PAMELA ORJUELA SÁNCHEZ

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE
PLASMODIUM VIVAX: ANÁLISE DE MARCADORES
GENÉTICOS NEUTROS E DE GENES
POTENCIALMENTE ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A
DROGAS**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para a obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno –
Hospedeiro.

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira

Co-orientador:

Prof. Dr. Hernando del Portillo

São Paulo
2010

RESUMO

Orjuela-Sánchez P. Diversidade genética em populações de *Plasmodium vivax*: análise de marcadores genéticos neutros e de genes potencialmente associados à resistência a drogas [tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Neste trabalho foram utilizados marcadores neutros (microssatélites e SNPs sinônimos) e sujeitos a seleção (motivos repetitivos de *pvcsp* e SNPs não-sinônimos de *pvcrt-o* e *pvm-dr1*) para estudar em detalhe a variação genética em *P. vivax*. A tipagem de microssatélites revelou que as populações de *P. vivax* da Amazônia brasileira são mais diversas que as populações simpátricas de *P. falciparum*, apresentando maior número de infecções geneticamente mistas, alelos por locus e heterozigosidade virtual; porém ambas as espécies mostraram evidências significantes de desequilíbrio de ligação (DL). Em contraste com a estabilidade temporal dos polimorfismos sujeitos a seleção, os polimorfismos neutros de isolados simpátricos de *P. vivax* e *P. falciparum* apresentaram uma alta taxa de substituição de haplótipos, com poucas linhagens persistindo ao longo do tempo. A análise do domínio repetitivo central da proteína circunsporozoíta (CSP) de *P. vivax* em isolados simpátricos da Amazônia brasileira revelou nove haplótipos diferentes. Sequências repetitivas idênticas ou quase idênticas predominaram na maioria dos arranjos, sugerindo a expansão recente destes domínios. A análise de 31 SNPs do cromossomo 8 flanqueando *csp* evidenciou um extenso DL, sugerindo que a recombinação não-meiótica tem um papel importante na diversidade de CSP. A seguir, foram avaliadas as infecções recorrentes de *P. vivax* de duas coortes da Amazônia rural expostas a baixos níveis de transmissão de malária, uma delas com altas taxas de recorrência após o tratamento com cloroquina (CQ) – primaquina. A análise de microssatélites revelou que apenas dois dos 28 pares de amostras recorrentes apresentavam haplótipos idênticos e quatro pares apresentavam haplótipos geneticamente relacionados. A tipagem de microssatélites de 99 isolados de *P. vivax* numa destas coortes, revelou uma extraordinária diversidade ao longo do tempo, com poucos isolados compartilhando o mesmo haplótipo. Estes resultados em conjunto sugerem que as recorrências frequentes não favorecem a persistência ou reaparecimento de linhagens clonais de parasitas nesta população. Ante o relato de

isolados de *P. vivax* resistentes à CQ na Amazônia brasileira, decidimos analisar SNPs nas regiões codificantes e não-codificantes dos genes *pvmdr1* e *pvcrt-o* (ortólogos dos genes *mdr1* e *crt* de *P. falciparum* e associados à resistência a drogas). Estas análises não revelaram associações entre os SNPs e o fenótipo de sensibilidade ou resistência à CQ nas amostras estudadas. Finalmente, foram genotipados 85 SNPs do cromossomo 8 de *P. vivax* em 234 isolados de diferentes áreas de transmissão de malária no Brasil e na Ásia. Foram descritos vários níveis de diversidade e DL entre as populações avaliadas, sendo que, os parasitas com a maior diversidade e DL provinham da área com a menor transmissão de malária (Sri Lanka). Foram encontrados vários grupos de marcadores contíguos com baixa recombinação e uma estrutura haplotípica relativamente conservada entre as populações, sugerindo a existência de sítios ativos de recombinação nesta região cromossômica. Os SNPs silenciosos e não-sinônimos revelaram uma divergência substancial entre as populações, permitindo alocar os parasitas segundo sua origem continental e subcontinental. A frequência dos alelos de *pvmdr1* também apresentou uma marcada variação geográfica.

Palavras-chave: Malária. Variação genética. Marcador molecular. Resistência. Recombinação genética.

ABSTRACT

Orjuela-Sánchez P. Genetic Diversity of *Plasmodium vivax* populations: analysis of neutral genetic markers and genes potentially associated with drug resistance. [Ph.D. thesis]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

In this work neutral markers (microsatellites and synonymous SNPs) and *loci* under selection (repetitive motifs of *pvcsp* and non-synonymous SNPs in *pvcrt-o* and *pvm-dr1*) were used to study in detail the *P. vivax* genetic variation in the Brazilian Amazon region. Microsatellite typing revealed that *Plasmodium vivax* populations from the Brazilian Amazon region are more diverse than sympatric populations of *P. falciparum*, since they showed a higher number of multiple-clone infections, alleles per locus and virtual heterozygosity. However, both species showed significant linkage disequilibrium (LD). Contrasting the temporal stability of markers under selection, neutral polymorphisms from sympatric isolates of *P. vivax* and *P. falciparum* showed a high haplotype turnover rate, with few lineages persisting over time. Analysis of the central repeat domain of *P. vivax* circumsporozoite protein (CSP) in sympatric isolates of *P. vivax* from Brazil revealed nine *csp* haplotypes. Identical or nearly identical repeat sequences predominated in most arrays, suggesting the recent expansion of these domains. The analysis of 31 SNP sites across the chromosome 8 segment flanking the *csp* locus showed strong LD, suggesting that non-meiotic recombination has an important role in CSP diversity. Next, recurrent *P. vivax* infections were examined in two cohorts from rural Amazonia exposed to low levels of malaria transmission, one of them having high rates of *P. vivax* recurrence after chloroquine (CQ) - primaquine treatment. Microsatellite analysis revealed that only two of 28 pairs of recurrence samples showed identical haplotypes and four pairs with genetically related haplotypes. Microsatellite typing of 99 isolates of *P. vivax* from one of these cohorts revealed an extraordinary diversity over time, with few isolates sharing the same haplotype. These results suggest that frequent recurrences did not favor the persistence or reappearance of clone lineages of parasites in this population. Since cases of *P. vivax* CQ resistance have been reported in the Brazilian Amazon region, we decided to analyze SNPs of coding and non-coding sequences of the *pvm-dr1* and *pvcrt-o* genes (orthologs of *mdr1* and *crt* genes in *P.*

falciparum and associated with drug resistance). These analyses revealed no associations between SNPs and sensitive or resistant phenotype to CQ among studied samples. Finally, 85 SNPs from chromosome 8 of *P. vivax* were genotyped among 234 parasites from different areas of malaria transmission in Brazil and Asia. Different levels of diversity and LD among populations were found, with the highest diversity and strongest LD in parasites from the area of lowest malaria transmission (Sri Lanka). Several clusters of contiguous markers with rare meiotic recombination and relatively conserved haplotype structure among populations were found, suggesting the existence of recombination hotspots in this chromosome region. Silent and nonsynonymous SNPs revealed substantial between-population divergence, being able to cluster parasites according to their continental and subcontinental origin. Marked geographic variation was also observed in allele frequencies of *pvmdr1*.

Key words: Malaria. Genetic variation. Molecular marker. Resistance. Genetic recombination.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A malária como problema de saúde pública

Ocorre transmissão de malária em 21 países do continente americano, com 264 milhões de pessoas expostas ao risco de transmissão¹. No Brasil, a incidência anual de malária multiplicou-se por dez entre 1970 e 1985, estabilizando-se na década seguinte em torno de 500.000 casos anuais. Aumentos recentes de incidência foram registrados em 1999 (636.000 casos) e 2005 (600.000 casos). Mais de 99% das infecções são adquiridas na Amazônia². Além do aumento de incidência, outra mudança substancial foi registrada, em anos recentes, na distribuição das espécies de plasmódios responsáveis por essas infecções. Em meados da década de 1980, as infecções por *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* eram igualmente prevalentes, mas atualmente, mais de 70% dos casos de malária notificados se devem a *P. vivax*^{2,3}. Estes dados sugerem que o incremento recente no número de casos de malária na Amazônia brasileira deve-se, em grande parte, às dificuldades no controle da transmissão de *P. vivax*.

Embora raramente fatal *P. vivax* causa uma doença debilitante que afeta a qualidade de vida e a produtividade econômica das populações endêmicas^{4,5}. Estima-se que, a cada ano, 132-301 milhões de indivíduos estejam infectados por *P. vivax* em todo o mundo; 52% destas infecções ocorrem no sul e sudeste da Ásia, 15% no oriente do mediterrâneo e 10-15% nas Américas^{6,7}. No sul e sudeste da Ásia entre 71 e 81% de todos os casos de malária são causados por esta espécie. No oriente e sul da África um 5% das infecções são atribuídas a *P. vivax*, porem isto equivale a aproximadamente 12 milhões de casos por ano⁸. Apesar de sua alta prevalência e ampla distribuição geográfica, *P. vivax* tem vários aspectos de natureza biológica epidemiológica ainda inexplorados. Esta tese refere-se ao estudo de três destes aspectos: (1) os mecanismos de resistência aos antimaláricos em *P. vivax*; (2) a diversidade genética e a estrutura populacional de *P. vivax*; (3) os padrões de transmissão e de interação, no espaço e no tempo, entre isolados simpátricos de *P. vivax* e *P. falciparum* na Amazônia brasileira.

