódios de recaída e existe uma moderada correlação linear de 0,49 entre os episódios de infecção primária e recaída (Figura 26).

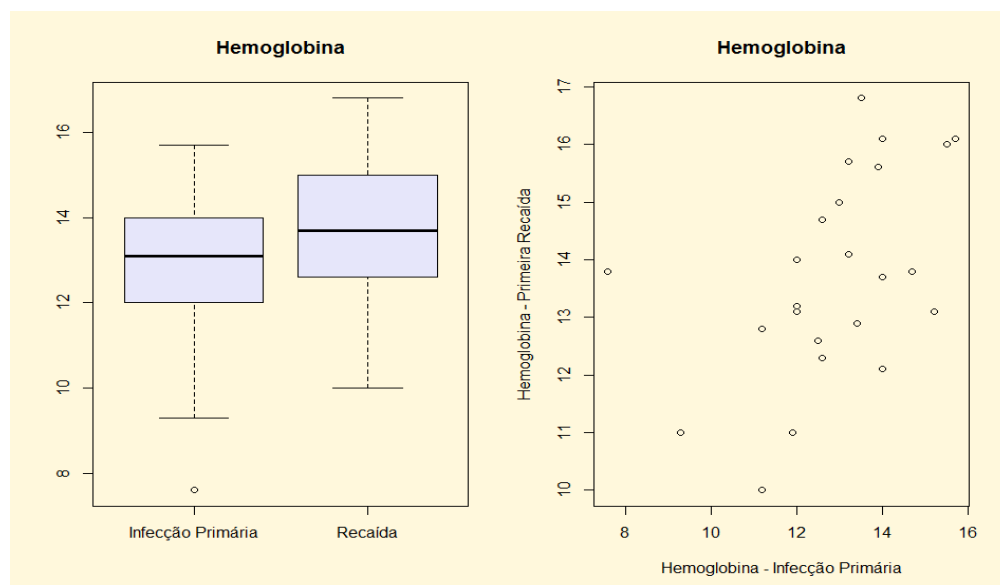


Figura 26. Níveis de hemoglobina nos diferentes momentos da infecção. Foi aplicado o Teste T de Student para dados pareados: p-valor= 0,0264 onde foi observado que há diferença entre os grupos, em relação à hemoglobina média e correlação linear moderada de 0,49 entre primária-recaída (Teste de correlação de Pearson: p-valor: 0,01418)

5.9 Análise da resposta imune humoral contra os principais antígenos de *P. vivax* nas amostras pareadas de infecções primárias e recaídas

Os índices de reatividade foram comparados na busca de diferença de resposta imune nos episódios de recaída em relação aos da infecção primária.

Para os dados das proteínas DBP e AMA-1 que seguiram uma distribuição normal foi utilizado o teste T para amostras pareadas.

Na avaliação da resposta contra a DBP não foi observada uma diferença significativa entre os dois grupos ($p = 0,8762$) (figura 27).

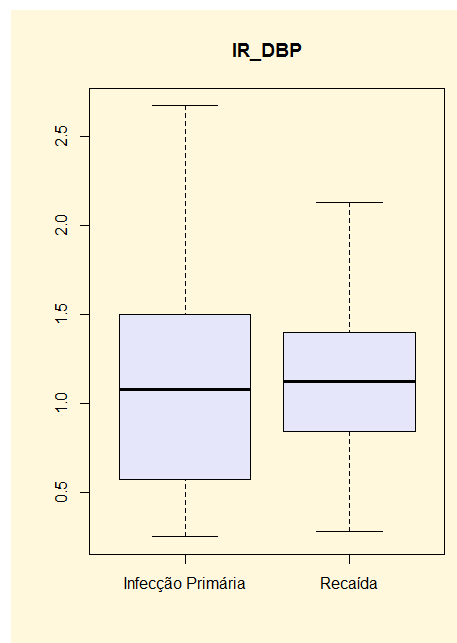


Figura 27. Índice de reatividade contra a Duffy Binding Protein em amostras pareadas. O Teste de t de Student para dados pareados mostra que não há diferença entre os grupos, em relação ao índice de reatividade (p-valor=0,8762).

Em relação ao antígeno de membrana apical (AMA-1), a variável segue distribuição normal apenas no grupo de recaídas, porém não foi observada diferença significativa entre os níveis de reatividade entre os grupos de primárias e recaídas ($p = 0,4201$) (figura 28).

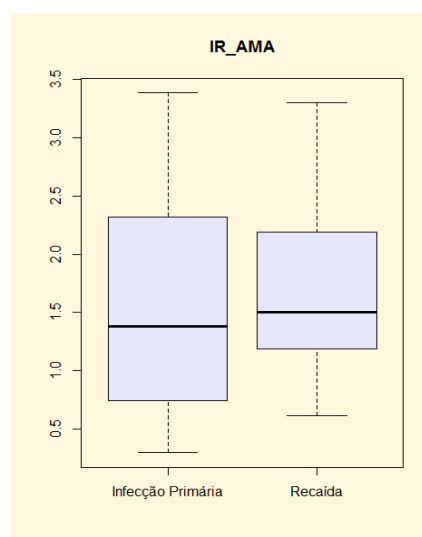


Figura 28. Índice de reatividade ao Antígeno de Membrana Apical em amostras pareadas. O Teste Wilcoxon para dados pareados mostra que não há diferença entre os grupos, em relação ao índice de reatividade (p-valor=0,4201).

Os dados dos testes para a proteína MSP1 não seguiram uma distribuição normal, sendo utilizado o teste Wilcoxon para amostras pareadas, porém não foi encontrada diferença significativa entre os grupos ($p = 0,6528$) (figura 29).

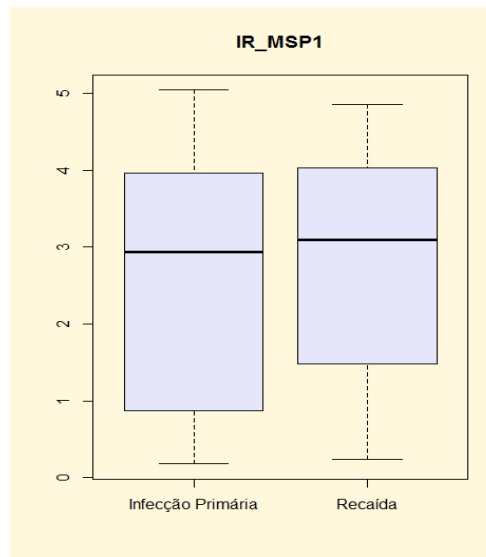


Figura 29. Índice de reatividade à Proteína de Superfície do Merozoíto em amostras pareadas. O Teste Wilcoxon para dados pareados mostra que não há diferença entre os grupos, em relação ao índice de reatividade (p -valor=0,6528).

5.10 Associações entre as variáveis

As variáveis foram selecionadas para avaliação de associação entre si dentro dos grupos de infecções primárias e recaídas. Foi utilizado o teste de Correlação de Spearman para avaliação das associações. Elas foram separadas entre o grupo de infecções primárias e recaídas avaliando as variáveis de: i) Dosagem de hepcidina; ii) idade; iii) parasitemia; iv) níveis de hemoglobina; v) níveis de ferro; vi) níveis de ferritina; vii) Índice de reatividade à Duffy Binding Protein (DBP); viii) Índice de reatividade à Proteína de Superfície do Merozoíto (MSP1); ix) Índice de reatividade ao antígeno de Membrana Apical.

Foram encontradas quatro associações positivas no grupo de infecções primárias e cinco no grupo de recaídas. Também foi observada uma associação negativa no grupo de recaídas (Tabela 4).

Tabela 4. Associações entre variáveis nos grupos de infecções primárias e recaídas avaliadas no teste de Correlação de Spearman.

Tipo de infecção	Variáveis associadas	Tipo de associação	Coefficiente de correlação	p-valor
Primária	Parasitemia e Índice de Reatividade contra AMA-1	Positiva	0,38	0,05337
Primária	Índice de reatividade contra DBP e Índice de reatividade contra MSP1	Positiva	0,68	0,0000828
Primária	Índice de reatividade contra MSP1 e Índice de reatividade contra AMA1	Positiva	0,95	2,47 ⁻¹⁴
Primária	Índice de reatividade contra DBP e Índice de reatividade contra AMA1	Positiva	0,61	0,001044
Recaídas	Idade e parasitemia	Positiva	0,56	0,002554
Recaídas	Hemoglobina e ferro	Positiva	0,62	0,001215
Recaídas	Hemoglobina e Índice de Reatividade contra DBP	Negativa	-0,41	0,04405
Recaídas	Índice de reatividade contra DBP e Índice de reatividade à MSP1	Positiva	0,45	0,01736
Recaídas	Índice de reatividade contra DBP e Índice de reatividade contra AMA1	Positiva	0,88	1,12 ⁻⁰⁹
Recaídas	Índice de reatividade contra MSP1 e Índice de reatividade contra AMA1	Positiva	0,57	0,00213

6 DISCUSSÃO

6.1 Caracterização molecular de isolados de *P. vivax* em amostras pareadas

A partir dos resultados de intervalo de ocorrência de recaídas nos pacientes deste estudo, observa-se que, no Brasil, o perfil dos parasitos causadores da malária por *Plasmodium vivax* é correspondente às cepas de regiões tropicais (Chesson) com frequentes recaídas que ocorrem em curtos intervalos de latência (Coatney *et al.*, 1950; Shute *et al.*, 1976).

O estudo das recaídas é complexo por vários fatores como dificuldade de distinção de uma recaída de outras origens de recidivas da malária causada pelo *P. vivax* como a recrudescência e a reinfecção. Os principais estudos moleculares das recaídas utilizam amostras de pacientes residentes em áreas endêmicas para a doença, o que aumenta a possibilidade da recidiva ter sido causada por uma reinfecção e dificulta a garantia de que as amostras estudadas sejam originadas da ativação das formas latentes de *P. vivax*. Neste estudo, os critérios de inclusão de amostras estabelecidos excluem a possibilidade de ocorrência de recrudescência e reinfecção, entretanto limita o número de amostras, o que dificulta a realização de algumas análises estatísticas importantes.

Em estudos moleculares de recaídas por *P. vivax* utilizando microsatélites foi visto que a diversidade genética dos parasitos era elevada e que as recaídas resultam de hipnozoítos geneticamente distintos (heterólogos) dos parasitos da infecção primária (Imwong *et al.*, 2007; Restrepo *et al.*, 2011), o que também foi demonstrado em amostras brasileiras por Orjuéla-Sanchez e colaboradores em 2009, em área de baixa endemicidade para a doença. Utilizando 14 microsatélites, os autores encontraram em 28 amostras pareadas, de infecção primária e recaída, apenas dois pares de amostras com haplótipos idênticos e 4 pares de amostras com haplótipos relacionados considerando os alelos predominantes, porém neste estudo e em quase todos os estudos publicados as amostras utilizadas são originadas de pacientes de área endêmica, o que dificulta a exclusão de uma nova infecção.

Os resultados apresentados neste trabalho reforçam os dados da literatura de uma ativação heteróloga de hipnozoítos. Van Den Eede e colaboradores (2010) encontrou essa ativação heteróloga em 83% dos 16 pacientes que apresentaram

recidivas em estudo de amostras do Vietnã. Imwong e colaboradores (2007) também encontra uma prevalência de ativação heteróloga em amostras da Tailândia e Myanmar. Analisando 58 amostras da Colômbia, Restrepo e colaboradores (2011) encontraram 54 diferentes haplótipos de amostras pareadas. Além disso, demonstrou que alguns haplótipos são exclusivos de área endêmica, o que pode sugerir a existência de padrões distintos de recaída de acordo com a taxa de transmissão e endemicidade da ocorrência de infecções por determinada cepa de parasito. É importante considerar a ocorrência de infecções múltiplas não somente nas infecções primárias, mas também nas recaídas. Essas infecções múltiplas aumentam a complexidade da definição de uma ativação heteróloga de hipnozoítos, visto que diferentes variantes podem estar presentes nas infecções e o mesmo parasito de uma primeira infecção pode ser encontrado nos episódios subsequentes de recaída, porém em baixa frequência.

As análises de múltiplas recaídas bem como a utilização de uma técnica que pode ser considerada padrão ouro para definição de infecção múltipla (clonagem) sugerem um fenômeno de flutuação da predominância de alelos nos diferentes momentos das infecções e que parasitos geneticamente idênticos podem ser encontrados em ambas as infecções, porém em frequências distintas. Koepfli e colaboradores (2009) também descrevem esse efeito de flutuação de predominância de alelos durante o curso de uma infecção causada pelo *P. vivax*. Van Den Eede e colaboradores (2011) reforçam essa hipótese de ressurgimento de genótipos durante as recorrências da doença em análise de pacientes na Amazônia Peruviana.

Estudos recentes tem mostrado que a primeira recaída da vida do indivíduo geralmente é originada de uma ativação homóloga (Imwong *et al.*, 2012), o que também foi observado neste trabalho a partir da avaliação de pacientes primoinfectados. Em 5 dos 7 pacientes foi observada ativação homóloga de hipnozoítos. Entretanto, infecções por *P. vivax* geralmente são multiclonais, ou seja, são encontradas mais de uma variante do parasito em uma mesma infecção, que pode ser proveniente da inoculação das diferentes variantes por um mesmo inseto vetor ou pela inoculação de variantes distintas por picadas de mais de um vetor. Essas ocorrências dificultam o entendimento e a definição do mecanismo de ativação dos hipnozoítos que não se sabe se são por ordem de ativação, sendo heterólogos ativados primeiro o que explicaria sua prevalência nas recaídas ou se

estão relacionadas ao número de parasitos homólogos/heterólogos que são ativados.