1.2 Por que estudar a estrutura populacional de *Plasmodium vivax*?

Atualmente sabe-se que *P. falciparum* e *P. vivax* usam a diversidade genética que possuem nos seus genomas para escapar do efeito dos antimaláricos e a imunidade do hospedeiro. Porém, os mecanismos que geram e mantêm esta diversidade são desconhecidos. Para compreender diferentes aspectos da malária, é fundamental estudar e estimar a variação genética e inferir a história evolutiva dos genes e das populações destes parasitas. Este conhecimento é especialmente útil na identificação de alvos de drogas e vacinas e na compreensão de padrões de virulência, interações parasita-hospedeiro e na evolução da resistência às drogas.

Até agora duas abordagens básicas tem sido desenvolvidas nos estudos de genética de populações na malária: (1) aqueles que visam compreender a estrutura genética populacional dos parasitas e a dinâmica intrahospedeiro, incluindo a estabilidade dos isolados e a complexidade das infecções, e (2) estudos que avaliam a diversidade de genes específicos que codificam antígenos vacinais e genes associados com resistência a drogas. Os estudos sobre a estrutura populacional descrevem e quantificam como os alelos estão espacialmente dispersos e como a diversidade genética global está organizada. Estes estudos fornecem indícios importantes sobre a origem, a dispersão e a estabilidade de genótipos multilocus. Esta informação é essencial para prever e acompanhar a eficácia de estratégias de intervenção, tais como: (1) a utilidade específica de terapias combinadas e outros esquemas terapêuticos; (2) a dispersão da resistência a drogas e a emergência de parasitas com fenótipo de multirresistência; (3) o impacto em longo prazo de intervenções físicas, como os mosquiteiros, e (4) a origem de genótipos que podem iludir a resposta imunológica derivada de vacinas multivalentes. O conhecimento da diversidade genética em *P. vivax* também pode ser utilizado para avaliar a diferenciação geográfica e explicar a distribuição espacial dos alelos em um locus determinado. Por exemplo, no fornecimento de informações de base para os sistemas de vigilância direcionados à identificação da origem dos isolados em áreas com eventuais casos importados de malária. Já a análise de genes específicos fornece informações sobre como diferentes alelos são gerados e mantidos na população. Especificamente, aborda a importância de fatores como a recombinação gênica e a seleção natural sobre os polimorfismos observados. Estas abordagens respondem a perguntas sobre a associação de alelos específicos à resistência a drogas e sobre como a

variação genética em um determinado locus pode afetar o desenvolvimento e a implantação de vacinas e esquemas terapêuticos^{9,10}.

Embora a estrutura populacional de *P. falciparum* seja objeto de grande interesse nos últimos anos¹¹⁻¹³, os dados disponíveis sobre a estrutura populacional e a diversidade genética de *P. vivax* ainda são restritos. Esta escassez de dados torna-se dramática em um momento em que surgem relatos cada vez mais numerosos de infecções graves por *P. vivax* e de resistência desse parasita à cloroquina (CQ)^{4,14-17}.

1.3 Marcadores genéticos para estudos populacionais de *P. vivax*

1.3.1 Marcadores neutros

O genoma de *P. falciparum* é altamente polimórfico, abundante em polimorfismos de base única (SNPs do inglês *single-nucleotide polymorphisms*) e microsatélites (MSATs) de DNA (do inglês *Deoxyribonucleic Acid*). Os MSATs são regiões de DNA que contêm repetições em série de motivos (conservados ou degenerados) de 1 a 6 nucleotídeos. Representam regiões instáveis do genoma, que estão sob alterações mutacionais a taxas muito maiores do que as observadas nas sequências de cópia única. Esta instabilidade dos MSATs resulta em marcadores altamente polimórficos. Os alelos diferem no número de repetições em série devido a *crossing over* desigual durante a meiose e, principalmente pelo deslizamento (*strand-slippage*) da DNA polimerase durante a replicação do DNA¹⁸.

No genoma rico em A/T de *P. falciparum*, predominam as repetições de tipo (AT)_n, (TAA)_n e poli-A/T, encontrando-se, em média, um MSAT a cada 1.000 pares de bases (pb) com distribuição heterogênea ao longo do genoma, totalizando 507 marcadores¹⁹. Em comparação, o genoma de *P. vivax* apresenta uma baixa abundância de MSATs: foram identificados aproximadamente 160 marcadores polimórficos entre 8 isolados de referência de *P. vivax*, a maioria deles do tipo trinucleotídeo, com aproximadamente 19 unidades repetitivas por marcador e com conteúdo médio de 27,5% de G/C^{20,21}. No genoma de *P. vivax* também são abundantes as repetições polimórficas em série, com frequência de aproximadamente uma a cada 3 quilo pares de bases (kb do inglês *kilo base pairs*)²⁰.

Assim como em outros organismos, os MSATs tem duas propriedades favoráveis para o mapeamento gênico e os estudos populacionais: sua neutralidade em termos evolutivos e seu alto grau de polimorfismo^{22,23}.

O principal obstáculo para o estudo da estrutura populacional de *P. vivax* foi, até recentemente, a falta de marcadores genéticos adequados para uso em larga escala. Os polimorfismos mais estudados em *P. vivax* ocorrem em genes que codificam antígenos, que podem ser informativos sobre o grau de variação intraespecífica, mas tem a desvantagem de estarem sob pressão seletiva. A seleção natural produz um padrão de diversificação nestes genes que não reflete necessariamente o que ocorre no genoma do parasita como um todo. Como primeiro passo para superar este obstáculo e ampliar o conjunto de marcadores genéticos em *P. vivax*, foram descritas sequências de DNA minissatélite (unidades de 7 a 50 nucleotídeos)²⁰ e de MSAT²⁴⁻²⁷. Estes e outros autores tem discutido o verdadeiro grau de diversidade alélica apresentada por estes marcadores. Um resumo dos principais achados é feito a seguir.

O primeiro MSAT em *P. vivax* foi descrito por Gomez et al.²⁴ no ano de 2003. Este marcador foi obtido a partir da análise da região subtelomérica de um cromossomo artificial de levedura (YAC do inglês *Yeast Artificial Chromosome*). A genotipagem deste MSAT em 89 amostras de Papua Nova Guiné (PNG) revelou uma população de *P. vivax* muito diversa. Em contraste com estes resultados, Leclerc et al. (2004)²⁵ selecionaram 13 candidatos de MSATs a partir de uma biblioteca de DNA enriquecida em sequências repetitivas. Com este conjunto de marcadores, avaliaram a diversidade de 108 isolados de *P. vivax* representando diferentes regiões do mundo. Surpreendentemente, nove dos marcadores foram monomórficos e, dos quatro *loci* restantes, só um deles foi extensamente polimórfico. Estes achados sugeriram, inicialmente, que os MSATs de *P. vivax* além de pouco abundantes²⁸ eram pouco polimórficos. Porém, estudos recentes com novos marcadores vêm revelando o extenso polimorfismo de *P. vivax* em diferentes regiões. Imwong et al. (2006)²⁶ descreveram 11 marcadores de MSATs através dos dados não publicados do genoma de *P. vivax*. A genotipagem de 83 amostras da Ásia e da América do Sul revelou altos índices de diversidade nesta espécie, confirmando os achados preliminares de Gomez et al. (2003)²⁴. Este trabalho atribui a ausência de diversidade observada em *P. vivax* por Leclerc et al. (2004)²⁵ ao uso de marcadores inadequados. Imwong et al. (2006)²⁶ discutem a importância do número de repetições

nos MSATs: no trabalho de Leclerc et al.²⁵ a média de unidades repetitivas nos MSATs foi de 5,5 em contraste com a média de 16 unidades encontrada por Imwong et al.²⁶. O número de unidades repetitivas marca a diferença do marcador pelo simples fato de que havendo mais unidades repetitivas, os erros na replicação são mais frequentes e assim o marcador é mais polimórfico. A alta diversidade observada por Imwong et al. (2006)²⁶ foi corroborada por um trabalho do nosso laboratório²⁹. Através de um conjunto de 14 MSATs de tri e tetranucleotídeos, os autores analisaram a estrutura populacional de 49 isolados de *P. vivax* coletados durante uma coorte prospectiva na Amazônia rural. Esta análise revelou que esta população de parasitas é extremadamente diversa, apresenta uma alta porcentagem de infecções geneticamente mistas e um forte desequilíbrio de ligação. A partir destes trabalhos iniciais, outros autores tem descrito o extenso polimorfismo deste parasitas na Ásia e África³⁰⁻³². Estes trabalhos também tem realizado contribuições importantes para o entendimento da estrutura populacional de *P. vivax*. Karunaweera et al. (2008)³⁰ através do conjunto de 14 marcadores já descritos²⁷ analisou a estrutura populacional de 164 isolados de *P. vivax* representando quatro continentes diferentes. Os achados deste trabalho demonstraram que a alta diversidade desta espécie, o alto número infecções geneticamente mistas e a existência de desequilíbrio de ligação não se restringem às populações de *P. vivax* da Amazônia brasileira, mas também são comuns em populações asiáticas. A análise da estrutura populacional destas amostras não revelou uma clara estruturação geográfica dos isolados, à diferença do que acontece com *P. falciparum*¹². Porém, num trabalho recente envolvendo a genotipagem de 425 isolados de *P. vivax* de Sri Lanka, Mianmar e Etiópia usando o conjunto de marcadores de MSAT previamente descrito²⁷, Gunawardena et al. (2010)³¹ demonstraram que estes marcadores são uma ferramenta eficaz para mapear os isolados segundo sua ancestralidade e origem continental.

Os SNPs são variações genéticas que correspondem às alterações mais elementares da molécula de DNA, ou seja, mutações em bases únicas da cadeia de bases nitrogenadas (Adenina-A, Citosina-C, Timina-T e Guanina-G). As mutações mais comuns são as transições, onde ocorrem trocas de uma purina por outra purina ($A \rightarrow G$) ou de uma pirimidina por outra pirimidina ($C \rightarrow T$). Menos frequentes, as transversões ocorrem quando há troca de uma purina por uma pirimidina, ou vice-versa ($C/T \rightarrow A/G$). Normalmente, os marcadores SNP são bi-alélicos, ou seja, são encontrados apenas dois

variantes. Os SNPs podem ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória. Porém, na maior parte das vezes, são encontrados em espaços intergênicos, sem função determinada.

Os SNPs são abundantes tanto no genoma de *P. falciparum* como de *P. vivax* e podem ser tipados com o uso de diversas técnicas de alto rendimento^{20,33-37}. Em 204 genes situados ao longo do cromossomo 3 de *P. falciparum*, Mu et al. (2002)³³ encontraram em média um SNP a cada 900 pb de DNA ao comparar sequências de cinco isolados, com frequência maior em genes que codificam antígenos e possíveis transportadores do que em genes que codificam proteínas essenciais do metabolismo do parasita. Em *P. vivax*, o estudo de uma região de 100 kb sintênica ao cromossomo 3 de *P. falciparum* (localizada no cromossomo 8 de *P. vivax*) em cinco isolados revelou uma média de um SNP a cada 530 pb de DNA²⁰. Esta abundância de SNPs torna possível o desenvolvimento de mapas gênicos de alta resolução, facilitando estudos de associação, ao nível genômico, entre mutações e genótipos de interesse em populações de parasitas. A maioria dos estudos de SNPs foram realizados em *P. falciparum*, de modo que os dados publicados para *P. vivax* são limitados.

Mu et al. (2005)³⁸ genotiparam 238 SNPs ao longo do cromossomo 3 de *P. falciparum*, em 99 isolados provenientes de diversas áreas geográficas. Este trabalho proporcionou uma comparação precisa entre taxas de recombinação entre populações de parasitas com diferentes níveis de endemicidade, bem como a primeira comparação entre taxas de recombinação em diferentes regiões genômicas, revelando alguns *hot spots* ou sítios ativos de recombinação. Os contrastes nas taxas de recombinação entre populações confirmam os achados prévios de Anderson et al. (2000)¹², com base em análise de MSATs de DNA, de diferentes estruturas genéticas em populações de *P. falciparum* provenientes de regiões com níveis distintos de endemicidade.

Neafsey et al. (2008)³⁵ demonstraram a eficácia de uma plataforma de microarranjo de DNA contendo 3.000 SNPs para a genotipagem do genoma rico em A/T de *P. falciparum*. Dos SNPs tipados, 2.153 localizam-se no cromossomo 7, que alberga o gene *pfcr*t (*Plasmodium falciparum* *Chloroquine Resistance Transporter*), responsável pela resistência à CQ, e os outros 843 SNPs localizam-se nos 13 cromossomos restantes. A genotipagem destes SNPs em 76 isolados de *P. falciparum* representando vários

continentes confirmou a diferenciação genética das populações continentais desta espécie e mostrou níveis variáveis de diversidade genética e padrões de desequilíbrio de ligação atribuídos a origem geográfica das amostras.

Recentemente, Mu et al. (2010)³⁷ desenvolveram mapas genômicos de 189 isolados de *P. falciparum* para identificar eventos de recombinação, genes sob seleção e associados com resistência a diversos antimaláricos. Neste trabalho, foi utilizado um microarranjo de DNA capaz de detectar 3.354 SNPs já descritos³⁶. As análises de estrutura populacional demonstraram que os parasitas podem se agrupar segundo a sua origem continental e que existe subestruturação entre as populações de *P. falciparum*. As análises de recombinação evidenciaram que ao longo do genoma existem sítios com altas e com baixas taxas de recombinação que são conservados entre os isolados de diferentes populações tal e como havia sido demonstrado por Mu et al. (2005)³⁸. Alguns genes codificando proteínas transportadoras como *pfcr*t e antígenos de membrana como *pfama*1 (*Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1) apresentaram evidências de seleção positiva, provavelmente pela pressão seletiva do sistema imune do hospedeiro e o uso de antimaláricos. Os ensaios de sensibilidade *in vitro* aos antimaláricos CQ, quinina (QN), mefloquina (MQ), amodiaquina (AQ) dihidroartemisinina (DHA) e piperquina (PIQ) em 185 amostras de *P. falciparum* demonstraram que todos os parasitas estudados são sensíveis a PIQ e a DHA, porém existe uma sensibilidade diminuída à DHA nos parasitas de Camboja. As análises de associação genômica nos isolados com baixa sensibilidade a estes antimaláricos revelaram dois genes já conhecidos: *pfcr*t e *pfmdr*1 (*Plasmodium falciparum* Multidrug-Resistance Gene 1), e, surpreendentemente, o gene *pfsurfin* pertencente à família multigênica dos genes *surfin* expressos na superfície do eritrócito infectado, acredita-se que este gene seja parte de um complexo de proteínas envolvidas na ligação ou transporte de compostos químicos. Estes três genes (*pfcr*t, *pfmdr*1 e *pfsurfin*) também apresentaram evidências de seleção positiva.

1.3.2 Marcadores sujeitos a seleção

Na ausência inicial de marcadores de MSAT, muitos ortólogos de genes codificantes de antígenos e associados com resistência a drogas já avaliados em *P. falciparum*

começaram a ser estudados em *P. vivax*. Porém, estes marcadores não são considerados os melhores, já que estão sujeitos à seleção pelo sistema imune do hospedeiro e o uso dos antimaláricos. Os marcadores codificantes de genes associados com resistência a drogas incluem os genes que codificam para a *di*hidrofolato *re*ductase (*pvdhfr*), associada com resistência à pirimetamina, *pvmdr1* (*Plasmodium vivax* *M*ultidrug-*R*esistance *G*ene *1*) e *pvcrt-o* (*Plasmodium vivax* *C*hloroquine *R*esistance *T*ransporter-*O*rtholog), ortólogos dos genes *pfmdr1* e *pfcr*t associados à resistência à CQ em *P. falciparum* e que serão discutidos em uma seção posterior. Os marcadores codificantes de antígenos disponíveis para a genotipagem de *P. vivax* incluem os genes codificando para as proteínas de superfície de merozoítos 1 e 3α (PvMSP1 e PvMSP3α), o antígeno de membrana apical 1 (PvAMA1), a proteína do gametócito PvGAM1 (*Plasmodium vivax* *T*ransmission *B*locking *C*andidate *A*ntigen), a proteína de ligação ao eritrócito (PvDBP) e a proteína do circunsporozoíta PvCSP.

A CSP é um dos principais candidatos a vacinas em *P. falciparum* e *P. vivax*, sendo que *pfensp* foi a primeira a ser identificada e clonada³⁹. As proteínas circunsporozoítas de todas as espécies de plasmódios são formadas por um segmento repetitivo central único para cada espécie, flanqueado por regiões não repetitivas conservadas. No caso de *P. falciparum*, o domínio central apresenta uma sequência de repetições em tandem de quatro aminoácidos: NANP e NVDP. Em *P. vivax*, CSP possui no seu domínio central dois tipos de nonapeptídeos: GDRA(A/D)GQPA ou ANGA(G/D)(N/D)QPG, que caracterizam os genótipos VK210 e VK247 respectivamente^{40,41}. Existe um terceiro genótipo de 11 peptídeos APGANQ(E/G)GGAA, denominado *P. vivax-like* por ser muito similar ao domínio repetitivo da CSP de *P. simiovale*, uma espécie de plasmódio descrito em *Macaca sínica*⁴². Diversos estudos tem demonstrado que os polimorfismos na região repetitiva de PvCSP provêm informação importante sobre a distribuição geográfica dos isolados nas regiões endêmicas. A variação entre os alelos CSP ocorre pela duplicação e/ou deleção de segmentos repetitivos, causadas provavelmente pelo deslizamento da polimerase durante a replicação do DNA⁴³. No Brasil, são encontrados os três genótipos mencionados⁴⁴⁻⁴⁶.

Dada a importância deste gene, alguns trabalhos tem sido conduzidos com o intuito de estudar os mecanismos evolutivos que geram diversidade em CSP. Em 2004, Hughes⁴⁷ estudou as características destes domínios repetitivos em *P. falciparum* e outros

organismos. Hughes observou que os arranjos de sequências repetitivas em *P. falciparum* exibem uma revogação de resíduos hidrofóbicos e são significativamente mais comuns nos genes codificantes de antígenos do que nas proteínas do metabolismo. Hughes também descreveu que a média das diferenças nucleotídicas entre as unidades repetitivas dos genes codificantes de antígenos é significativamente menor em *P. falciparum* quando comparado com as unidades repetitivas de outros organismos. Estes resultados, em conjunto, sugerem que os domínios de CSP em *P. falciparum* evoluem de forma aparentemente coordenada, delineada pelo sistema imune do hospedeiro.