Um ponto importante a ser considerado foi a alta diversidade haplotípica encontrada pelo nosso grupo e por outros autores (Orjuela-Sánchez *et al.*, 2009). Para construção dos haplótipos foi considerado apenas o alelo predominante da infecção (pico com maior nível de fluorescência na genotipagem), entretanto após a realização da clonagem foi observada a presença de até 4 alelos por infecção, analisando até 40 colônias por produto clonado. Esses resultados nos levaram a questionar qual o melhor critério para definição de uma infecção múltipla. Neste trabalho para definição de um alelo foi considerado um cut-off mínimo de fluorescência de 150 rFu (unidades arbitrárias de fluorescência). Outros autores estabelecem os critérios de que um segundo pico na análise de eletroferograma para ser considerado um alelo deve ter uma altura mínima de 25 ou 33% em relação à altura do pico de maior fluorescência, considerado o alelo predominante da infecção (Anderson *et al.*, 1999; 2000). Dependendo do critério utilizado para determinação de infecção múltipla alguns dados importantes podem ser perdidos na análise e os critérios utilizados por outros autores podem não considerar alelos presentes em baixas frequências em uma determinada infecção. Utilizando o critério de cut-off mínimo de 150rFu e 5 dos 10 marcadores deste estudo foi possível fazer a identificação de todas as infecções múltiplas nas amostras analisadas, uma metodologia que diminuiria os custos e o tempo de trabalho na detecção de uma infecção múltipla e que poderia ser útil no diagnóstico desse tipo de infecção e nos futuros estudos de recaídas por *Plasmodium vivax*.

6.2 A influência da homeostase do ferro no desenvolvimento das recaídas

O ciclo de vida do parasito inclui uma fase sanguínea no hospedeiro na qual ele invade as hemácias, se desenvolve e as destrói para liberação de mais parasitos. A destruição massiva de hemácias desencadeia sintomas frequentes da malária como febre e anemia. A anemia caracterizada pela diminuição dos níveis de hemoglobina circulante é um dos sintomas responsáveis pela elevada morbidade conhecida da doença.

A anemia pode ter várias causas dentre elas a deficiência de ferro tanto do ponto de vista circulante quanto do ferro estocado na forma de ferritina (Anemia ferropriva) e a pela liberação aumentada de citocinas inflamatórias que levam a uma elevação da produção de moléculas reguladoras da homeostasia do ferro, como a hepcidina (Anemia por inflamação), gerando uma restrição do mesmo no plasma causada pelo sequestro do metal por macrófagos, enterócitos e hepatócitos (Howard *et al.*, 2007).

A relação entre a hepcidina e a malária ainda é pouco estudada, porém alguns estudos mostram um aumento dos níveis desse hormônio durante a infecção malárica. Analisando 91 crianças da Indonésia acometidas por malária, de Mast e colaboradores (2010) observaram que infecções assintomáticas por *P. vivax* e *P. falciparum* levam a um aumento nos níveis de hepcidina. Em 2009, o mesmo autor observou esse efeito de aumento dos níveis do hormônio, porém com dosagem feita em urina, em crianças anêmicas da Tanzânia acometidas por malária causada pelo *P. falciparum* (de Mast *et al.*, 2009). Infecções assintomáticas por *P. falciparum* diminuem em 40% a absorção de ferro pelos enterócitos através da hepcidina (Cercamondi *et al.*, 2010). Outro estudo interessante avalia o efeito da hepcidina em camundongos infectados com *Plasmodium berghei*. Através da utilização de anticorpos neutralizantes de hepcidina foi descrito um aumento nas taxas de mortalidade e parasitemia dos camundongos, entretanto uma superexpressão de hepcidina regula o grau da infecção desses camundongos demonstrando um papel protetor da hepcidina contra a malária (Wang *et al.*, 2011)

A maior parte dos estudos que avaliam a relação entre hepcidina e malária utilizam amostras de pacientes infectados por *P. falciparum*. Não foram encontrados dados na literatura da relação entre a hepcidina e as recaídas de malária por *P. vivax*, porém nossa hipótese foi de que este hormônio estava envolvido no desenvolvimento da recaída da doença. Neste trabalho, os níveis de hepcidina foram menores nas recaídas em relação às infecções primárias. Assim, a redução nos níveis de hepcidina aumentaria disponibilidade de ferro nos hepatócitos para desenvolvimento dos hipnozoítos, os níveis de ferro e de ferritina nas recaídas apresentaram-se aumentados, as dosagens de hemoglobina apresentaram-se significativamente aumentadas. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre a maior parte destes níveis nas infecções primárias e nas

recaídas dos pacientes deste trabalho (significância de 5%). O reduzido número de amostras, pela dificuldade de sua obtenção, pode ter sido um fator limitante nestas análises estatísticas.

Nemeth e colaboradores (2003) demonstraram que os níveis de hepcidina estão bem correlacionados aos níveis de ferro, hemoglobina e ferritina, entretanto essa correlação não foi observada neste estudo, porém é importante destacar que os níveis de hepcidina tanto nas infecções primárias quanto nas recaídas se apresentam em valores acima dos valores de referência (Mulheres: 17-286 ng/ml; Homens: 29-254 ng/ml).

Como não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de hepcidina nos questionamos se substituições nas sequências de aminoácidos da proteínas poderiam justificar diferenças na atividade do hormônio, por isso sequenciamos apenas sua porção madura. Mutações nesse gene não são comuns (Ganz, 2011), porém algumas já foram descritas por Santos e colaboradores (2010), Porto e colaboradores (2005) e outros; e podem estar relacionadas ao desenvolvimento de hemocromatose hereditária (Hattori *et al.*, 2011), doença relacionada a uma desordem na disponibilidade de ferro no organismo.

Na comparação dos grupos de infecção primária e recaída, nota-se que os níveis de hemoglobina nas recaídas se apresentam maiores em relação às infecções primárias mesmo com os níveis de parasitemia sendo muito semelhantes.

Em relação ao grupo de infecções primária, foram encontradas algumas associações interessantes entre as variáveis de estudo. Uma primeira associação positiva entre a parasitemia e o índice de reatividade contra o Antígeno de Membrana Apical (AMA1), sugere que o desenvolvimento de resposta imunológica ao antígeno é dependente da carga parasitária. Bueno e colaboradores (2010) ao estudar células polimorfonucleares demonstra que existe um aumento de células T reguladoras e de moléculas expressas por elas possivelmente incluindo citocinas nas infecções maláricas e esse aumento está associado à carga parasitária, estudo este utilizando a proteína recombinante PvAMA-1.

O aumento das células reguladoras e da liberação de citocinas bem como a inflamação desencadeada pela infecção pelo parasito podem influenciar diretamente o número de leucócitos no hospedeiro na tentativa de responder imunologicamente ao parasito. Porém, estas situações aumentam o processo de ruptura dos eritrócitos

(Anstey, 2009) e aumentam a liberação do hormônio hepcidina como também inibem o processo de eritropoiese, diminuindo a formação e disponibilidade de hemoglobina e levando a um quadro de anemia do paciente. Na malária as contagens de leucócitos são geralmente menores que os valores referência, tanto para *P. falciparum* quanto *P. vivax* (McKensie *et al.*, 2008). Após o tratamento, a regularização do número de leucócitos e a modulação da resposta imune refletem na diminuição da liberação do hormônio hepcidina, aumentando disponibilidade de ferro circulante. Esses efeitos estimulam o processo de eritropoiese e, consequentemente elevando o nível de hemoglobina nos pacientes.

Em relação aos índices de reatividade de anticorpos contra os principais antígenos da malária, interessante observar que não houve diferença entre os índices de reatividade no grupo de infecções primárias comparados aos da recaída. Isto sugere que a resposta imune contra estes antígenos pode ser influenciada por outros fatores além simplesmente da infecção primária ou recaída. Porém os índices de reatividade contra os antígenos estão associados entre si dentro dos grupos, o que pode indicar fatores do hospedeiro indicando uma propensão a ser altamente reativo a diferentes antígenos, como por exemplo, a ocorrência de polimorfismos em genes correlacionados à resposta imune.

No grupo das recaídas foi observado um número maior de associações do que no grupo de infecções primárias. A associação positiva entre idade e parasitemia difere das infecções maláricas, que, de modo geral, apresenta uma diminuição da parasitemia com a idade, de acordo com o desenvolvimento de uma imunidade antiparasitária. Nas recaídas o aumento da idade relacionado ao aumento da parasitemia pode significar que esta seja uma característica relacionada ao desenvolvimento das recaídas, pacientes com o aumento da idade que não conseguem controlar a parasitemia por alguma característica intrínseca ao paciente tais como falha na resposta imune podem estar predispostos a terem recaídas.

O quadro clínico do paciente é avaliado dentre outros fatores, pelos sintomas que apresenta. Um desses sintomas, a anemia, é avaliada pelos níveis de hemoglobina e ferro disponíveis no organismo. Foi observada uma associação positiva entre os níveis de hemoglobina e ferro nas recaídas. O ferro é um metal essencial para formação da molécula de hemoglobina e sua disponibilidade na corrente sanguínea pode interferir diretamente na formação do grupamento heme

(Lynch, 2011). Os níveis de hemoglobina, como já discutido, também podem ser influenciados pela resposta inflamatória do indivíduo, visto que esta desencadeia a liberação de hepcidina com consequente inibição de eritropoiese e sequestro de ferro nos macrófagos, o que diminuiria a produção de hemoglobina. A associação negativa entre o nível de hemoglobina e os índices de reatividade contra a Duffy Binding Protein (DBP) pode ser multifatorial como alguns parâmetros não evidenciados na análise influenciando diretamente na resposta ao antígeno ou nos níveis de hemoglobina como a parasitemia, níveis de citocinas inflamatórias, hematócrito, e indiretamente nesses resultados. Outra hipótese seria que a reação imunológica contra antígenos diminui os níveis de hemoglobina circulantes, pelo sequestro do ferro, o que evidencia a importância da modulação da resposta imune no desenvolvimento clínico e prognóstico do paciente.

Este trabalho reforça a necessidade de novos estudos relacionados à malária causada pelo *P. vivax* e suas posteriores recaídas, que poderão contribuir para elucidação dos mecanismos de ativação dos hipnozoítos e posteriormente o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que diminuirão os índices de transmissão da doença.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foi avaliada a variabilidade genética de isolados de *Plasmodium vivax* provenientes de amostras pareadas de pacientes infectados e a associação da homeostase do ferro no desenvolvimento das recaídas. Uma parte dos pacientes foi clinicamente acompanhados no Hospital Universitário Júlio Muller/MT localizado em área onde não há transmissão ativa da doença e que, após cura e desaparecimento de parasitemia sanguínea com o tratamento recomendado, apresentaram episódio (s) de recaída(s) da malária vivax. Devido à ocorrência de alguns pacientes com múltiplos episódios de recaída, este estudo pode ser uma evidência de falha terapêutica pela primaquina, porém estudos de dosagem plasmáticas da droga são necessários para confirmação desse dado.

Utilizando os critérios de inclusão das amostras foi possível excluir a possibilidade de que as recorrências têm como sua origem a recrudescência ou uma nova infecção, fatores que poderiam interferir nas análises de recaídas e dificultariam a interpretação dos dados.

Utilizando a técnica de eletroforese capilar e um painel de 10 diferentes marcadores moleculares foi possível identificar infecções múltiplas em episódios sintomáticos e diferenciar, nas infecções múltiplas, os alelos provenientes de parasitos distintos pelo tamanho dos fragmentos e pela intensidade de fluorescência gerados pela leitura do sequenciador automático.

Este trabalho foi pioneiro em identificar múltiplas infecções nos episódios de recaída, e o alelo da infecção primária geralmente estava presente nos episódios de recaída, na maioria das vezes não como alelo predominante.

A ativação de hipnozoítos é principalmente heteróloga, mas os haplótipos são altamente relacionados devido à limitada disponibilidade de alelos, sendo gerados provavelmente por recombinação entre os alelos. Tanto nas análises que utilizam somente o alelo predominante quanto nas análises que utilizam todos os alelos identificados, os parasitos das recaídas possuem, em sua maioria, alelos com tamanhos idênticos em relação aos parasitos da infecção primária e que infecções múltiplas são muito comuns, como relatado por outros autores (Havryliuk *et al*, 2009). Com apenas 5 marcadores moleculares utilizados neste estudo, consegue-se

identificar todas as infecções múltiplas nas infecções, sendo que com 2 marcadores já consegue-se identificar cerca de 90% das infecções múltiplas.

Nos pacientes que apresentaram mais de um episódio de recaída foi possível observar uma flutuação no nível dos clones parasitários circulantes. Para confirmar essa hipótese, coletas venosas em dias consecutivos dos pacientes infectados seriam necessárias para verificar se os níveis de clones circulantes variam de acordo com o ciclo biológico de cada clone.