Os estudos evolutivos do domínio repetitivo central de CSP em *P. vivax* são muito menos numerosos que em *P. falciparum*. Lim et al. (2005)⁴⁸, através do sequenciamento de 24 isolados representando diferentes regiões geográficas, descreveram um número significativamente menor de substituições sinônimas frente às não-sinônimas nos domínios repetitivos de *pvcsp*. Neste trabalho, os autores sugerem a expansão recente desta espécie, assim como descrito em *P. falciparum* por Ayala e Rich (2000)⁴³ através da análise das regiões polimórficas dos genes *pfmsp1* e *pfmsp2*.

1.4 Explorando dados genômicos de *P. vivax*

Devido à dificuldade da cultura continua *in vitro* de *P. vivax*, às baixas parasitemias da infecção natural e à dificuldade dos isolados de campo se adaptarem aos macacos, as pesquisas em *P. vivax* permaneceram muito negligenciadas, até uma década atrás. Essa situação mudou nos últimos anos, com contribuições importantes como a geração de uma biblioteca de YACs representativa de todo o genoma de *P. vivax*⁴⁹. Esta biblioteca possibilitou a identificação e o estudo de marcadores moleculares importantes^{24,50} e de uma família multigênica (os genes *vir* - *P. vivax variant genes*) que inicialmente acreditou-se estar envolvida em variação antigênica^{51,52}. Porém, estudos posteriores demonstraram que embora os genes *vir* apresentem um papel importante em infecções naturais, as evidências são inconsistentes com um papel preponderante na variação antigênica⁵³. Posteriormente, Feng et al. (2003)²⁰ descreveriam 191 SNPs situados ao longo de 100 kb de um segmento do cromossomo 8 de *P. vivax*. Estes SNPs derivam de uma comparação de sequências obtidas com a biblioteca de YACs⁵⁰ e de quatro isolados de campo de *P. vivax*.

No início deste doutorado os dados do projeto genoma de *P. vivax* não haviam sido publicados. Porém, uma versão preliminar encontrava-se acessível ao público na página web do Instituto para Estudos Genômicos J. Craig Venter (<http://www.jcvi.org>). Os dados do genoma foram recentemente publicados por Carlton et al. (2008)²¹. O genoma de *P. vivax*, como o de outros plasmódios, está distribuído em 14 cromossomos haplóides. O tamanho do genoma de *P. vivax* é aproximadamente três mega bases maior do que o genoma de *P. falciparum*, sendo que, esta diferença está principalmente representada por regiões não-codificantes. A conservação gênica e a sintenia são encontradas em todas as espécies de plasmódios, sendo inversamente proporcional à distância evolutiva entre as espécies do gênero⁵⁴. O número de genes em *P. vivax* (5.433) é muito similar ao de *P. falciparum* (5.403) sendo que, daqueles genes com função conhecida (1.817) em *P. falciparum*, 82% estão presentes em *P. vivax*, e os 18% restantes são únicos para cada espécie⁵⁵. A maior diferença entre os genomas destas duas espécies é o conteúdo de A/T que em *P. falciparum* é 23% maior do que em *P. vivax*. A distribuição destas regiões ricas em A/T é diferente em ambas as espécies já que em *P. vivax* limita-se as regiões subteloméricas.

Esses conjuntos de dados genômicos serviram de base para a definição dos marcadores genéticos utilizados nesta tese: (1) os 14 marcadores de MSAT que foram caracterizados a partir de sequências publicamente disponíveis do projeto genoma de *P. vivax*²⁷ e (2) os 108 SNPs descritos por Feng et al. (2003)²⁰.

1.5 Diversidade genética ao longo do tempo

A grande maioria dos estudos de diversidade genética ao longo do tempo em *P. falciparum* baseiam-se na análise de polimorfismos de genes sujeitos a seleção, na sua maioria candidatos a vacinas. Na literatura encontram-se diversos trabalhos, principalmente estudando a dinâmica dos polimorfismos de genes como *pfmsp1*, *pfmsp2* e *pfmsp*⁵⁶⁻⁵⁹. Os resultados destas pesquisas são contrastantes: a dinâmica destes polimorfismos pode ser muito estável no tempo ou extremamente diversa com uma alta taxa de substituição de haplótipos.

Surpreendentemente, na literatura existem poucos relatos sobre a flutuação no espaço e no tempo de polimorfismos neutros de isolados simpátricos de *P. falciparum*⁶⁰. Esta informação é fundamental para a identificação de genes associados a fenótipos de interesse como aqueles sujeitos a seleção pelo sistema imune do hospedeiro e uso dos antimaláricos. Por tanto, um dos objetivos deste doutorado consistiu em avaliar a dinâmica populacional de *P. falciparum* no estado do Acre - Brasil ao longo de 4 anos. Usamos marcadores neutros e comparamos estes achados com aqueles obtidos da genotipagem do antígeno *pfmsp-2* (*Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 2).

A proteína MSP-2 é expressa na superfície do merozoíto de *P. falciparum*^{61,62} e possui um peso molecular que varia entre 36 – 54 quilo daltons (kDa do inglês *Kilo Dalton*). Esta proteína é altamente polimórfica e, por consequência, muito discriminativa, sendo, por esta razão, usada para análise da complexidade da estrutura de populações do parasita⁶³. A estrutura primária de MSP-2 é caracterizada por uma sequência repetitiva central (bloco central - 3) com um número altamente variável de aminoácidos, sendo por isso responsável por polimorfismos de tamanho. Esta região é flanqueada por sequências específicas não repetitivas (blocos 2 e 4) e duas regiões altamente conservadas (blocos 1 e 5) que correspondem às extremidades N- e C- da proteína, respectivamente. As sequências específicas não repetitivas que flanqueiam a região central podem apresentar um número de unidades relativamente conservadas, variando em número e sequência, de modo que estão descritas para este gene duas famílias alélicas: FC27 e IC (ou 3D7)⁶⁴.

Em *P. vivax* o panorama não é muito diferente do de *P. falciparum*, já que as informações disponíveis sobre a diversidade deste parasita no espaço e no tempo são restritas. Nosso grupo, através da análise de 14 marcadores de MSATs de isolados simpátricos coletados durante 15 meses na Amazônia brasileira, mostrou níveis extraordinários de emergência e substituição de haplótipos ao longo do tempo²⁹. Neste doutorado, objetivou-se explorar esses achados preliminares ampliando-se o tempo de amostragem de isolados de *P. vivax* nessa mesma área empregando-se simultaneamente dois tipos de marcadores genéticos, MSATs de DNA²⁷ e SNPs²⁰. O acréscimo de SNPs permite, pela primeira vez, estudar a recombinação de populações naturais de *P. vivax*, de modo similar ao realizado em *P. falciparum*³⁸.

1.6 Estudo de fenótipos de interesse em *P. vivax*: Resistência aos antimaláricos

1.6.1 A resistência em *P. falciparum* um modelo para o estudo da resistência em *P. vivax*

O tratamento da malária baseia-se principalmente no uso das quinoleínas, seus derivados (CQ, MQ e AQ) e outros medicamentos como os antagonistas dos folatos (sulfadoxina – pirimetamina), alguns antibióticos e os derivados da artemisinina. Na presente data, casos de resistência a todos estes antimaláricos já foram reportados^{65,66}. Um parasita é considerado resistente caso seja capaz de sobreviver e de se multiplicar em sua fase sanguínea assexuada apesar da boa administração e absorção de um regime quimioterapêutico adequado¹⁴.

Acredita-se que a resistência à CQ em *P. falciparum* originou-se a partir de quatro focos diferentes. Um, no Sudeste Asiático, em 1957, na região fronteiriça entre Tailândia e Camboja⁶⁷, dois na América do Sul (Venezuela e Colômbia) em 1960⁶⁸ e um em PNG em 1976. Durante a década de 1980, a resistência à CQ espalhou-se por várias regiões da África⁶⁹. Em 1973, a Tailândia foi o primeiro país que substituiu CQ como primeira linha de tratamento; posteriormente, outros países da América do Sul e do Sudeste Asiático também retiraram CQ de seus esquemas terapêuticos. Na África, somente em 1988, a CQ foi substituída pela sulfadoxina - pirimetamina (SP) e atualmente a maioria dos países desse continente usam a terapia combinada: artemeter + lumefantrine. Porém o uso da CQ em combinação com SP ou artesunato, ainda é comum em alguns países do Sudeste Asiático, Oceania e o Meio Oriente aonde ainda é eficaz⁷⁰. Em infecções causadas por *P. vivax*, a resistência à CQ é limitada apesar do seu amplo uso. Os primeiros relatos de resistência nesta espécie foram descritos entre australianos repatriados de PNG⁷¹. Atualmente, na Ásia, ocorrências de *P. vivax* resistente à CQ limitam-se a algumas regiões da Indonésia, PNG, Mianmar⁷², Tailândia, Vietnã⁷³ e Índia^{74,75}. Na América do Sul, 11 casos de baixa resposta terapêutica à CQ foram observados na Colômbia em 1989⁷⁶ e na Guiana em 1996⁷⁷. Posteriormente, foi reportada na Amazônia brasileira falha parasitológica RII à CQ⁷⁸. Recentemente, de Santana et al. (2007)⁷⁹ descreveram 10% de falha terapêutica à CQ no Estado do Amazonas no Brasil.