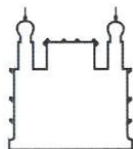
Através da técnica de clonagem e posterior genotipagem foi possível identificar infecções com até 4 parasitos distintos. Outro ponto importante é que foi possível verificar que a detecção de alelos raros baseada na proporção dos níveis de fluorescência em relação aos alelos predominantes devido à grande variação na fluorescência máxima dos picos. Assim, estas estratégias estão subestimando as infecções múltiplas que puderam ser confirmadas na clonagem dos fragmentos. Entretanto, a alta taxa de infecções múltiplas e a alta diversidade haplotípica dificultam a identificação de um marcador específico das recaídas e o entendimento dos mecanismos de ativação dos hipnozoítos. A realização de biópsias hepáticas seria uma das estratégias para esclarecer estes mecanismos, porém, tal técnica se torna inviável em humanos infectados devido a questões éticas e de saúde e os modelos animais também não são de fácil utilização. Outra possibilidade seria o desenvolvimento de um modelo *in vitro* para estudo de hipnozoítos em cultivo de células hepáticas onde seria possível identificar os fatores responsáveis pelo direcionamento de latência.

A presença de infecções múltiplas tanto nas infecções primárias quanto nas recaídas sugere que mecanismos do hospedeiro estejam envolvidos no processo de ativação dos hipnozoítos, como, por exemplo, a disponibilidade de ferro no organismo. Essa hipótese da influência do ferro como um mecanismo de ativação de hipnozoítos foi testada neste trabalho, a partir de dosagens bioquímicas e sorológicas de moléculas envolvidas no processo de homeostasia do ferro, particularmente de uma de suas principais reguladoras, a hepcidina. Não foram observadas diferenças significativas entre os parâmetros bioquímicos, hematológicos e sorológicos quando comparados os grupos de infecções primárias e recaídas. Para avaliar se o desenvolvimento de recaídas estaria relacionado à estrutura e composição da hepcidina o gene *hamp* codificador dessa proteína foi

sequenciado. Para essa análise também foram utilizadas amostras de áreas endêmicas de pacientes ativamente acompanhados e que apresentaram ou não episódios de recaída para busca de polimorfismos no gene codificador da hepcidina que pudessem estar relacionados à recaída. Entretanto o gene se apresentou muito conservado, o que não exclui a hepcidina de ter um papel no desenvolvimento das recaídas, porém esses dados sugerem a participação e influência de outras moléculas no processo de ativação dos hipnozoítos.

Os resultados apresentados são de grande relevância para o entendimento da biologia do parasito que envolve fatores imprescindíveis para o mapeamento de determinantes que contribuem com importantes fenótipos do parasito, tais como o padrão de recaídas, resistência às drogas e variabilidade antigênica.

7.1 ANEXO 1- Carta de Aprovação n.º 08/2010 - CEP/CPqRR



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Comitê de Ética



CARTA DE APROVAÇÃO Nº 08/2010 – CEP / CPqRR

Protocolo CEP - CPqRR nº: 05/2010

Projeto de Pesquisa: "Estudo da estrutura das populações de *Plasmodium vivax* circulantes em áreas endêmicas do Brasil". GIII. (Sub-projeto relativo ao Protocolo CEP – CPqRR Nº 05/2006).

Pesquisador Responsável: Cristiane F. Alves de Brito

Instituição Realizadora: Centro de Pesquisa René Rachou

CAAE: 0009.0.245.000-10

Ao se proceder à análise o protocolo em questão, constatou-se que o estudo atende aos aspectos fundamentais da Resolução CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo Seres Humanos do Centro de Pesquisa René Rachou / FIOCRUZ, de acordo com as atribuições da Resolução 196/96 CNS / CONEP, manifesta-se pela homologação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: **PROJETO APROVADO.**

Firma-se diante deste documento a necessidade de serem apresentados os relatórios:

- Parcial 01: Abril 2011;
- Parcial 02: Abril 2012;
- Final: Abril 2013.

Bem como a notificação de eventos adversos, de emendas ou modificações no protocolo para apreciação do CEP.

Belo Horizonte, 29 de Março de 2010.



João Carlos Pinto Dias
Coordenador do CEP/SH-CPqRR

Dr. João Carlos Pinto Dias
COORDENADOR
COMITÊ DE ÉTICA

Av. Augusto de Lima, 1715 Barro Preto 30190-002, Belo Horizonte – MG - Brasil
Tel.: 55 0xx31 3295 3566 (ramal 181) Fax: 55 0xx31 3295 3115 <http://www.cpqrr.fiocruz.br>

Multiple-Clone Activation of Hypnozoites Is the Leading Cause of Relapse in *Plasmodium vivax* Infection

Flávia Carolina F. de Araujo¹, Antônio Mauro de Rezende², Cor Jesus F. Fontes³, Luzia Helena Carvalho¹, Cristiana F. Alves de Brito^{1*}

1 Laboratory of Malaria, Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Laboratory of Cellular and Molecular Parasitology, Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **3** Hospital Universitário Júlio Muller, UFMT, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil

Abstract

Background: *Plasmodium vivax* infection is characterized by a dormant hepatic stage, the hypnozoite that is activated at varying periods of time after clearance of the primary acute blood-stage, resulting in relapse. Differentiation between treatment failure and new infections requires characterization of initial infections, relapses, and clone multiplicity in vivax malaria infections.

Methodology/Principal Findings: Parasite DNA obtained from primary/relapse paired blood samples of 30 patients with *P. vivax* infection in Brazil was analyzed using 10 molecular markers (8 microsatellites and MSP-1 blocks 2 and 10). Cloning of PCR products and genotyping was used to identify low-frequency clones of parasites. We demonstrated a high frequency of multiple-clone infections in both primary and relapse infections. Few alleles were identified per locus, but the combination of these alleles produced many haplotypes. Consequently, the majority of parasites involved in relapse showed haplotypes that were distinct from those of primary infections. *Plasmodium vivax* relapse was characterized by temporal variations in the predominant parasite clones.

Conclusions/Significance: The high rate of low frequency alleles observed in both primary and relapse infections, along with temporal variation in the predominant alleles, might be the source of reported heterologous hypnozoite activation. Our findings complicate the concept of heterologous activation, suggesting the involvement of undetermined mechanisms based on host or environmental factors in the simultaneous activation of multiple clones of hypnozoites.

Citation: de Araujo FCF, de Rezende AM, Fontes CJF, Carvalho LH, Alves de Brito CF (2012) Multiple-Clone Activation of Hypnozoites Is the Leading Cause of Relapse in *Plasmodium vivax* Infection. PLoS ONE 7(11): e49871. doi:10.1371/journal.pone.0049871

Editor: Mauricio Martins Rodrigues, Federal University of São Paulo, Brazil

Received: May 3, 2012; **Accepted:** October 15, 2012; **Published:** November 21, 2012

Copyright: © 2012 de Araujo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Pronex malaria network: CNPq/Ministry of Health-DECIT; FAPEMAT; and FAPEMIG. CAB, LHC and CJF were supported by CNPq fellowships. FFA and AMR are supported by scholarships from CNPq and Fapemig, respectively. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: cristiana@cpqrr.fiocruz.br

Introduction

Malaria is a blood disease caused by protozoan parasites. The source of human infection is mainly *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* [1]. Approximately 225 million malaria cases and 780 000 deaths occurred in 2009, and 40% of the world population lives at risk of infection [2,3]. *Plasmodium vivax* is the most widespread human malaria parasite and is the main source of malaria morbidity outside Africa [4]. In Brazil, roughly 350 000 cases of the disease are registered each year, 99% of which are in the Amazon region, and mainly *P. vivax* infections [5].

Plasmodium vivax is characterized by persistence of dormant parasite forms, the hypnozoites, in the liver for varying periods of time after clearance of the primary acute blood-stage. In general, while parasites from tropical zones, such as the Chesson strain, exhibit a short latent period before frequent episodes of relapse; parasites from temperate zones, such as the St Elizabeth strain, show a long latent period succeeded by few relapses [6]. In some areas, for example India, a mixed relapse pattern has been described [7]. These findings suggest regulation of relapse pattern, perhaps based on genetic programming of the parasites. Although

the mechanisms that control relapses and determine their periodicity are largely unknown, many factors seem to contribute to both the timing and number of relapses. Previous studies have demonstrated that the number of sporozoites inoculated by the anopheline mosquito is a relevant factor [8,9]. Other factors suggested in hypnozoite activation are (i) a previous *P. falciparum* infection [10]; (ii) the influence of vectors – occurrence of mosquito bites and anopheline species involved in these bites [6,11]; (iii) systemic *P. vivax* febrile illness [12]; (iv) host immune response [13,14]; (v) drug treatments [15,16]; and (vi) regional variations, e.g. disease seasonality, latitude, altitude [17–19].

Elucidation of the source of recurrent infections is a challenge, since they can result from the asexual blood-stage re-emerging after treatment (recrudescence), from new infections, or from relapses caused by hypnozoite activation. In endemic locations, the probability of relapse varies from 20 to 80% [20]; with a current average of around 30% in tropical areas [6,21,22]. Thus, relapses have important implications for the control of *P. vivax* and also for the evaluation of drug treatment efficacy [23].

The molecular characterization of parasites of primary and recurrent infections is a crucial tool for adequately defining the epidemiology of relapse. Molecular markers have been used to genotype paired parasite DNA samples from primary episodes and relapses, and these have shown genetically similar or homologous parasites [24–26]. More recently, a predominance of heterologous parasites (parasites genetically different) has been demonstrated in relapses [21,27–29]. The latter studies were based on microsatellite analyses, which are highly polymorphic and, in general, are not under selective pressure.

The genotyping of microsatellites has revealed a high frequency of multiple-clone *P. vivax*, i.e. individuals harboring more than one genetically distinct parasite, in areas with different levels of transmission [30–32]. Therefore, relapses may originate from activation of parasite clones identical to those of the primary infections (homologous parasites) or genetically distinct clones (heterologous parasites), making the task of identification of the relapse source difficult. In this study, we hypothesized that the multiple-clone infections usually described for *P. vivax* infections should also be frequent in relapses. To determine if this is true we carried out analysis of the genetic diversity of parasite DNA samples obtained from paired primary/relapse blood samples of *P. vivax*-infected patients who received antimalarial treatment (chloroquine plus primaquine) and were not subsequently exposed to *P. vivax* re-infection (to exclude novel infections).

Materials and Methods

Study Samples and Area

Parasite DNA samples were selected from a cryopreserved bank and kept at the Laboratory of Malaria at the Centro de Pesquisas René Rachou - Fiocruz, Belo Horizonte, MG. The following criteria were used to select 30 patients for primary/relapse paired DNA sampling: (i) an interval between the first acute episode and recurrence of 30 days to 12 months; (ii) *P. vivax* patients who were not re-exposed to malaria transmission during the interval between infection episodes; (iii) pregnant women were excluded; (iv) absence of other *Plasmodium* infection; and (v) a minimum age of 14 years. Thirty *P. vivax*-infected patients were selected (from 14–63 years, average age 37 years) whose malaria diagnosis and treatment were conducted at the Hospital Universitário Júlio Muller, UFMT, Cuiabá, MT, in the years 2001 to 2009 (Table S1). All patients were treated according to contemporary therapy guidelines of the Ministry of Health of Brazil (MS/SVS) with chloroquine (25 mg/kg/day for 3 days) and primaquine (0.5 mg/kg/day for 7 days) [33]. The patients provided written consent to store and analyze their blood samples in accordance with guidelines for human research as specified by the Brazilian National Council of Health (Resolution 196/96). This study was approved by the ethical committee of the Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz): protocol numbers 05/2006 and 05/2010. Written consent was obtained from parents or guardians on the behalf of the minors participating in the study, as approved by the institutional ethics committee. Primary infection was defined by microscopic diagnosis of *P. vivax* at first admission of the individual to the hospital. Seven of the 30 patients reported it as their first malaria infection of life. Since the hospital is located in a non-endemic area for malaria, the locations of infection acquisition were widely dispersed in the Amazon area, at an average distance of 1,205 km from the hospital. The interval between relapse and primary infection or last acute malaria episode (for 2nd and 3th relapses) ranged from 31 to 185 days and was mainly concentrated in a period of one to three months (average 2.3 months) (Figure S1).

DNA Extraction and PCR Amplification

DNA was extracted from whole blood samples using a genomic DNA purification kit (Puregene®, Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA) or from filter paper using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocols. Eight loci of microsatellites (MS01, MS02, MS04, MS05, MS06, MS07, MS08, and MS11) and two loci of MSP1 (block 2 and 10) were amplified using specific primers and conditions described by Rezende et al. [34] and Koepfli et al. [35]. The 8 microsatellites selected for this study were highly polymorphic and composed of di-, tri- and tetranucleotide repeat units [34]. All markers are specific to *P. vivax* genome. Polymerase Chain Reactions (PCR) were performed using a gradient thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). The melting temperatures and magnesium concentration ranged from 50 to 60°C and from 0.75 to 1.50 mM, respectively [34]. A reaction volume of 20 µl containing 20 pmol of each primer (forward and reverse), 0.125 mM of dNTP, 1× buffer, and 1 U platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) was used. The cycling parameters were set to: 1 cycle at 94°C for 2 min, 40 cycles of 94°C for 30s, 50–60°C for 20s, and 72°C for 30s; and a final cycle at 72°C for 2 min. To assess the amplification, products were visualized in agarose gels stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml).

Microsatellites and MSP1 Genotyping

Amplified PCR products using the forward primers labeled with fluorescein were separated and differentiated using capillary electrophoresis in the automatic DNA sequencer MegaBACE (Amersham Biosciences, GE Life Sciences, Buckinghamshire, England). Their lengths and relative abundance (peak heights in electropherogram) were determined using MegaBACE Fragment Profiler, version 1.2, software, by reference to internal size standards (MegaBACE ET550-R). We measured allele frequencies using the predominant allele at each locus per sample; non-predominant alleles were recorded and used to estimate multiplicity of infection, since all markers are single-copy loci, and blood-stage malaria parasites are haploid. The highest peak in the electropherogram was defined as the predominant allele, and other peaks that reached the minimum level for detection were defined as rare or low-frequency alleles in a multiple-clone infection. The detectable cut-off value for peak height was set to 150 arbitrary fluorescence units (rFU).

PCR Products Cloning

To determine the presence of low-frequency alleles in multiple infections, 32 PCR products from amplification of four primary/relapse paired DNA samples from infected patients were selected for cloning using two arbitrarily chosen markers. From those samples, the PCR products were cloned onto a pGEM-T Vector (Promega, Madison, USA), according to the manufacturer's protocol. Recombinant vectors were used to transform *Escherichia coli* Top10 strain using thermal shock [36], and the cells were plated in LB agar supplemented with ampicillin (50 µg/ml). Up to 26 colonies (mean 10) of each cloned product were selected for mini-prep plasmid extraction using the Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). The obtained DNA was measured in a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and used for parasite genotyping using the same two molecular markers. To check for multiple infections and possible slippage of the polymerase during amplification of the microsatellite, the size of the amplicons obtained from recombinant plasmids containing the cloned PCR products was compared with those from the original amplicons.

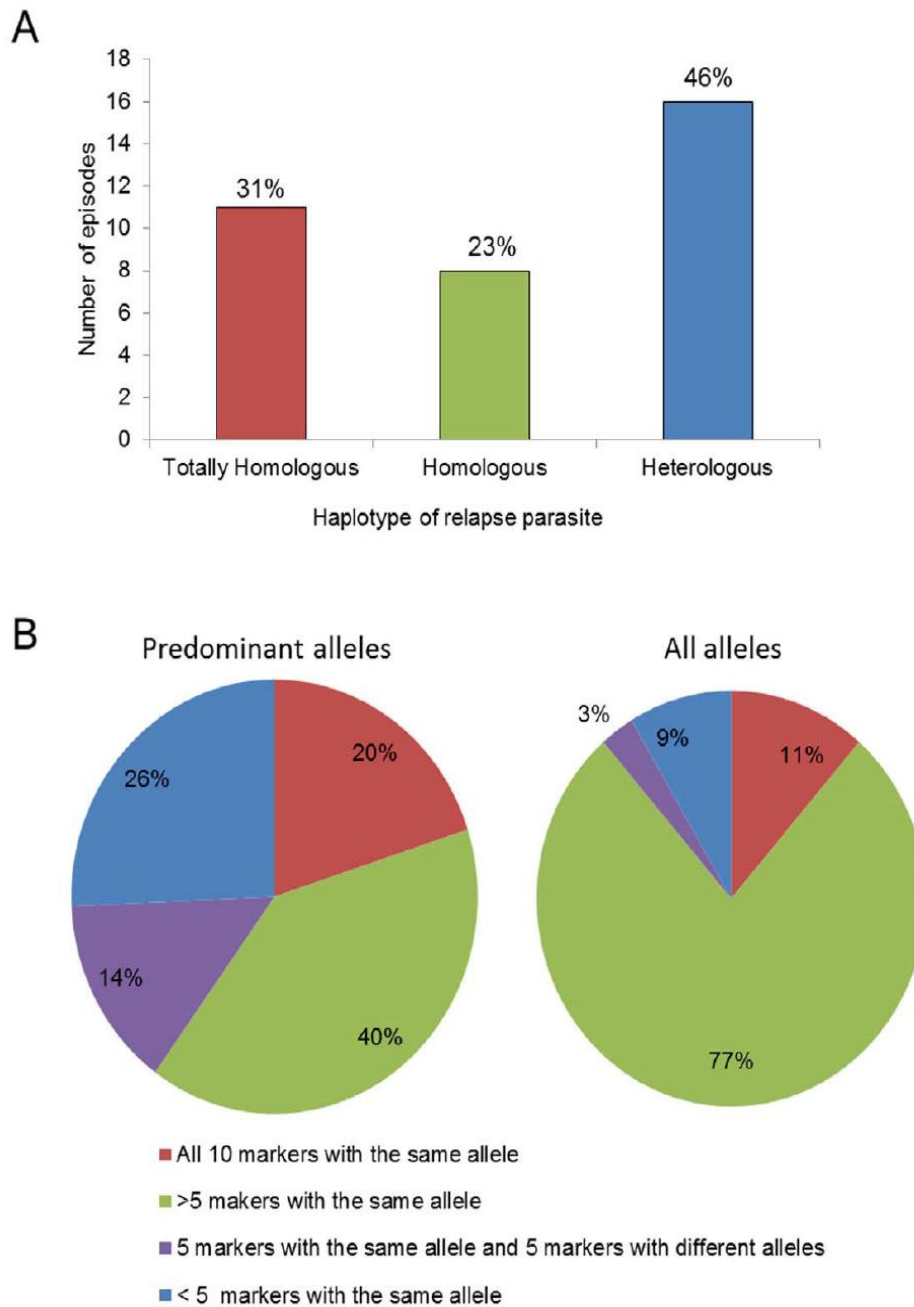


Figure 1. Genotyping of *P. vivax* primary/relapse paired parasites from 30 patients using 10 molecular markers. (A) Haplotype derived from predominant allele of each marker. Totally homologous – parasites showing all markers with the same allele; Homologous or Related – parasites with 8 to 9 markers with the same allele; Heterologous – parasites showing less than 8 markers with the same allele (according to Orjuela-Sánchez et al. [21]). In patients with more than one relapse episodes, relapse parasites were compared with the previous acute malaria episode. (B) Percent of acute malaria episodes showing different amounts of markers with the same alleles, taking into account only the predominant allele from each marker (left) or all alleles, predominant and rare from each marker (right). doi:10.1371/journal.pone.0049871.g001

Statistical Analysis

We calculated the gene diversity (expected heterozygosity, H_E), defined as the probability that a pair of alleles randomly obtained from the population differ, using Arlequin 3.0 software [37].

Genetic diversity of primary and relapse parasites was compared using analysis of molecular variance - AMOVA [38].

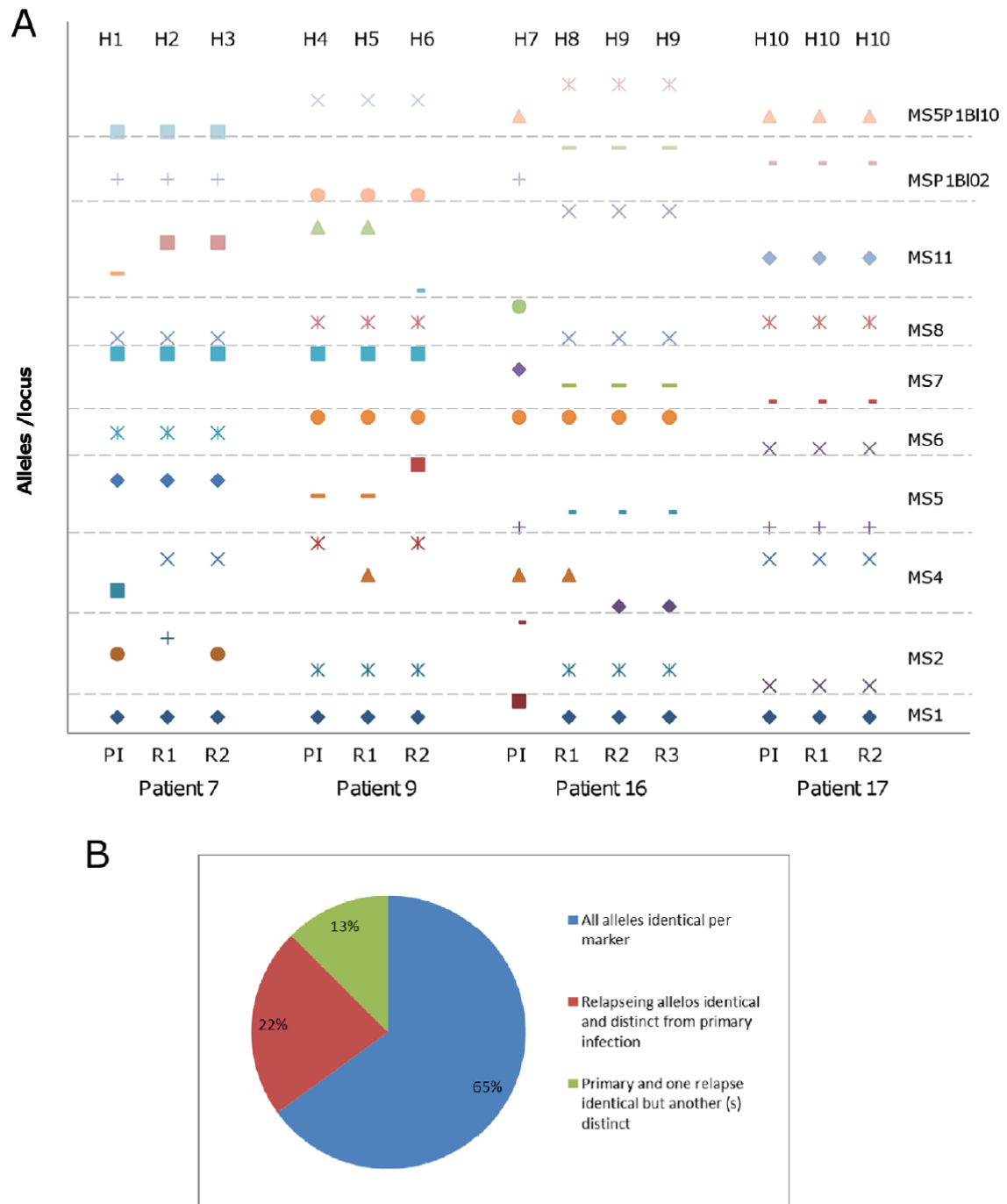


Figure 2. Temporal variation of the predominant alleles. (A) Comparison of predominant alleles among primary infection (PI), first relapse (R1), second relapse (R2), and third relapse (R3) from four *P. vivax*-infected patients genotyped using 10 molecular markers. Alleles are represented by different forms for each marker (indicated on the right side) and delimited by dotted lines. MS – microsatellite numbered according to Rezende et al. [36], MSP1b12 and MSP1b10– merozoite surface antigen 1 blocks 2 and 10, respectively. Haplotypes are indicated at the top of the Figure. (B) Frequencies of markers showing the same or distinct alleles at different times of blood collection for these four patients. doi:10.1371/journal.pone.0049871.g002

Table 1. Allele frequencies (%) and genetic variability of each molecular marker from *Plasmodium vivax* isolates.

Alleles	Percentage of episodes (%)									
	MS1	MS2	MS4	MS5	MS6	MS7	MS8	MS11	MSP1b12	MSP1b10
1	11	1	11	5	5	3	2	2	1	17
2	9	5	6	28	3	34	3	2	12	5
3	71	3	20	11	9	25	28	3	23	9
4	3	1	1	6	58	5	31	3	8	14
5	6	54	8	31	3	17	16	2	29	15
6		5	1	8	1	12	5	3	8	1
7		8	5	2	1	3	16	8	18	14
8		6	1	5	6	1		3		3
9		15	17	2	1			2		1
10		1	12	3	3			2		15
11			5		5			2		3
12			12		3			11		1
13								2		
14								6		
15								2		
16								2		
17								3		
18								2		
19								3		
20								3		
21								5		
22								2		
23								3		
24								3		
25								3		
26								3		
27								2		
28								8		
29								3		
30								2		
31								3		
Total	5	10	12	10	12	8	7	31	7	12
H_E	0.482	0.681	0.888	0.808	0.647	0.789	0.783	0.969	0.813	0.886

MS: microsatellites [36]; MSP1b12 and MSP1b10: merozoite surface protein 1 block 2 and 10; H_E : Expected heterozygosity; Total: number of distinct alleles for each marker. Alleles were numbered from smallest to the highest, each marker showed distinct sizes for the alleles, please see Supplementary Table S2 for the sizes of each allele.

doi:10.1371/journal.pone.0049871.t001

Results

Of the 30 patients studied, 26 had a single recurrence of parasitemia and 4 had two or more recurrent infections, for a total of 35 recurrences over the follow up period (Figure S1). *Plasmodium vivax* DNA from 65 acute infections showed high haplotype variability, with 55 haplotypes identified using a panel of 10 markers (haplotype diversity = 0.9957 ± 0.0037) (Table S2). The expected heterozygosity varied from 0.48 to 0.96 among the loci (average 0.77 ± 0.13).

Considering the predominant allele in the haplotypes, analysis of primary/relapse paired DNA samples showed the highest proportion of parasites with heterologous haplotypes (46%), i.e. different alleles in relapse compared to primary infection were

harbored in more than 2 of 10 markers (Fig. 1A), as previously reported by Orjuela-Sánchez et al. [21]. No parasite showed an entirely different haplotype in primary and relapse episodes. Fifty-four percent of the relapse parasites carried haplotypes related to or totally homologous to the primary infection. Expected heterozygosity was not significantly different in parasites of primary infections from those of relapse episodes (primary: $H_E = 0.779 \pm 0.129$; first relapse: $H_E = 0.798 \pm 0.115$; second relapse: $H_E = 0.810 \pm 0.197$; AMOVA test $p = 0.7116$).