1.6.1.1 *Pfcr* na resistência à CQ

Com o objetivo de elucidar as bases genéticas da resistência à CQ, duas estratégias foram adotadas, no final dos anos 90, que conduziram a detalhes importantes da resistência à CQ e a outros antimaláricos. A primeira abordagem consistiu em realizar um cruzamento genético entre HB3 (sensível à CQ) e Dd2 (resistente à CQ) e isolar sua progênie a partir dos estádios assexuados no hospedeiro primata⁸⁰. A tipagem fenotípica da progênie revelou a presença de uma fase de leitura altamente fragmentada (13 éxons), cujo polimorfismo em 10 posições apresentava uma alta correlação com o fenótipo de resistência à CQ de isolados provenientes da Ásia, África, PNG e América do Sul. Este gene foi denominado *pfcr* (*Plasmodium falciparum* *CQ Resistance Transporter*) e uma única substituição, K76T, foi 100% correlacionada com o fenótipo de resistência à CQ *in vitro* e *in vivo*⁸¹. O produto deste gene codifica para uma proteína de 424 aminoácidos (48,62 kDa) que possui 10 domínios transmembrana (DTM). Estudos de imunofluorescência e microscopia eletrônica localizam PfCRT na membrana do vacúolo digestivo (VD) do parasita. Neste compartimento ácido (pH 5,5-5,8) a CQ (uma base fraca não protonada) entra por difusão simples e é imediatamente protonada; nesta nova forma química a CQ é impermeável e acumula-se a altas concentrações (mM). Acredita-se que a CQ mate o parasita ao inibir a dimerização e posterior cristalização da ferroprotoporfirina IX, que é tóxica para o parasita, em hemozoína durante o metabolismo da hemoglobina⁸².

As mutações no *pfcr* conferem resistência à CQ por reduzir a concentração deste medicamento no VD do parasita. Existem principalmente duas hipóteses para explicar este fenômeno: (1) o efluxo da CQ por alterações no pH do VD e/ou (2) a participação de um transportador direto mediando seu efluxo⁸³.

1.6.1.2 *pfmdr1* na resistência à CQ

Na década de 90 uma segunda abordagem revelou que os mecanismos de resistência à CQ em *P. falciparum* apresentavam similaridades com o fenótipo de multirresistência a drogas (MDR) observado em células tumorais de mamíferos; no qual as células neoplásicas desenvolviam tolerância a um amplo espectro de compostos

anticancerígenos estruturalmente não relacionados⁸⁴. O fenótipo MDR de células tumorais é mediado pelo efluxo dos compostos citotóxicos ao meio intracelular. Em células tumorais, o fenótipo MDR está fortemente associado com a superexpressão de um transportador de membrana, dependente de energia, denominado P-gp (*P-glicoproteína*). Esta proteína pertence à superfamília de transportadores ABC (do inglês *ATP-binding Cassette*) que desempenham atividades de translocação de substratos através da membrana celular⁸⁵. Estudos realizados em células tumorais com fenótipo MDR demonstraram que a resistência podia ser revertida mediante a utilização de compostos bloqueadores de canais de Ca^{2+} como o verapamil. Observações sobre o efluxo da CQ em clones de *P. falciparum* resistentes⁸⁶ e sobre a reversão desta resistência pelo verapamil⁸⁷ sugeriram a possível participação de homólogos da P-gp no fenótipo de resistência à CQ. Estas descobertas levaram à procura de homólogos da P-gp em *P. falciparum* e, atualmente, vários estudos sustentam a associação de *pfmdr1* com o fenótipo de resistência a vários antimaláricos em *P. falciparum* e em outras espécies.

No começo da década de 90, a transfecção em *P. falciparum* ainda não tinha sido desenvolvida, portanto a maioria dos estudos funcionais deste gene foi realizada em células de mamífero e levedura. Dois experimentos chave demonstraram a correlação entre *pfmdr1* e o fenótipo de resistência à CQ em *P. falciparum*. O primeiro estudo foi realizado com células de mamífero que expressavam alelos de PfMDR1 previamente associados ao fenótipo sensível e resistente à CQ *in vivo* e *in vitro*. Neste sistema, foi demonstrado que as versões mutantes de PfMDR1, associadas ao fenótipo de resistência à CQ, produziam mudanças no pH dos lisossomos, assim como uma diminuição no acúmulo da CQ. Estes achados comprovaram que mutações em *pfmdr1* podiam alterar a função da proteína, evitando a acidificação do VD e gerando a diminuição na concentração da CQ neste compartimento^{88,89}. Posteriormente, outro experimento que respaldaria esta hipótese, demonstrou que PfMDR1 atuava como transportador do fator alfa (feromônio de acoplamento) quando expresso em *Saccharomyces cerevisiae*, complementando a função do transportador de membrana endógeno (também tipo ABC). Entretanto, a versão mutante de PfMDR1, expressando os polimorfismos associados com resistência à CQ (C1034 e D1042) impediu o acoplamento em *S. cerevisiae*. Estes resultados sugeriram que estes polimorfismos podiam afetar a função da proteína e modular a resistência à CQ em *P. falciparum*⁹⁰.

1.6.1.3 Amplificação de *pfmdr1* e resistência à CQ e a outros antimaláricos

Estudos iniciais correlacionaram a amplificação de *pfmdr1* com o fenótipo de resistência à CQ em isolados de campo^{91,92}. Porém, estudos posteriores realizados *in vitro* demonstraram que linhagens de *P. falciparum* com múltiplas cópias de *pfmdr1* apresentam a deamplificação do gene após adquirir o fenótipo de resistência à CQ⁹³. Paradoxalmente, linhagens de parasitas com maiores níveis de resistência a CQ mostram uma diminuição nos níveis de resistência a MQ⁹⁴⁻⁹⁶. Estas observações sugeriram que a seleção de parasitas resistentes à MQ conduziria à amplificação de *pfmdr1*. Um estudo retrospectivo realizado por Price et al. (2004)⁹⁷ na Tailândia demonstrou que o incremento no número de cópias determina a resistência e a falha terapêutica a MQ *in vitro* e *in vivo*. Neste trabalho, os autores propõem a análise do número de cópias de *pfmdr1*, por PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*) em tempo real, como preditor de falha terapêutica à MQ.

1.6.2 Mecanismos de resistência em *P. vivax*

A grande maioria dos medicamentos existentes para o tratamento da malária por *P. vivax* foram desenvolvidos para o tratamento da malária por *P. falciparum*, pois se acredita que os mecanismos de ação e de resistência sejam semelhantes em ambas as espécies. Há 50 anos, o tratamento da malária por *P. vivax* vem sendo realizado através da CQ e primaquina (PQ). A CQ é utilizada para eliminar os esquizontes do ciclo sanguíneo na fase aguda da infecção e a PQ atua frente aos estágios dormentes do fígado, denominados hipnozoítos, os quais causam as recaídas meses ou anos após a infecção primária⁹⁸. Surpreendentemente, apesar dos quase 20 anos de evidências de resistência à CQ em *P. vivax*, os mecanismos de atividade destes antimaláricos contra o parasita não são ainda compreendidos, e além disso, até muito pouco, foram padronizadas técnicas para a determinação da resistência à CQ^{14,99}.

O diagnóstico da resistência à CQ envolve a medição crítica de CQ e seu metabólito, a desetilcloroquina (DCQ), no sangue do paciente no dia da parasitemia recorrente. Para que o caso seja detectado como de resistência, os níveis de CQ + DCQ devem exceder à concentração mínima efetiva de 100 ng por ml¹⁰⁰, concentração suficiente para eliminar

parasitas sensíveis, sejam estes originados de qualquer uma das três possíveis fontes de recorrências: recrudescências, reinfeções e recaídas. Na recrudescência, os parasitas que sobreviveram ao tratamento da infecção aguda são mantidos em níveis sanguíneos não detectáveis por procedimentos de rotina e reaparecem dias depois na circulação sanguínea. A reinfeção representa um caso decorrente de uma exposição independente aos esporozoítas de um mosquito. A recaída se caracteriza pelo reaparecimento das manifestações da infecção malárica, sintomas clínicos e parasitemia, após o paciente ter recebido terapia esquizonticida sanguínea adequada. Esta recorrência é originada pelos hipnozoítos no fígado, que após um período de tempo variável, por mecanismos ainda desconhecidos, desencadeiam um novo ataque malárico. Como a meia-vida terminal da CQ varia de 30 a 60 dias e existem cepas de *P. vivax* que podem provocar recaídas num curto período de tempo, os parasitas originados de estas recaídas poderão ser eliminados pelos restos de CQ ainda em circulação. Porém, na ausência de um marcador específico de hipnozoítos é difícil diferenciar estes episódios das reinfeções ou parasitemias subpatentes.

Diferentemente de *P. falciparum*, os mecanismos de resistência em *P. vivax* permanecem desconhecidos. Isto se deve, em parte, às dificuldades de uma cultura continua *in vitro* deste parasita. Assim, a procura de mecanismos e marcadores moleculares associados à resistência em *P. vivax* baseia-se no estudo dos genes ortólogos de *pfmdr1* e *pfcr1* de *P. falciparum*. Uma breve descrição dos principais achados é descrita a seguir.