Few predominant alleles were detected by each marker, in general ranging from 5 to 12; one marker (MS11) identified 31 alleles (Table 1 and Table S2). The number of all alleles (predominant and rare) detected in the primary and relapse episodes was low. The average number of alleles was 9.2 ± 2.3 and

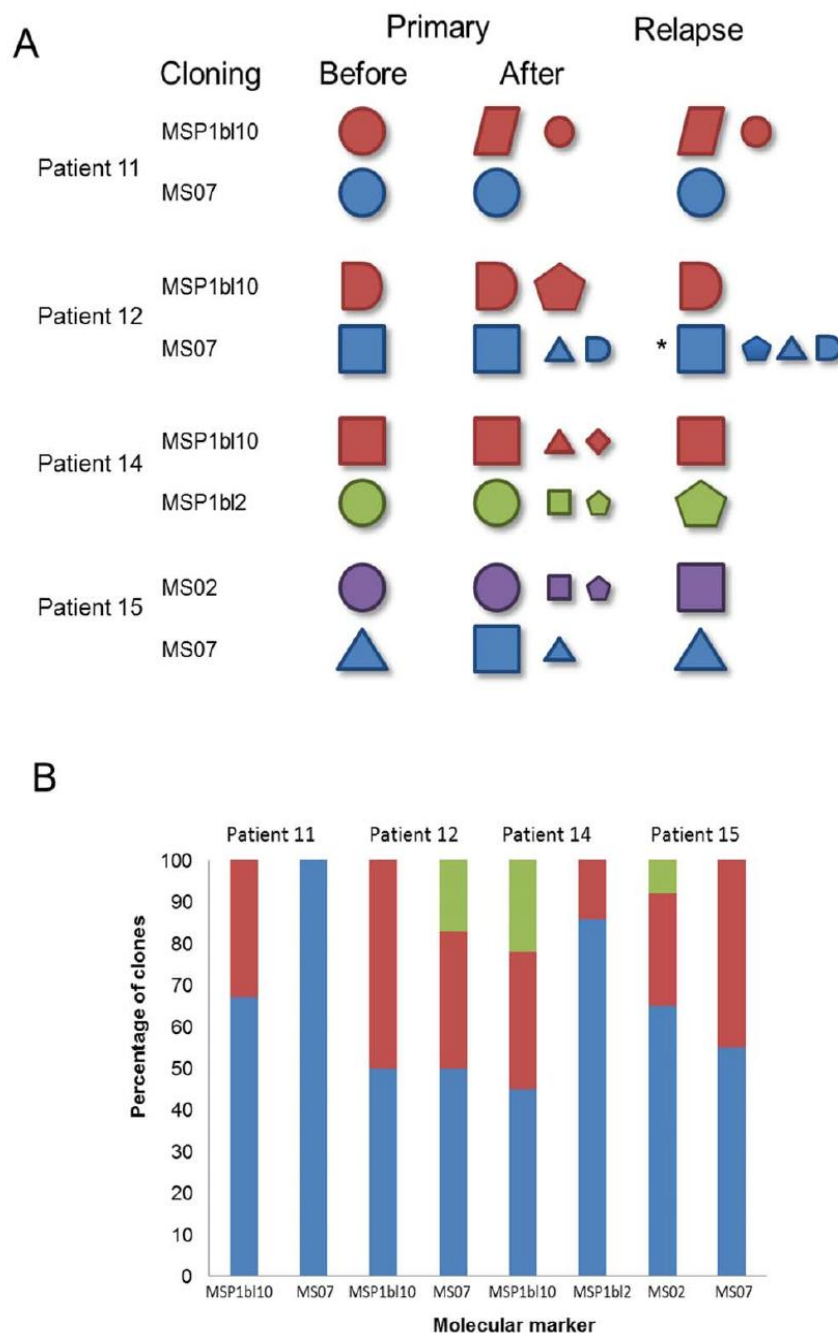


Figure 3. Genotypic profile before and after PCR cloning. PCR products from primary infection samples amplified using two randomly chosen molecular markers of four patients were cloned, and up to 26 colonies (mean of 11 colonies) were genotyped. (A) Each form represents an allele, size indicates predominant (larger) or rare alleles (smaller); color represents alleles of a distinct marker: MSP1bl10– red; MS07– blue; MSP1bl2– green; MS02– purple. The presence of two or more forms characterizes a multiple-clone infection. Before cloning the predominant allele was identified as the highest peak in genotyping and the rare allele as the peak with one-third of the predominant peak height. After cloning the frequencies were inferred by the number of bacteria clones. The only relapse sample also cloned is indicated by an asterisk. (B) Frequency of each allele in primary infections after cloning measured by the percent of bacterial colonies genotyped with each allele (represented by different colors). doi:10.1371/journal.pone.0049871.g003

10.8 ± 2.7 for the predominant and all alleles, respectively, without including MS11 data, and 11.4 ± 7.3 and 13.4 ± 8.7 with MS11 data. A high frequency of predominant alleles of the same size was

observed in the majority of markers. For all alleles (predominant and rare), this frequency increased from 40 to 77% (Fig. 1B). This finding reflects variation in how well the technique could detect

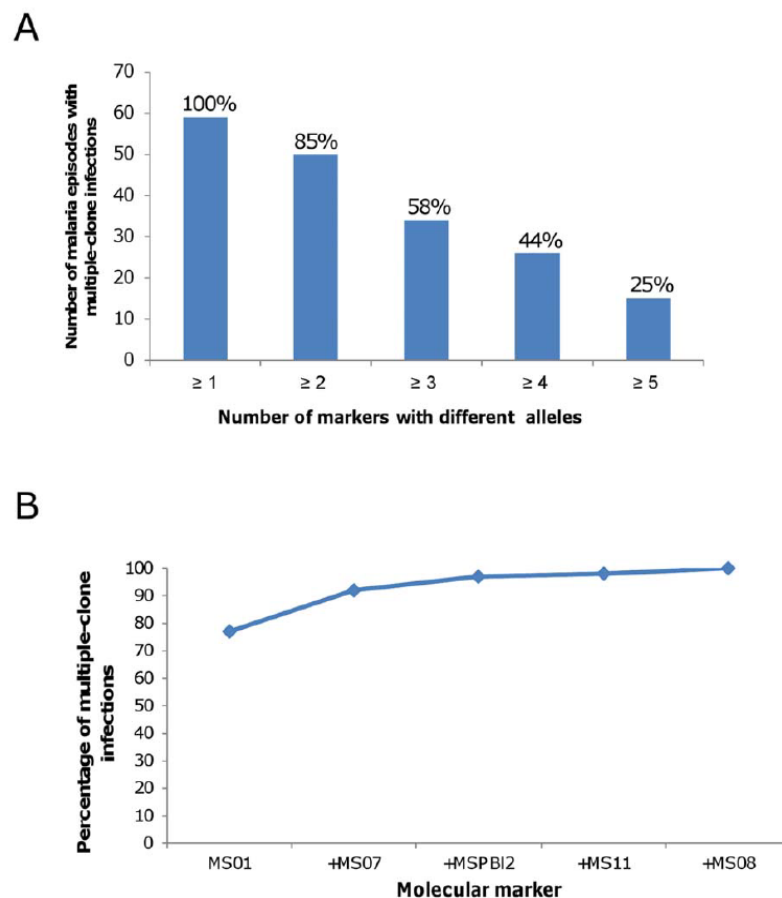


Figure 4. Detection of multiple-clone *P. vivax* infections using a panel of 10 markers. (A) Number and percent of malaria episodes showing multiple-clone infections detected by different numbers of markers. (B) Minimum number of markers able to detect all multiple clone infections was five: MS01 (77%), MS01+ MS07 (92%), MS01+ MS07+ MSPBI2 (97%), MS01+ MS07+ MSPBI2+ MS11 (98%), MS01+ MS07+ MSPBI2+ MS11+ MS08 (100%). doi:10.1371/journal.pone.0049871.g004

low frequency alleles among the 10 markers used and suggested a significant temporal variability in predominant and rare alleles during the course of infection. In four patients with multiple recurrent infections, it was possible to confirm this temporal variation in predominant alleles (Fig. 2A). In these patients, each marker identified between two and 6 predominant alleles. Usually, those markers identified the same predominant allele in all consecutive samples from each patient in multiple malaria episodes (25 of 40, 65%) (Fig. 2B). Nine of the 15 remaining alleles were identical during relapses, but distinct from the primary infection. The combination of these alleles resulted in 10 haplotypes (H1 to H10). Only one patient harbored the same haplotype in all episodes (Patient 17; Fig. 2).

To clarify whether the detection of distinct alleles in relapses was due to their presence, although at low levels, in the preceding acute episodes, PCR products of two randomly selected markers from the primary infection of four patients were cloned, and up to 26 bacterial colonies (mean 11) were genotyped per product (Fig. 3). The majority of cloned samples were found to include more than one allele, representing a multiple-clone infection in both initial and recurrent infections. Up to 4 distinct alleles per marker were identified in a single patient (Fig. 3A). The frequency of colonies with the same allele ranged from 8 to 100% (Fig. 3B).

These data strongly support the hypothesis that those distinct alleles detected in the recurrent infections correspond to undetected low frequency clones present in the primary infection.

To further assess whether rare alleles were not identified in the primary infection because of low levels of fluorescence, we re-analyzed the original electropherogram peaks. Predominant peaks could have different heights, while the rare ones may have been of similar height (Figure S2). As an example of genotyping, in one patient the higher peak corresponding to the predominant allele had 455 rFU, and the rare allele had 153 rFU; that is, around 33% the predominant peak height. Genotyping the same marker for a second patient showed a higher peak of 4665 rFU and a lower peak with similar intensity of fluorescence as before (188 rFU); that is 4% of the predominant peak height. Reinforcing these data, the presence of rare alleles was further confirmed by cloning (data not shown). Thus, by properly adjusting the cut-off (≥ 150 rFU), the molecular markers detected a high frequency of multiple-clone infections. In 59 of 65 samples (91%) multiplicity of infection was detected by at least one marker (Fig. 4A). Based on a minimum of two markers, the percent of multiple infections detected decreased to 77%, and, with a minimum of three markers, it was 52% (Fig. 4A). We also observed a wide variation among the molecular markers in their ability to identify multiple

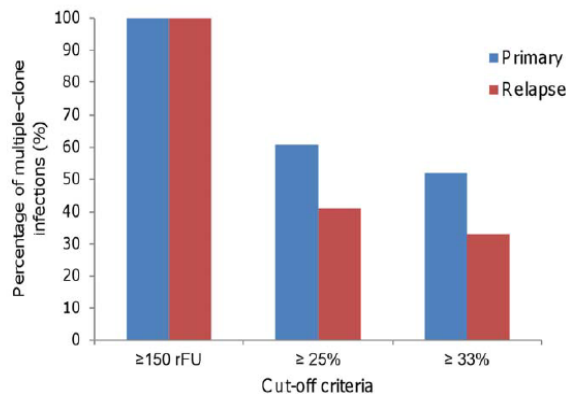


Figure 5. Percent of multiple-clone infections using different cut-off criteria. The detection of rare alleles in the genotyping was based on three cut-off criteria: ≥ 150 rFU (here); peaks with more than one quarter [46]; or with more than one third of the predominant peak height [47]. doi:10.1371/journal.pone.0049871.g005

infections, with two microsatellite markers (MS01 and MS07) accounting for most of the detection (Fig. 4B). Although five markers were able to detect all multiple-clone infections, the results suggested that few markers could be used to detect the majority of multiple-clone infections.

Discussion

The activation of heterologous hypnozoites seems to be the most common cause of malaria recurrences [27,29,31,39]. The results presented here reinforce previous studies, showing that the majority of relapse episodes were caused by a parasite population distinct from the primary infection. The novel finding of our study was the identification of high multiplicity not only in primary infections but also in relapses. These findings add complexity to the concept of heterologous activation, since they suggest that the allele present in relapses might also be present in the primary infection as a rare allele. Furthermore, the predominant parasite in the primary infection might not be predominant in the relapse, which shows that the frequency of circulating parasite clones alters considerably in *P. vivax* recurrences. Consequently, activation in relapse might be from homologous or heterologous hypnozoites or both (Table 1). Koepfli et al. [40] similarly reported temporal variation in the predominant allele during the course of *P. vivax* primary infection. In a study of *P. vivax* patients in the Peruvian Amazon, Van Den Eede et al. [39] reinforced this hypothesis of high turnover of parasite genotypes in recurrences. These findings point to the need for further studies to analyze multiple-clone infection during *P. vivax* recurrence, specifically with respect to primaquine resistance.

Numerous studies have addressed the mechanisms of hypnozoite activation. Recently, data from a study of infants in Thailand demonstrated that the first *P. vivax* relapse in life is usually caused by genetically homologous parasites. The authors suggest that this reflects the lack of previously acquired hypnozoites to be activated [41]. Accordingly, in the present study, five of seven patients showing a first malaria episode of their life exhibited a single-clone infection, with homologous parasites in recurrences. Notwithstanding, it is important to consider that malaria infection can be induced by the inoculation of more than one clone of sporozoites (multiple-clone infection) and, as hypothesized here, more than one clone of hypnozoites can remain dormant until some are

activated. Consequently, it is not possible to determine if the heterologous hypnozoites are the first activated, which would explain their prevalence in relapses, or if the prevalence is related to the number of heterologous/homologous dormant clones that could be activated [27]. Since, in the current study, most of the initial infections did not correspond to the first sporozoite inoculation of life, previous infections could also be a source of heterologous hypnozoites.

Our aim was to improve sensitivity of detecting multiple-clone infections. The approach used to identify rare alleles was based on analysis of the electropherogram using a low cut-off level (≥ 150 rFU). By cloning PCR products, it was possible to confirm the specificity of this strategy and identify high levels of multiple-clone infections. By using a more common criterion to detect rare peaks, based on quantification of peak heights [42,43], multiple-clone infection was confirmed in our primary/relapse samples (Fig. 5). However, this criterion has limitations, depending on the height of the predominant peak. Moreover, as multiplicity of infection has been demonstrated for different *P. vivax* populations [31,32,44–47], we believe that it is a common phenomenon of relapse parasites, that is not yet identified due to the low sensitivity of previous protocols. In order to reduce the artifact in genotyping, we used several strategies: repeat genotyping using different PCR products from the same patient to avoid dropout; confirming rare alleles using cloning before genotyping to detect null or silent alleles; and reduced stutter peaks (peaks closer to, or attached to, the main peak result from DNA slippage during PCR) in PCR standardization or discarding them from the analysis. In conclusion, our approach is useful to detect rare clones, but should be used with caution to avoid an overestimation of multiple-clone infections.

Our results showed high haplotype variability and multiplicity of clones in parasites from relapsed patients. These findings complicate the concept of heterologous activation, suggesting the involvement of undetermined mechanisms based on host or environmental factors in the simultaneous activation of multiple clones of hypnozoites. This study provided new insights into molecular biology of malaria relapse that must be considered in control strategies for the disease.

Supporting Information

Figure S1 Interval between primary infection and relapse infections. Time interval in months between primary and relapse per individual (A) and frequency of episodes at differing intervals (B). Repeated individual number represents a second relapse episode (red bar) and a third relapse episode (green bar) in the same patient. Interval of second and third relapses was measured in relation to previous acute malaria episode. Primary infections corresponding to the first malaria infection of the individual's life are denoted by an asterisk (above the bars). (TIFF)

Figure S2 Genotyping of two DNA samples with distinct profiles for the same marker (MSP1B102). (A) Multiple infection detected in which the minor peak showed around 33% of the fluorescence level (rFu) of the predominant peak (blue peaks). (B) Multiple infection detected in which the lower peak (rare allele) showed 4% of fluorescence level of the predominant peak. Fragment sizes are represented on the x axis of the graph. Red peaks represents the molecular marker used (MegaBACE™ ET550-R). (TIFF)

Table S1 Description of patient characteristics. (DOCX)

Table S2 Characteristics of predominant alleles from genotyping of 10 molecular markers of *Plasmodium vivax* infected patients.
(DOCX)

Acknowledgments

The authors thank Dr. Gehard Wunderlich for his critical review and suggestions for the manuscript. We are grateful to all patients who made this study possible. We also thank the Program for Technological

Development in Tools for Health - PDTIS platform (FIOCRUZ) for DNA sequencing facilities.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FFA LHC CAB. Performed the experiments: FFA AMR. Analyzed the data: FFA AMR CAB. Contributed reagents/materials/analysis tools: CJF LHC CAB. Wrote the paper: FFA AMR CJF LHC CAB.

References

- Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW (2004) The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis* 4: 327–336.
- Gething PW, Patil AP, Smith DL, Guerra CA, Elyazar IR, et al. (2011) A new world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2010. *Malar J* 10: 378.
- World Health Organization (2010) World Malaria Report 2010. Geneva: World Health Organization.
- Guerra CA, Howes RE, Patil AP, Gething PW, Van Boeckel TP, et al. (2010) The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e774.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. (2010) *Aspectos epidemiológicos da Malária*. Brasília: Ministério da Saúde.
- Craig B, Alving AS, Jones R, Merrill Whorton C, Pullman TN, et al. (1947) The Chesson strain of *Plasmodium vivax* malaria. I. Relationship between prepatent period, latent period and relapse rate. *J Infect Dis* 80: 228–236.
- Adak T, Shama V, Orlov V (1998) Studies on the *Plasmodium vivax* relapse pattern in Delhi, India. *Am J Trop Med Hyg* 59: 175–179.
- Contacos PG, Collins WE, Jeffery GM, Krotoski WA, Howard WA (1972) Studies on the characterization of *Plasmodium vivax* strains from Central America. *Am J Trop Med Hyg* 21: 707–712.
- Warren M, Garnham P (1970) *Plasmodium cynomolgi*: X-irradiation and development of exo-erythrocytic schizonts in *Macaca mulatta*. *Exp Parasitol* 28: 551–556.
- Douglas NM, Nosten F, Ashley EA, Phaiphun L, van Vugt M, et al. (2011) *Plasmodium vivax* Recurrence Following Falciparum and Mixed Species Malaria: Risk Factors and Effect of Antimalarial Kinetics. *Clin Infect Dis* 52: 612–620.
- Hulden L, Hulden L (2011) Activation of the hypnozoite: a part of *Plasmodium vivax* life cycle and survival. *Malar J* 10: 90.
- James S, Shute P (1926) Report on the first results of laboratory work on malaria in England. *League of Nations*. Health Organization. Geneva. C. H. Malaria 57: 30.
- Boyd M, Stratman T, Kitchen S (1936) On the duration of homologous immunity to *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med* 16: 311–315.
- Boyd M (1947) A review of studies on immunity to vivax malaria. *J Natl Malar Soc* 6: 12–31.
- Sinton J, Bird W (1928) Studies in malaria with special reference to treatment; plasmoquine in treatment of malaria. *Indian J Med Research* 16: 159.
- Gogtay NJ, Desai S, Kamtekar KD, Kadam VS, Dalvi SS, et al. (1999) Efficacies of 5- and 14-day primaquine regimens in the prevention of relapses in *Plasmodium vivax* infections. *Ann Trop Med Parasitol* 93: 809–812.
- Gill C (1938) The seasonal periodicity of malaria and the mechanism of the epidemic wave. JA Churchill Ltd, London.
- Goller J, Jolley D, Ringwald P, Biggs BA (2007) Regional differences in the response of *Plasmodium vivax* malaria to primaquine as anti-relapse therapy. *Am J Trop Med Hyg* 76: 203–207.
- Howe C, Duff F (1946) Effect of altitude anoxia in provoking relapse in malaria. *Science* 103: 223.
- White N (2011) Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J* 10: 297.
- Orjuela-Sánchez P, da Silva N, da Silva-Nunes M, Ferreira MU (2009) Recurrent parasitemias and population dynamics of *Plasmodium vivax* polymorphisms in rural Amazonia. *Am J Trop Med Hyg* 81: 961–968.
- Katsuragawa TH, Gil LH, Tada MS, de Almeida e Silva A, Costa JD, et al. (2010) The Dynamics of Transmission and Spatial Distribution of Malaria in Riverside Areas of Porto Velho, Rondônia, in the Amazon Region of Brazil. *PLoS ONE* 5: e9245.
- Galappaththy G, Omari A, Tharyan P (2007) Primaquine for preventing relapses in people with *Plasmodium vivax* malaria. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 1. Art. No.: CD004389.
- Craig A, Kain (1996) Molecular analysis of strains of *Plasmodium vivax* from paired primary and relapse infections. *J Infect Dis* 174: 373–379.
- Kirchgatter K, Del Portillo H (1998) Molecular analysis of *Plasmodium vivax* relapses using the MSP1 molecule as a genetic marker. *J Infect Dis* 177: 511–515.
- Khumsmith S (1998) Antigenic disparity of *Plasmodium vivax* causing initial symptoms and causing relapse. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 29: 519–524.
- Imwong M, Snounou G, Pukrittayakamee S, Tanomsing N, Kim JR, et al. (2007) Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually result from activation of heterologous hypnozoites. *J Infect Dis* 195: 927–933.
- Chen N, Auliff A, Rieckmann K, Gattton M, Cheng Q (2007) Relapses of *Plasmodium vivax* infection result from clonal hypnozoites activated at predetermined intervals. *J Infect Dis* 195: 934–941.
- Restrepo E, Imwong M, Rojas W, Carmona-Fonseca J, Maestre A (2011) High genetic polymorphism of relapsing *P. vivax* isolates in northwest Colombia. *Acta Trop* 119: 23–29.
- Havryluk T, Orjuela-Sánchez P, Ferreira MU (2008) *Plasmodium vivax*: microsatellite analysis of multiple-clone infections. *Exp Parasitol* 120: 330–336.
- Van den Eede P, Erhart A, Van der Auwera G, Van Overmeir C, Thang ND, et al. (2010) High complexity of *Plasmodium vivax* infections in symptomatic patients from a rural community in central Vietnam detected by microsatellite genotyping. *Am J Trop Med Hyg* 82: 223–227.
- Van den Eede P, Van der Auwera G, Delgado C, Huyse T, Soto-Calle VE, et al. (2010) Multilocus genotyping reveals high heterogeneity and strong local population structure of the *Plasmodium vivax* population in the Peruvian Amazon. *Malar J* 9: 151.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão (2009) *Guia prático de tratamento da malária no Brasil*. Brasília: Ministério da Saúde.
- Rezende AM, Tarazona-Santos E, Fontes CJ, Souza JM, Couto AD, et al. (2010) Microsatellite loci: determining the genetic variability of *Plasmodium vivax*. *Trop Med Int Health* 15: 718–726.
- Koepfli C, Mueller I, Marfurt J, Goroti M, Sie A, et al. (2009) Evaluation of *Plasmodium vivax* genotyping markers for molecular monitoring in clinical trials. *J Infect Dis* 199: 1074–1080.
- Nishimura A, Morita M, Nishimura Y, Sugino Y (1990) A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res* 18: 6169.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform Online* 1: 47–50.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491.
- Van den Eede P, Soto-Calle VE, Delgado C, Gamboa D, Grande T, et al. (2011) *Plasmodium vivax* sub-patent infections after radical treatment are common in Peruvian patients: results of a 1-year prospective cohort study. *PLoS ONE* 6: e16257.
- Koepfli C, Schoepflin S, Bretscher M, Lin E, Kiniboro B, et al. (2011) How Much Remains Undetected? Probability of Molecular Detection of Human Plasmodia in the Field. *PLoS ONE* 6: e19010.
- Imwong M, Boel ME, Pagornrat W, Pimanpanarak M, McGready R, et al. (2012) The first *Plasmodium vivax* relapses of life are usually genetically homologous. *J Infect Dis* 205: 680–683.
- Anderson TJ, Su XZ, Bockarie M, Lagog M, Day KP (1999) Twelve microsatellite markers for characterization of *Plasmodium falciparum* from finger prick blood samples. *Parasitology* 119: 113–126.
- Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, et al. (2000) Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol* 17: 1467–1482.
- Karunaweera ND, Ferreira MU, Munasinghe A, Barnwell JW, Collins WE, et al. (2008) Extensive microsatellite diversity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Gene* 410: 105–112.
- Ferreira MU, Karunaweera ND, da Silva-Nunes M, da Silva NS, Wirth DF, et al. (2007) Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in rural Amazonia. *J Infect Dis* 195: 1218–1226.
- Imwong M, Nair S, Pukrittayakamee S, Sudimack D, Williams JT, et al. (2007) Contrasting genetic structure in *Plasmodium vivax* populations from Asia and South America. *Int J Parasitol* 37: 1013–1022.
- Gunawardena S, Karunaweera ND, Ferreira MU, Phone-Kyaw M, Pollack RJ, et al. (2010) Geographic structure of *Plasmodium vivax*: microsatellite analysis of parasite populations from Sri Lanka, Myanmar, and Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg* 82: 235–242.