Em 2001, foi descrito por Nomura et al.¹⁰¹ o ortólogo de *pfcr1* em *P. vivax*, denominado *pvcr1-o*. Estes autores demonstraram que não existia associação entre os SNPs de *pvcr1-o* e a resistência à CQ e foi sugerido pela primeira vez que deviam existir mecanismos diferentes de resistência entre *P. falciparum* e *P. vivax*. A proteína codificada por este gene possui 10 DTM e faz parte da superfamília de transportadores de drogas e metabólitos¹⁰². Até a data de hoje, não foi demonstrado o papel funcional direto deste gene no transporte da CQ ou no fenótipo de resistência. Porém, a similaridade entre as sequências de *pfcr1* e *pvcr1-o* sugere que a função destes genes tenha sido conservada.

Estudos funcionais de *pvcr1-o* realizados no nosso laboratório, mostraram que linhagens transgênicas de *P. falciparum* superexpressando *pvcr1-o* apresentavam uma redução significativa de 2,2 vezes na sensibilidade à CQ, sendo este efeito reversível pela adição

de verapamil. Quando expressada a versão selvagem (K76) e mutada (76T) de PvCRT-O no organismo modelo *Dictyostellium discoideum* a incorporação da CQ nos endossomos ácidos deste organismo se reduz em 60%, sendo este efeito também reversível pelo verapamil. Estes resultados sugerem que esta proteína desempenha um papel importante no transporte da CQ¹⁰³.

Em 2005, nosso laboratório¹⁰⁴ e Brega et al.¹⁰⁵ descreveram o homólogo de *pfmdr1* em *P. vivax*. O gene *pvmdr1* ao igual que *pfmdr1*, é composto por um único éxon de 4.395 pb que codifica para uma proteína de 465 aminoácidos (165 kDa). PvMDR1 possui 2 DTM hidrofóbicos que atravessam a membrana múltiplas vezes. Cada DTM consiste em seis segmentos transmembrana (α hélices putativas) com um total de 12 segmentos por molécula de PvMDR1. Os outros dois domínios são hidrofóbicos e possuem um domínio de ligação a nucleotídeo (NBD do inglês *Nucleotide Binding Domain*) que acopla a energia da hidrólise da adenosina trifosfato (ATP) ao processo de transporte. No PvMDR1, cada NBD esta composto por um motivo Walker A e B, e uma assinatura ABC típica. Todas estas características estruturais classificam a PvMDR1 como membro da superfamília de proteínas transportadores ABC.

No trabalho realizado por Sá et al. (2005)¹⁰⁴, estes autores sequenciaram *pvmdr1* em 10 isolados de diferentes regiões do mundo. Dentre as amostras haviam isolados comprovadamente resistentes à CQ. Os resultados evidenciaram que as amostras podiam ser agrupadas de acordo com a origem geográfica, mas não houve associação entre os polimorfismos achados e o fenótipo de resistência à CQ. Já no trabalho feito por Brega et al. (2005)¹⁰⁵, observou-se o polimorfismo Y976F em amostras da Tailândia e Indonésia (áreas com registros de resistência à CQ em *P. vivax*) e o polimorfismo F1076L em isolados da Turquia e Azerbaijão (áreas com alta eficácia à CQ) e novamente em isolados da Tailândia e da Indonésia. Neste trabalho, foi sugerida a associação entre a presença destas duas mutações (no caso do duplo mutante Y976F e F1076L) e o fenótipo de resistência à CQ. Na mesma época o mesmo grupo¹⁰⁶ relatou uma falha à profilaxia com MQ em um soldado francês na Guiana Francesa. O reaparecimento dos parasitas ocorreu um dia após o término da profilaxia, confirmando a resistência parasitológica e clínica. A análise de *pvmdr1* neste parasita não apresentou polimorfismos em *pvmdr1* associados a este fenótipo de resistência à MQ.

A partir da descrição inicial das mutações Y976F e F1076L associados ao fenótipo de resistência à CQ, ao longo destes últimos cinco anos foram publicados tanto trabalhos que sustentam tanto trabalhos que rejeitam esta hipótese. Porém, na atualidade, o valor destes polimorfismos na definição da resistência à CQ e outros antimaláricos não está bem definida.

Suwanarusk et al. (2007)⁹⁹ investigaram a sensibilidade *in vitro* à CQ e os polimorfismos de *pvcrt-o* e *pvmdr1* de isolados de *P. vivax* coletados de Papua e Indonésia, onde altos níveis de resistência clínica à CQ tem sido relatados, e da Tailândia, onde o tratamento com CQ é geralmente eficaz. Os resultados deste trabalho demonstraram que os níveis de IC₅₀ (concentração da droga equivalente a 50% de inibição dos parasitas) à CQ foram significativamente maiores em Papua e Indonésia frente à Tailândia, com um número significativo de parasitas resistentes à CQ em ambas as regiões [13,6% (11/81) na Tailândia e 65% (94/145) nos isolados de Papua]. A mutação Y976F em *pvmdr1* esteve presente em 96% (123/128) dos isolados de Papua e 25% (17/69) dos isolados da Tailândia, sendo que o IC₅₀ à CQ foi significativamente muito maior nos isolados com a mutação Y976F quando comparado com isolados do tipo selvagem. Neste trabalho a amplificação de *pvmdr1* também foi explorada, sendo que ocorreu em 23% (15/66) dos isolados da Tailândia e em nenhum dos isolados da Indonésia (0/104), porém a amplificação de *pvmdr1* não esteve associada com a resistência à CQ. Estes mesmos autores¹⁰⁷ exploraram a susceptibilidade *in vitro* de *P. vivax* a vários antimaláricos e sua correlação com o número de cópias e o polimorfismo 976 de *pvmdr1* em isolados da Tailândia e Indonésia coletados entre 2003 e 2007. Seus resultados demonstraram que o aumento do número de cópias de *pvmdr1* esteve presente em 21% (15/71) dos isolados provenientes da Tailândia, mas em nenhum dos isolados da Indonésia (0/ 114). Quando comparados com os isolados da Indonésia, os valores médios de IC₅₀ dos isolados da Tailândia foram menores para a CQ, mas superior para a AQ, artesunato (ASU) e MQ. Ensaio de sensibilidade *in vitro* de 11 isolados da Tailândia apresentando o maior número de cópias para *pvmdr1* revelaram que estes parasitas apresentavam os maiores níveis de IC₅₀ para a MQ frente àqueles albergando uma única cópia de *pvmdr1*. Em comparação com os isolados com o alelo selvagem Y976, a mutação 976F de *pvmdr1* esteve associada significativamente com uma menor sensibilidade à CQ, porém uma maior suscetibilidade a ASU e à MQ. Estes resultados em conjunto demonstram pela

primeira vez que a CQ e a MQ parecem exercer pressão seletiva competitiva em *pvmdr1*, como é observado com *pfmdr1* em *P. falciparum*.

Também no ano de 2008, Imwong et al.¹⁰⁸ analisaram por PCR em tempo real a amplificação de *pvmdr1* em 66 isolados do oeste da Tailândia e de 149 amostras coletadas de outros países do Sudeste Asiático. Estes autores demonstraram que a amplificação de *pvmdr1* é significativamente maior nas amostras do oeste da Tailândia onde a MQ tem sido amplamente utilizada para o tratamento de *P. falciparum*. Estes achados sugerem que existe uma relação entre o número de cópias de *pvmdr1* e o uso generalizado da MQ, tal como acontece com *P. falciparum*⁹⁷. Estes autores também sequenciaram *pvmdr1* em 21 isolados; a prevalência dos duplos mutantes (Y976F e F1076L) foi de 31% (n = 13) nos isolados de diversas localidades e a mutação Y976F foi descrita em 1/11 e 3/5 isolados de Tailândia e Mianmar, respectivamente. Os autores não acharam correlação entre a amplificação gênica de *pvmdr1* e os polimorfismos neste gene.

Também no ano de 2008, Barnadas et al.¹⁰⁹ avaliaram a resposta clínica à CQ em 105 indivíduos de seis localidades de Madagascar encontrando porcentagens de falha terapêutica à CQ consideráveis (entre 5,1% e 14,8%). Neste trabalho os autores também avaliaram SNPs em *pvcrt-o* (éxons 1–6) e *pvmdr1*. Seus resultados demonstraram que todas as amostras apresentaram o tipo selvagem para *pvcrt-o*. Para *pvmdr1* descreveram 10 mutações não-sinônimas incluindo cinco novas, quatro delas apresentando-se em baixas frequências (1,3%-7,5%), enquanto que a mutação S513R foi muito prevalente (96,3%). As outras cinco mutações, incluindo Y976F, tiveram frequências entre 97,8% e 100%. Estes autores concluem a existência de parasitas resistentes à CQ no Madagascar e a ineficácia da mutação Y976F de *pvmdr1* no monitoramento desta resistência nas localidades avaliadas.

Num outro trabalho recente em PNG, investigou-se a associação entre o genótipo dos genes *pvdhfr* e *pvmdr1* e a resposta ao tratamento com AQ + SP, primeira linha de tratamento para a malária não complicada por *P. falciparum* e por *P. vivax* neste país. As taxas de falha terapêutica a este tratamento atingiram 13%. Neste trabalho foram estudadas cinco posições em *pvdhfr*, e a mutação Y976F. Estes autores observaram que os quádruplos mutantes para *pvdhfr* que também apresentaram a mutação Y976F em

*pvm**dr1* foram os melhores preditores de falha terapêutica à AQ + SP. Este trabalho propõe estes polimorfismos de *pvm**dr1* e *pvdhfr* como um novo marcador molecular para detectar falha terapêutica a AQ + SP. Este trabalho é o primeiro em indicar que *pvm**dr1* apresenta um papel importante mediando a resistência *in vivo* em *P. vivax*¹¹⁰.