Table S1:Description of patient's characteristics

Patient number	Malaria episode	Data blood collection (Day/month/year)	Parasitemia (infected RBC/ μ L)	Age	Contagion localities
1	Primary	12/03/2007	2412	31	Itaituba/AM
	Relapse	22/07/2007	686		
2	Primary	06/04/2006	3635	64	Espigão D'Oeste/RO
	Relapse	11/09/2006	5180		
3	Primary	04/07/2005	684	16	São João Del Rey/MT
	Relapse	08/08/2005	425		
4*	Primary	13/10/2005	49	54	Rio Branco/AC
	Relapse	22/12/2005	415		
5	Primary	23/06/2009	750	47	Ariquemes/RO
	Relapse	15/08/2009	750		
6	Primary	22/02/2007	3158	25	Humaitá/AM
	Relapse	11/04/2007	1343		
7	Primary	02/08/2006	5836	23	Ariquemes/RO
	Relapse	05/09/2006	519		
	Relapse	08/11/2006	NA		
8*	Primary	16/02/2007	2145	29	Santo Antônio do Leverger/MT
	Relapse	21/03/2007	1786		
9	Primary	19/02/2005	895	31	Manicoré/AM
	Relapse	28/03/2005	200		
	Relapse	25/05/2005	1460		
10	Primary	18/03/2005	1630	37	Novo Progresso/PA
	Relapse	08/07/2005	719		
11	Primary	21/12/2006	1618	33	British guyana
	Relapse	23/02/2007	2910		
12	Primary	03/10/2006	418	14	Pontes e Lacerda/MT
	Relapse	12/12/2006	32		
13	Primary	06/07/2005	2418	48	Machadinho D'Oeste/RO
	Relapse	30/09/2005	1256		
14	Primary	21/07/2005	NA	36	Porto Velho/RO
	Relapse	28/09/2005	1344		
15*	Primary	05/09/2006	3087	41	Colniza/MT
	Relapse	11/12/2006	8238		
16	Primary	12/09/2005	2610	61	Machadinho D'Oeste/RO
	Relapse	19/10/2005	620		
	Relapse	03/02/2006	2260		
	Relapse	30/03/2006	NA		
17	Primary	09/09/2004	68	48	Feliz Natal/MT
	Relapse	11/10/2004	2004		
	Relapse	20/11/2004	1260		
18	Primary	06/06/2005	NA	42	Ariquemes/RO
	Relapse	11/08/2005	1918		
19	Primary	13/10/2005	5535	19	Rio Branco/AC
	Relapse	14/11/2005	2631		
20	Primary	25/10/2004	815	46	Alto Paraíso/RO
	Relapse	04/01/2005	2810		
21*	Primary	14/11/2005	868	25	Juruena/MT
	Relapse	29/12/2005	938		
22*	Primary	17/11/2004	1260	24	Novo Progresso/PA
	Relapse	14/01/2005	1680		
23	Primary	22/06/2005	2714	36	Machadinho D'Oeste/RO
	Relapse	13/09/2005	NA		
24	Primary	26/02/2008	2415	42	Cruzeiro do Sul/AC
	Relapse	14/05/2008	1318		
25*	Primary	26/07/2005	593	63	Humaitá/AM
	Relapse	27/01/2006	2680		
26	Primary	31/07/2001	1142	25	Porto Velho/RO
	Relapse	21/10/2001	5740		
27*	Primary	24/01/2005	675	63	Colniza/MT
	Relapse	09/03/2005	15		
28	Primary	04/07/2005	555	37	Rio Machado/RO
	Relapse	03/10/2005	5106		
29	Primary	24/03/2008	1223	36	Várzea Grande/MT
	Relapse	20/05/2008	468		
30	Primary	14/01/2008	1698	42	Novo Progresso/PA
	Relapse	14/02/2008	3610		

* Primoinfected patients (first sporozoite inoculation)

8 REFERÊNCIAS

- Adak T, Sharma VP, Orlov VS. Studies on the *Plasmodium vivax* relapse pattern in Delhi, India. *Am J Trop Med Hyg*. 1998 Jul;59(1):175-9
- Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, Ménard R. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nat Med*. 2006 Feb;12(2):220-4
- An P, Wu Q, Wang H, Guan Y, Mu M, Liao Y, Zhou D, Song P, Wang C, Meng L, Man Q, Li L, Zhang J, Wang F. TMPRSS6, but not TF, TFR2 or BMP2 variants are associated with increased risk of iron-deficiency anemia. *Hum Mol Genet*. 2012 May 1;21(9):2124-31.
- Anderson T, Su X, Bockerie M, et al. Twelve microsatellite markers for characterisation of *Plasmodium falciparum* from finger prick blood samples. *Parasitology* 1999; 119:113–26
- Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, et al. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol*. 2000 Oct;17(10):1467-82.
- Andreani M, Radio FC, Testi M, De Bernardo C, Troiano M, Majore S, Bertucci P, Polchi P, Rosati R, Grammatico P. Association of hepcidin promoter c.-582 A>G variant and iron overload in thalassemia major. *Haematologica*. 2009 Sep;94(9):1293-6.
- Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends in parasitology* 2009; 25: 220-7. 1.
- Armitage AE, Pinches R, Eddowes LA, Newbold CI, Drakesmith H. Plasmodium falciparum infected erythrocytes induce hepcidin (HAMP) mRNA synthesis by peripheral blood mononuclear cells. *Br J Haematol*. 2009 Dec;147(5):769-71.
- Baird JK. Resistance to therapies for infection by *Plasmodium vivax*. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Jul;22(3):508-34.
- Barbosa J. Situação Epidemiológica da Malária na Amazônia. Brasília: SVS, 2011. 21p. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2011/Set/05/jarbas_malaria_050911.pdf>. Acesso em: 05 dez 2011
- Barbosa S, Gozze AB, Lima NF, Batista CL, Bastos Mda S, Nicolete VC, Fontoura PS, Gonçalves RM, Viana SA, Menezes MJ, Scopel KK, Cavasini CE, Malafronte R dos S, da Silva-Nunes M, Vinetz JM, Castro MC, Ferreira MU. Epidemiology of disappearing *Plasmodium vivax* malaria: a case study in rural Amazonia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Aug 28;8(8):e3109.

Barnwell JW, Galinski MR. *Invasion of vertebrate cells: Erythrocytes*. In: IW Sherman editors. *Malaria: Parasite biology, pathogenesis, and protection*. Washington DC: ASM Press; 1998. P. 93-120.

Batista CL, Barbosa S, DA Silva Bastos M, Viana SA, Ferreira MU. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* over time and space: a community-based study in rural Amazonia. *Parasitology*. 2014 Jul 28;144:1-11.

Bignami A. Como si prendono la febbri malariche. Recerche speriment. *Bull. R. Acad. (Roma)* 1898; 2: 1786-1788.

Bridle KR, Frazer DM, Wilkins SJ, *et al.* Disrupted hepcidin regulation in *HFE*-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet*. 2003;361(9358):669-673.

Brito CF, Ferreira MU. Molecular markers and genetic diversity of *Plasmodium vivax*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 Aug;106 Suppl 1:12-26

Bruce MC, Galinski MR, Barnwell JW, Donnelly CA, Walmsley M, Alpers MP, *et al.* Genetic diversity and dynamics of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* populations in multiply infected children with asymptomatic malaria infections in Papua New Guinea. *Parasitology*. 2000 Sep;121 (Pt 3):257-72.

Bueno LL, Moraes CG, Araújo FF, Gomes JA, Corrêa-Oliveira R, Soares IS, Lacerda MV, Fujiwara RT, Braga EM. *Plasmodium vivax*: induction of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites. *PLoS One*. 2010 Mar 10;5(3):e9623.

Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, Caler E, Crabtree J, Angiuoli SV, Merino EF, Amedeo P, Cheng Q, Coulson RM, Crabb BS, Del Portillo HA, Essien K, Feldblyum TV, Fernandez-Becerra C, Gilson PR, Gueye AH, Guo X, Kang'a S, Kooij TW, Korsinczky M, Meyer EV, Nene V, Paulsen I, White O, Ralph SA, Ren Q, Sargeant TJ, Salzberg SL, Stoeckert CJ, Sullivan SA, Yamamoto MM, Hoffman SL, Wortman JR, Gardner MJ, Galinski MR, Barnwell JW, Fraser-Liggett CM. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature*. 2008 Oct 9;455(7214):757-63.

Cerávolo IP, Bruña-Romero O, Braga EM, Fontes CJ, Brito CF, Souza JM, Krettli AU, Adams JH, Carvalho LH. Anti-*Plasmodium vivax* duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 2005 Jun; 72(6):675-81

Ceravolo IP, Souza-Silva FA, Fontes CJ, Braga EM, Madureira AP, Krettli AU, Souza J M, Brito CF, Adams JH, Carvalho L H. Inhibitory properties of the antibody response to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission. *Scand. J. Immunol*, 2008, 67, 270-8.

Cercamondi CI, Egli IM, Ahouandjinou E, Dossa R, Zeder C, Salami L, Tjalsma H, Wiegerinck E, Tanno T, Hurrell RF, Hounhouigan J, Zimmermann MB. Afebrile *Plasmodium falciparum* parasitemia decreases absorption of fortification iron but

does not affect systemic iron utilization: a double stable-isotope study in young Beninese women. *Am J Clin Nutr*. 2010 Dec;92(6):1385-92.

Chen N, Auliff A, Rieckmann K, Gatton M, Cheng Q. Relapses of *Plasmodium vivax* infection result from clonal hypnozoites activated at predetermined intervals. *J Infect Dis*. 2007 Apr 1;195(7):934-41.

Coatney GR, Cooper WC, *et al*. Studies in human malaria; the suppressive action of a phenanthrene amino alcohol, NIH-204 (SN-1796) against sporozoite-induced vivax malaria (St. Elizabeth strain). *Am J Hyg*. 1947 Jul;46(1):132-40.

Coatney OR, Cooper WC, Ruhe DS, Young MD, Burgess RW: Studies in human malaria. XVIII. The life pattern of sporozoite-induced St. Elizabeth strain vivax malaria. *Am J Hyg* 1950, 51:200-215

Craig AA, Kain KC. Molecular analysis of strains of *Plasmodium vivax* from paired primary and relapse infections. *J Infect Dis*. 1996 Aug;174(2):373-9.

Cui L, Escalante AA, Imwong M, Snounou G. The genetic diversity of *Plasmodium vivax* populations. *Trends Parasitol*. 2003 May;19(5):220-6.

de Mast Q, van Dongen-Lases EC, Swinkels DW, Nieman AE, Roestenberg M, Druihlhe P, Arens TA, Luty AJ, Hermesen CC, Sauerwein RW, van der Ven AJ. Mild increases in serum hepcidin and interleukin-6 concentrations impair iron incorporation in haemoglobin during an experimental human malaria infection. *Br J Haematol*. 2009 Jun; 145(5):657-64.

de Mast Q, Syafruddin D, Keijmel S, Riekerink TO, Deky O, Asih PB, Swinkels DW, van der Ven AJ. Increased serum hepcidin and alterations in blood iron parameters associated with asymptomatic *P. falciparum* and *P. vivax* malaria. *Haematologica*. 2010 Jul;95(7):1068-74.

de Pina-Costa A, Brasil P, Di Santi SM, de Araujo MP, Suárez-Mutis MC, Santelli AC, Oliveira-Ferreira J, Lourenço-de-Oliveira R, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014 Aug;109(5):618-33.

Delatycki MB, Allen KJ, Gow P, MacFarlane J, Radomski C, Thompson J, Hayden MR, Goldberg YP, Samuels ME. A homozygous HAMP mutation in a multiply consanguineous family with pseudo-dominant juvenile hemochromatosis. *Clin Genet*. 2004 May;65(5):378-83.

Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, *et al*. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab* 2005;1:191-200.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*. 2007 Feb 23;1:47-50

Ferreira MU, Karunaweera ND, da Silva-Nunes M, da Silva NS, Wirth DF, Hartl DL. Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in rural Amazonia. *J Infect Dis*. 2007 Apr 15;195(8):1218-26.

Ferrer, P., Tripathi, A.K., Clark, M.A., Hand, C.C., Rienhoff, H.Y. Jr., and Sullivan, D.J. Jr Antimalarial ironchelator, FBS0701, shows asexual and gametocyte *Plasmodium falciparum* activity and single oral dose cure in a murine malaria model. *PLoS ONE*. 2012. 7:e37171.

Fraser T, Michon P, Barnwell JW, Noe AR, Al-Yaman F, Kaslow DC, Adams JH. Expression and serological activity of a soluble recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infect. Immun*. 1997; 65: 2.772-2.777.

Fritsch, G., Treumer, J., Spira, D.T., and Jung, A. *Plasmodium vinckei*: suppression of mouse infections with desferrioxamine B. *Exp. Parasitol*; 1985. 60, 171– 174.

FUNASA/MS. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. *Manual de Terapêutica da Malária*. 6. ed. Brasília: FUNASA, 2001. 102 p. (Vigilância Epidemiológica).

Galesloot TE, Geurts-Moespot AJ, den Heijer M, Sweep FC, Fleming RE, Kiemeny LA, Vermeulen SH, Swinkels DW. Associations of common variants in HFE and TMPRSS6 with iron parameters are independent of serum hepcidin in a general population: a replication study. *J Med Genet*. 2013 Sep;50(9):593-8.

Ganz T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood*. 2011 Apr 28;117(17):4425-33.

Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Sep;1823(9):1434-43.

Garnham PC. Swellengrebel lecture. Hypnozoites and 'relapses' in *Plasmodium vivax* and in vivax-like malaria. *Trop Geogr Med*. 1988 Jul;40(3):187-95.

Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SH, Alonso PL, Collins FH, Duffy PE. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest*. 2008 Apr;118(4):1266-76.

Guerra CA, Howes RE, Patil AP, Gething PW, Van Boeckel TP, Temperley WH, et al. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Aug 3;4(8):e774.

Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp*. Ser. 41: 95-98.

Hattori A, Tomosugi N, Tatsumi Y, Suzuki A, Hayashi K, Katano Y, Inagaki Y, Ishikawa T, Hayashi H, Goto H, Wakusawa S. Identification of a novel mutation in the HAMP gene that causes non-detectable hepcidin molecules in a Japanese male patient with juvenile hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis*. 2012 Mar 15;48(3):179-82.

Havryliuk T, Ferreira MU. A closer look at multiple-clone *Plasmodium vivax* infections: detection methods, prevalence and consequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Feb;104(1):67-73.

Havryliuk T, Orjuela-Sánchez P, Ferreira MU. *Plasmodium vivax*: microsatellite analysis of multiple-clone infections. *Exp Parasitol*. 2008 Dec;120(4):330-6.

Howard CT, McKakpo US, Quakyi IA, Bosompem KM, Addison EA, Sun K, Sullivan D, Semba RD. Relationship of hepcidin with parasitemia and anemia among patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Ghana. *Am J Trop Med Hyg*. 2007 Oct;77(4):623-6.

Huldén L, Huldén L, Heliövaara K. Natural relapses in vivax malaria induced by Anopheles mosquitoes. *Malar J*. 2008 Apr 22;7:64.

Imwong M, Sudimack D, Pukrittayakamee S, Osorio L, Carlton JM, Day NP, et al. Microsatellite variation, repeat array length, and population history of *Plasmodium vivax*. *Mol Biol Evol*. 2006 May;23(5):1016-8

Imwong M, Snounou G, Pukrittayakamee S, Tanomsing N, Kim JR, Nandy A, et al. Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually result from activation of heterologous hypnozoites. *J Infect Dis*. 2007 Apr 1;195(7):927-33.

Imwong M, Boel M, Pagornrat W, et al. The first *Plasmodium vivax* relapses of life are usually genetically homologous. *J Infect Dis* 2012; 205:680–3.

Island ML, Jouanolle AM, Mosser A, Deugnier Y, David V, Brissot P, Loréal O. A new mutation in the hepcidin promoter impairs its BMP response and contributes to a severe phenotype in HFE related hemochromatosis. *Haematologica*. 2009. May;94(5):720-4.

Karunaweera ND, Ferreira MU, Hartl DL, Wirth DF. Fourteen polymorphic microsatellite DNA markers for the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Mol Ecol Notes* 2007; 7: 172-175.

Karunaweera ND, Ferreira MU, Munasinghe A, Barnwell JW, Collins WE, King CL, et al. Extensive microsatellite diversity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Gene*. 2008 Feb 29;410(1):105-12.

Kassebaum, N.J., Jasrasaria, R., Naghavi, M., Wulf, S.K., Johns, N., Lozano, R., et al. A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. *Blood*;2014123, 615–624.

Kasvosve I. Effect of ferroportin polymorphism on iron homeostasis and infection. *Clin Chim Acta*. 2013 Feb 1;416:20-5.

Kim JR, Imwong M, Nandy A, Chotivanich K, Nontprasert A, Tonomsing N, et al. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* in Kolkata, India. *Malar J*. 2006 Aug 14;5:71.

- King CL, Michon P, Shakri AR, Marcotty A, Stanisic D, Zimmerman PA, Cole-Tobian JL, Mueller I, Chitnis CE. Naturally acquired Duffy-binding protein protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008, 105, 8363-8.
- Kirchgatter K, del Portillo HA. Molecular analysis of *Plasmodium vivax* relapses using the MSP1 molecule as a genetic marker. *J Infect Dis.* 1998 Feb;177(2):511-5
- Koepfli C, Mueller I, Marfurt J, Goroti M, Sie A, Oa O, *et al.* Evaluation of *Plasmodium vivax* genotyping markers for molecular monitoring in clinical trials. *J Infect Dis.* 2009 Apr 1;199(7):1074-80
- Krotoski WA, Krotoski DM, Garnham PC, Bray RS, Killick-Kendrick R, Draper CC, *et al.* Relapses in primate malaria: discovery of two populations of exoerythrocytic stages. Preliminary note. *Br Med J.* 1980 Jan 19;280(6208):153-4.
- Krotoski WA, Collins WE, Bray RS, Garnham PC, Cogswell FB, Gwadz RW, *et al.* Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1982 Nov;31(6):1291-3.
- Krotoski WA. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985;79(1):1-11.
- Lacerda MVG. Manifestações clínicas e patogênese da plaquetopenia na malária. 2007. 439p. Tese (Doutorado em Medicina tropical) – Universidade de Brasília. Brasília.
- Leclerc MC, Durand P, Gauthier C, Patot S, Billotte N, Menegon M, *et al.* Meager genetic variability of the human malaria agent *Plasmodium vivax*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Oct 5;101(40):14455-60.
- Lee P, Peng H, Gelbart T, Wang L, Beutler E. Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Feb 8;102(6):1906-10.
- Levine HD. *Clinical aspects of malaria*. In Internal: Medicine in World War II, vol 2: Infectious diseases. Office of the Surgeon General, Department of the Army; 1963. P. 479-92.
- Lim CS, Kim SH, Kwon SI, Song JW, Song KJ, Lee KN. Analysis of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 gene sequences from resurgent Korean isolates. *Am J Trop Med Hyg.* 2000 Feb;62(2):261-5.
- Lin JT, Bethell D, Tyner SD, Lon C, Shah NK, Saunders DL, *et al.* *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage is associated with subsequent *Plasmodium vivax* relapse after treatment. *PLoS One.* 2011 Apr 20;6(4):e18716.
- Lynch S. Case studies: iron. *Am J Clin Nutr.* 2011 Aug;94(2):673S-8S.

Manson PT. Experimental Malaria: Recurrence after Nine Months. *Br Med J*. 1901 Jul 13;2(2115):77.

Matsuzaki-Moriya, C., Tu, L., Ishida, H., Imai, T., Suzue, K., Hirai, M., *et al*. A critical role for phagocytosis in resistance to malaria in iron-deficient mice. *Eur.J.Immunol*. 2011. 41, 1365–1375.

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

Michon PA, Fraser T, Adams JH. Naturally acquired and vaccine-elicited antibodies block erythrocyte cytoadherence of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infection and Immunity*, 2000; 68: 3.164-3.171.

Miller, L.H., Hudson, D., Haynes, J.D. 1988. Identification of *Plasmodium knowlesi* erythrocyte binding proteins. *Mol Biochem Parasitol* 31(3): 217-22.

Morais CG, Soares IS, Carvalho LH, Fontes CJF, Krettli, AU, Braga, EM. Antibodies to *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1: Persistence and Correlation with Malaria Transmission Intensity. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2006; 75: 582-587.

Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, del Portillo HA. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis*. 2009 Sep;9(9):555-66.

Nair KM, Iyengar V. Iron content, bioavailability & factors affecting iron status of Indians. *Indian J Med Res*. 2009 Nov;130(5):634-45. Review.

Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*. 2003 Apr 1;101(7):2461-3

Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Ward DM, Ganz T, *et al*. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004;306:2090-3.

Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, *et al*. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(7):4596-4601.

Nogueira, P.A., F.P. Alves, C. Fernandez-Becerra, O. Pein, N.R. Santos, L.H. Pereira da Silva, E.P. Camargo, and H.A. del Portillo. 2006. A reduced risk of infection with *Plasmodium vivax* and clinical protection against malaria are associated with antibodies against the N terminus but not the C terminus of merozoite surface protein 1. *Infect. Immun*. 74: 2726–2733.

Nweneka CV, Doherty CP, Cox S, Prentice A. Iron delocalisation in the pathogenesis of malarial anaemia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010 Mar;104(3):175-84.

Oliveras-Vergés A, Espel-Masferrer E. Elevated basal hepcidin levels in the liver may inhibit the development of malaria infection: another piece towards solving the malaria puzzle? *Med Hypotheses*. 2008;70(3):630-4.

Orjuela-Sánchez P, da Silva NS, da Silva-Nunes M, Ferreira MU. Recurrent parasitemias and population dynamics of *Plasmodium vivax* polymorphisms in rural Amazonia. *Am J Trop Med Hyg*. 2009 Dec;81(6):961-8.

Peyssonnaud C, Nizet V, Johnson RS. Role of the hypoxia inducible factors HIF in iron metabolism. *Cell Cycle*. 2008;7(1):28-32.

Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, *et al*. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem*. 2001;276(11):7811-7819.

Pollack, S., Rossan, R.N., Davidson, D.E., Escajadillo, A. Desferriox- amine suppresses *Plasmodium falciparum* in Aotus monkeys. *Proc.Soc.Exp.Biol. Med.*; 1987.184, 162–164.

Portugal S, Carret C, Recker M, Armitage AE, Gonçalves LA, Epiphany S, Sullivan D, Roy C, Newbold CI, Drakesmith H, Mota MM. Host-mediated regulation of superinfection in malaria. *Nat Med*. 2011 Jun;17(6):732-7

Portugal S, Drakesmith H, Mota MM. Superinfection in malaria: Plasmodium shows its iron will. *EMBO Rep*. 2011 Dec 1;12(12):1233-42.

Pukrittayakamee S, Imwong M, Chotivanich K, Singhasivanon P, Day NP, White NJ. A comparison of two short-course primaquine regimens for the treatment and radical cure of *Plasmodium vivax* malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 2010 Apr;82(4):542-7.

Raventos-Suarez, C., Pollack, S., and Nagel, R.L. *Plasmodium falciparum*: inhibition of in vitro growth by desferrioxamine. *Am.J.Trop.Med.Hyg*. 31, 919–922.

Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, *et al*. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet.*; 1982). 2003;33(1):21-22.

Restrepo E, Imwong M, Rojas W, Carmona-Fonseca J, Maestre A. High genetic polymorphism of relapsing *P. vivax* isolates in northwest Colombia. *Acta Trop*. 2011 Jul;119(1):23-9

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

Russell B, Suwanarusk R, Lek-Uthai U. *Plasmodium vivax* genetic diversity: microsatellite length matters. *Trends Parasitol*. 2006 Sep;22(9):399-401.

Rezende AM, Tarazona-Santos E, Fontes CJ, Souza JM, Couto AD, Carvalho LH, Brito CF. Microsatellite loci: determining the genetic variability of *Plasmodium vivax*. *Trop Med Int Health*. 2010 Jun;15(6):718-26

Rodrigues, M.H., Rodrigues, K.M., Oliveira, T.R., Cômodo, A.N., Rodrigues, M.M., Kocken, C.H.M., Thomas, A.W., Soares, I.S.. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. *International Journal for Parasitology*, v.35, n.2, p.185-192, 2005

Shute PG, Lupascu G, Branzei P, Maryon M, Constantinescu P, Bruce-Chwatt LJ, et al. A strain of *Plasmodium vivax* characterized by prolonged incubation: the effect of numbers of sporozoites on the length of the prepatent period. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1976;70(5-6):474-81.

Sinden RE. Molecular interactions between Plasmodium and its insect vectors. *Cell Microbiol*. 2002 Nov;4(11):713-24.

Soares IS, Oliveira SG, Souza JM, Rodrigues MM 1999c. Antibody response to the N and C-terminal regions of the Merozoite Surface Protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of *Plasmodium vivax* malaria in the north of Brazil. *Acta Trop* 72: 13-24

Spottiswoode N, Fried M, Drakesmith H, Duffy PE. Implications of malaria on iron deficiency control strategies. *Adv Nutr*. 2012 Jul 1;3(4):570-8.

Spottiswoode N, Duffy PE, Drakesmith H. Iron, anemia and hepcidin in malaria. *Front Pharmacol*. 2014 May 30;5:125.

Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 2006 Sep 1;313(5791):1287-90.

SVS/MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. *Vigilância em Saúde: Situação Epidemiológica da Malária no Brasil*. Brasília: MS, 2008. 2p. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2008_final.pdf>. Acesso em: 28 dez.2011

SVS/MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. *Vigilância em Saúde: Situação Epidemiológica –dados. Mapa de risco da malária por município de infecção*. Brasília: MS, 2012. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/20/Mapa-de-risco-mal-ria-Brasil-2012.pdf>>. Acesso em: 27 out. 2014.

SVS/MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Aspectos epidemiológicos da Malária. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010a. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31086&janela=2>. Acesso em: 05 dez 2011.

SVS/MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia prático de tratamento da malária no Brasil /

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2010b. 36 p. : il. color. – (Serie A. Normas e Manuais Técnicos)

SVS/MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. *Vigilância em Saúde: Situação Epidemiológica da Malária no Brasil*. Brasília: MS, 2007. 12 p. Disponível em: < <http://netra.cpqrr.fiocruz.br/phl82/index.html> >. Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener. Acesso em: 28 dez. 2011.

Thayer WS: Lectures on the malarial fevers. *Appleton* 1897; New York, p326

Thompson, J., Higgins, D., Gibson, T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*; 1994. 22: 4673-4680.

Van den Eede P, Erhart A, Van der Auwera G, Van Overmeir C, Thang ND, Hung le X, Anné J, D'Alessandro U. High complexity of *Plasmodium vivax* infections in symptomatic patients from a rural community in central Vietnam detected by microsatellite genotyping. *Am J Trop Med Hyg*. 2010 Feb;82(2):223-7

Van den Eede P, Soto-Calle V, Delgado C, et al. *Plasmodium vivax* sub-patent infections after radical treatment are common in Peruvian patients: results of a 1-year prospective cohort study. *PLoS ONE* 2011; 6:e16257.

Wang HZ, He YX, Yang CJ, Zhou W, Zou CG. Hecpidin is regulated during blood-stage malaria and plays a protective role in malaria infection. *J Immunol*. 2011 Dec 15;187(12):6410-6.

Wells TN, Burrows JN, Baird JK. Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. *Trends Parasitol*. 2010 Mar;26(3):145-51.

White NJ. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J*. 2011 Oct 11;10:297.

WHO World Health Organization, *World Malaria Report 2013*. Geneva: WHO, 2013

WHO World Health Organization, *World Malaria Report 2010*. Geneva: WHO, 2010.

Zaahl MG, Merryweather-Clarke AT, Kotze MJ, van der Merwe S, Warnich L, Robson KJ. Analysis of genes implicated in iron regulation in individuals presenting with primary iron overload. *Hum Genet*. 2004 Oct;115(5):409-17.