Existem poucos estudos quanto à prevalência de polimorfismos de *pvm**dr1* no Brasil, sendo que estes, em sua maioria, investigam poucos isolados de *P. vivax*. Recentemente, num trabalho realizado por Gama et al. (2009)¹¹¹ foram avaliados os SNPs Y976F e F1076L de *pvm**dr1* em 28 isolados de *P. vivax* coletados no ano de 2004 no município de Paragominas ao Noroeste do Pará. Neste trabalho são descritas as prevalências dos duplos mutantes (Y976F e F1076L) achados em 14,3% dos isolados frente a um 8,57% dos isolados albergando só a mutação Y976F; o haplótipo selvagem Y976 e F1076 não foi encontrado.

Outro aspecto importante é o potencial envolvimento dos genes *pvcrt-o* e *pvm**dr1* na malária grave causada por *P. vivax*. Recentemente, foi sugerido que a resistência à CQ pode estar associada com a malária grave em *P. vivax*¹⁵. Fernandez-Becerra et al. (2009)¹¹², avaliaram os níveis de transcritos destes dois genes num paciente com malária grave e observaram que os parasitas deste episódio apresentaram um aumento significativo de 1,6 vezes nos níveis de expressão de *pvm**dr1* e de 21,9 vezes em *pvcrt-o* em relação ao outro paciente que apresentou sintomas leves de malária vivax. Estes autores sugerem explorar o potencial de *pvm**dr1* e particularmente *pvcrt-o* como marcadores moleculares de doença grave nesta espécie.

5 CONCLUSÕES

Com os resultados deste trabalho podemos concluir que:

- Durante a amplificação dos MSATs, nas amostras policlonais avaliadas neste trabalho, certos alelos são amplificados preferencialmente. Estes vieses podem conduzir a erros na atribuição do haplótipo predominante e afetar a análise de infecções geneticamente mistas.
- Na genotipagem de MSATs, a técnica de amplificação genômica (WGA) não afeta a capacidade de detecção de alelos múltiplos em infecções policlonais, nem altera a proporção relativa entre eles.
- *P. falciparum* apresenta uma menor diversidade, menor proporção de infecções geneticamente mistas e número de alelos por locus que as populações simpátricas de *P. vivax*.
- A dinâmica de polimorfismos neutros de *P. falciparum* e *P. vivax* está caracterizada por uma alta taxa de substituição de haplótipos ao longo do tempo.
- A diversificação gradual dos polimorfismos neutros não é a principal explicação para alta taxa de substituição haplotípica observada em *P. falciparum* e *P. vivax*.
- A dinâmica de polimorfismos sujeitos a seleção de *P. falciparum* e *P. vivax* está caracterizada pela sua estabilidade ao longo do tempo.
- Os domínios repetitivos de CSP de populações de *P. vivax* do Granada apresentam poucas substituições nucleotídicas e arranjos repetitivos similares. Estes achados indicam que estes domínios foram originados a partir de um antecessor recente através de mecanismos de duplicação.
- Tanto alelos idênticos de CSP com diferentes haplótipos de cromossomo 8 quanto haplótipos idênticos de cromossomo 8 com alelos diferentes de CSP são encontrados em parasitas do Granada. Estes resultados sugerem que outros mecanismos de recombinação além da meiótica, tais como a recombinação homóloga, podem ter um papel fundamental na geração de diversidade em CSP.

- Na Amazônia brasileira, *P. falciparum* e *P. vivax* apresentam evidências significantes de desequilíbrio de ligação, consistente com a expansão clonal destes parasitas.
- A grande maioria das recorrências por *P. vivax* no Granada são diagnosticadas até 180 dias após o primeiro episódio de malária.
- As altas taxas de recorrências por *P. vivax* na Amazônia brasileira são causadas, em sua maioria, por parasitas geneticamente não relacionados.
- Descrevemos e validamos um conjunto de 57 SNPs polimórficos do cromossomo 8 de *P. vivax* para estudos moleculares nesta espécie.
- Populações de *P. vivax* de diferentes áreas de transmissão de malária são altamente diversas, possuem estrutura populacional continental e subcontinental e um extenso desequilíbrio de ligação.
- Os SNPs de *pvcrt-o* e *pvmdr1* descritos em isolados de *P. vivax* sensíveis e resistentes à CQ não se correlacionam com seu fenótipo.
- As mutações Y976F e F1076L de *pvmdr1* previamente associadas ao fenótipo de resistência à CQ foram muito prevalentes na Ásia, em contraste com o haplótipo selvagem, que predomina no Brasil.
- Em PvMDR1, a mutação Y976F só acontece em associação com a mutação F1076L.
- Foram obtidas 6 linhagens transgênicas estáveis e clonais de *P. falciparum* que em teoria superexpressam *pvmdr1*. Porém pelos métodos aqui descritos não foi possível detectar a proteína transgênica PvMDR1. Ensaio de sensibilidade *in vitro* destas linhagens a quatro antimaláricos não mostraram diferenças significativas nos valores de IC₅₀ frente ao parasita selvagem (3D7).

REFERÊNCIAS*

1 Pan American Health Organization. PAHO. Regional Strategic Plan for Malaria in the Americas 2006-2010. 2006. Available from: <http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/mal-reg-strat-plan-06.pdf> [2009 Dec 03].

2 Brasil. Ministério da Saúde. Tópicos de Saúde - Malaria. Distribuição de casos confirmados de malária de 1985-2005. 2007. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21818 [2010 jan 14].

3 Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Plano de intensificação das ações de controle da malária na Amazônia Legal. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 2000.

4 Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. Am J Trop Med Hyg. 2001;64(1-2 Suppl):97-106.

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

6 Guerra CA, Snow RW, Hay SI. Mapping the global extent of malaria in 2005. Trends Parasitol. 2006;22(8):353-8.

7 Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. Lancet Infect Dis. 2004;4(6):327-36.

8 Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. *Vivax* malaria: neglected and not benign. Am J Trop Med Hyg. 2007;77(6 Suppl):79-87.

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

10 Das A, Bajaj R, Mohanty S, Swain V. Genetic diversity and evolutionary history of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. Current Science. 2007;92(11):1516-24.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html [2010 May 15].

- 11 Babiker HA, Walliker D. Current views on the population structure of *Plasmodium falciparum*: Implications for control. *Parasitol Today*. 1997;13(7):262-7.
- 12 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;17(10):1467-82.
- 13 Awadalla P, Walliker D, Babiker H, Mackinnon M. The question of *Plasmodium falciparum* population structure. *Trends Parasitol*. 2001;17(8):351-3.
- 14 Baird JK. Resistance to therapies for infection by *Plasmodium vivax*. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(3):508-34.
- 15 Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, et al. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med*. 2008;5(6):e128.
- 16 Genton B, D'Acremont V, Rare L, Baea K, Reeder JC, Alpers MP, et al. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Med*. 2008;5(6):e127.
- 17 Kochar DK, Saxena V, Singh N, Kochar SK, Kumar SV, Das A. *Plasmodium vivax* malaria. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(1):132-4.
- 18 Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet*. 2004;5:435-45.
- 19 Su X, Wellems TE. Toward a high-resolution *Plasmodium falciparum* linkage map: polymorphic markers from hundreds of simple sequence repeats. *Genomics*. 1996;33(3):430-44.
- 20 Feng X, Carlton JM, Joy DA, Mu J, Furuya T, Suh BB, et al. Single-nucleotide polymorphisms and genome diversity in *Plasmodium vivax*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8502-7.
- 21 Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, Caler E, et al. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature*. 2008;455(7214):757-63.

- 22 Anderson TJ, Su XZ, Bockarie M, Lagog M, Day KP. Twelve microsatellite markers for characterization of *Plasmodium falciparum* from finger-prick blood samples. *Parasitology*. 1999;119 (Pt 2):113-25.
- 23 Polley SD, Chokejindachai W, Conway DJ. Allele frequency-based analyses robustly map sequence sites under balancing selection in a malaria vaccine candidate antigen. *Genetics*. 2003;165(2):555-61.
- 24 Gomez JC, McNamara DT, Bockarie MJ, Baird JK, Carlton JM, Zimmerman PA. Identification of a polymorphic *Plasmodium vivax* microsatellite marker. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;69(4):377-9.
- 25 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;101(40):14455-60.
- 26 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;23(5):1016-8.
- 27 Karunaweera ND, Ferreira MU, Hartl DL, Wirth DF. Fourteen polymorphic microsatellite DNA markers for the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Molecular Ecology Notes*. 2007;7:172-5.
- 28 Carlton J. The *Plasmodium vivax* genome sequencing project. *Trends Parasitol*. 2003;19(5):227-31.
- 29 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;195(8):1218-26.
- 30 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;410(1):105-12.
- 31 Gunawardena S, Karunaweera ND, Ferreira MU, Phone-Kyaw M, Pollack RJ, Alifrangis M, et al. Geographic structure of *Plasmodium vivax*: microsatellite analysis of parasite populations from Sri Lanka, Myanmar, and Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82(2):235-42.

- 32 Van den Eede P, Erhart A, Van der Auwera G, Van Overmeir C, Thang ND, Hung le X, et al. 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;82(2):223-7.
- 33 Mu J, Duan J, Makova KD, Joy DA, Huynh CQ, Branch OH, et al. Chromosome-wide SNPs reveal an ancient origin for *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2002;418(6895):323-6.
- 34 Volkman SK, Sabeti PC, DeCaprio D, Neafsey DE, Schaffner SF, Milner DA, Jr., et al. A genome-wide map of diversity in *Plasmodium falciparum*. *Nat Genet.* 2007;39(1):113-9.
- 35 Neafsey DE, Schaffner SF, Volkman SK, Park D, Montgomery P, Milner DA, Jr., et al. Genome-wide SNP genotyping highlights the role of natural selection in *Plasmodium falciparum* population divergence. *Genome Biol.* 2008;9(12):R171.
- 36 Mu J, Awadalla P, Duan J, McGee KM, Keebler J, Seydel K, et al. Genome-wide variation and identification of vaccine targets in the *Plasmodium falciparum* genome. *Nat Genet.* 2007;39(1):126-30.
- 37 Mu J, Myers RA, Jiang H, Liu S, Ricklefs S, Waisberg M, et al. *Plasmodium falciparum* genome-wide scans for positive selection, recombination hot spots and resistance to antimalarial drugs. *Nat Genet.* 2010;42(3):268-71.
- 38 Mu J, Awadalla P, Duan J, McGee KM, Joy DA, McVean GA, et al. Recombination hotspots and population structure in *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol.* 2005;3(10):e335.
- 39 Dame JB, Williams JL, McCutchan TF, Weber JL, Wirtz RA, Hockmeyer WT, et al. Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science.* 1984;225(4662):593-9.
- 40 Arnot DE, Barnwell JW, Tam JP, Nussenzweig V, Nussenzweig RS, Enea V. Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*: gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. *Science.* 1985;230(4727):815-8.
- 41 Rosenberg R, Wirtz RA, Lanar DE, Sattabongkot J, Hall T, Waters AP, et al. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Science.* 1989;245(4921):973-6.

- 42 Qari SH, Shi YP, Goldman IF, Udhayakumar V, Alpers MP, Collins WE, et al. Identification of *Plasmodium vivax*-like human malaria parasite. Lancet. 1993;341(8848):780-3.
- 43 Ayala FJ, Rich SM. Genetic variation and the recent worldwide expansion of *Plasmodium falciparum*. Gene. 2000;261(1):161-70.
- 44 Storti-Melo LM, de Souza-Neiras WC, Cassiano GC, Joazeiro AC, Fontes CJ, Bonini-Domingos CR, et al. *Plasmodium vivax* circumsporozoite variants and Duffy blood group genotypes in the Brazilian Amazon region. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009;103(7):672-8.
- 45 de Arruda M, Souza RC, Veiga ME, Ferreira AF, Zimmerman RH. Prevalence of *Plasmodium vivax* variants VK247 and P. vivax-like human malaria: a retrospective study in indigenous Indian populations of the Amazon region of Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1998;92(6):628.
- 46 Machado RL, Pova MM. Distribution of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247 and P. vivax-like) in three endemic areas of the Amazon region of Brazil and their correlation with chloroquine treatment. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000;94(4):377-81.
- 47 Hughes AL. The evolution of amino acid repeat arrays in *Plasmodium* and other organisms. J Mol Evol. 2004;59(4):528-35.
- 48 Lim CS, Tazi L, Ayala FJ. *Plasmodium vivax*: recent world expansion and genetic identity to *Plasmodium simium*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(43):15523-8.
- 49 Camargo AA, Fischer K, Lanzer M, del Portillo HA. Construction and characterization of a *Plasmodium vivax* genomic library in yeast artificial chromosomes. Genomics. 1997;42(3):467-73.
- 50 Tchavtchitch M, Fischer K, Huestis R, Saul A. The sequence of a 200 kb portion of a *Plasmodium vivax* chromosome reveals a high degree of conservation with *Plasmodium falciparum* chromosome 3. Mol Biochem Parasitol. 2001;118(2):211-22.
- 51 Merino EF, Fernandez-Becerra C, Durham AM, Ferreira JE, Tumilasci VF, d'Arc-Neves J, et al. Multi-character population study of the *vir* subtelomeric multigene superfamily of *Plasmodium vivax*, a major human malaria parasite. Mol Biochem Parasitol. 2006;149(1):10-6.

52 del Portillo HA, Fernandez-Becerra C, Bowman S, Oliver K, Preuss M, Sanchez CP, et al. A superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of *Plasmodium vivax*. *Nature*. 2001;410(6830):839-42.

53 Fernandez-Becerra C, Pein O, de Oliveira TR, Yamamoto MM, Cassola AC, Rocha C, et al. Variant proteins of *Plasmodium vivax* are not clonally expressed in natural infections. *Mol Microbiol*. 2005;58(3):648-58.

54 Kooij TW, Carlton JM, Bidwell SL, Hall N, Ramesar J, Janse CJ, et al. A *Plasmodium* whole-genome synteny map: indels and synteny breakpoints as foci for species-specific genes. *PLoS Pathog*. 2005;1(4):e44.

55 Das A, Sharma M, Gupta B, Dash AP. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*: so similar, yet very different. *Parasitol Res*. 2009;105(4):1169-71.

56 Noranate N, Prugnolle F, Jouin H, Tall A, Marrama L, Sokhna C, et al. Population diversity and antibody selective pressure to *Plasmodium falciparum* MSP1 block2 locus in an African malaria-endemic setting. *BMC Microbiol*. 2009;9:219.

57 Baruah S, Lourembam SD, Sawian CE, Baruah I, Goswami D. Temporal and spatial variation in MSP1 clonal composition of *Plasmodium falciparum* in districts of Assam, Northeast India. *Infect Genet Evol*. 2009;9(5):853-9.

58 Genton B, Betuela I, Felger I, Al-Yaman F, Anders RF, Saul A, et al. A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea. *J Infect Dis*. 2002;185(6):820-7.

59 Conway DJ, Greenwood BM, McBride JS. Longitudinal study of *Plasmodium falciparum* polymorphic antigens in a malaria-endemic population. *Infect Immun*. 1992;60(3):1122-7.

60 Pumpaibool T, Arnathau C, Durand P, Kanchanakhan N, Siripoon N, Suegorn A, et al. Genetic diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* in Thailand, a low transmission country. *Malar J*. 2009;8:155.

61 Smythe JA, Coppel RL, Brown GV, Ramasamy R, Kemp DJ, Anders RF. Identification of two integral membrane proteins of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(14):5195-9.

- 62 Fenton B, Clark JT, Wilson CF, McBride JS, Walliker D. Polymorphism of a 35-48 kDa *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen. Mol Biochem Parasitol. 1989;34(1):79-86.
- 63 Basco LK, Tahar R, Escalante A. Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XVIII. Polymorphisms of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 gene in isolates from symptomatic patients. Am J Trop Med Hyg. 2004;70(3):238-44.
- 64 Smythe JA, Coppel RL, Day KP, Martin RK, Oduola AM, Kemp DJ, et al. Structural diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 2. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(5):1751-5.
- 65 Talisuna AO, Bloland P, D'Alessandro U. History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance. Clin Microbiol Rev. 2004;17(1):235-54.
- 66 Dondorp AM, Yeung S, White L, Nguon C, Day NP, Socheat D, et al. Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. Nat Rev Microbiol. 2010;8(4):272-80.
- 67 Harinasuta T, Suntharasamai P, Viravan C. Chloroquine-resistant *falciparum* malaria in Thailand. Lancet. 1965;2(7414):657-60.
- 68 Moore DV, Lanier JE. Observations on two *Plasmodium falciparum* infections with an abnormal response to chloroquine. Am J Trop Med Hyg. 1961;10:5-9.
- 69 D'Alessandro U, Buttiens H. History and importance of antimalarial drug resistance. Trop Med Int Health. 2001;6(11):845-8.
- 70 World Health Organization. WHO. World Malaria Report 2008. 2008. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241563697_eng.pdf [2010 Jan 10].
- 71 Schuurkamp GJ, Spicer PE, Kereu RK, Bulungol PK, Rieckmann KH. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* in Papua New Guinea. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1992;86(2):121-2.
- 72 Myat Phone K, Myint O, Myint L, Thaw Z, Kyin Hla A, Nwe Nwe Y. Emergence of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* in Myanmar (Burma). Trans R Soc Trop Med Hyg. 1993;87(6):687.

- 73 Phan GT, de Vries PJ, Tran BQ, Le HQ, Nguyen NV, Nguyen TV, et al. Artemisinin or chloroquine for blood stage *Plasmodium vivax* malaria in Vietnam. Trop Med Int Health. 2002;7(10):858-64.
- 74 Garg M, Gopinathan N, Bodhe P, Kshirsagar NA. Vivax malaria resistant to chloroquine: case reports from Bombay. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1995;89(6):656-7.
- 75 Dua VK, Kar PK, Sharma VP. Chloroquine resistant *Plasmodium vivax* malaria in India. Trop Med Int Health. 1996;1(6):816-9.
- 76 Arias AE, Corredor A. Low response of Colombian strains of *Plasmodium vivax* to classical antimalarial therapy. Trop Med Parasitol. 1989;40(1):21-3.
- 77 Phillips EJ, Keystone JS, Kain KC. Failure of combined chloroquine and high-dose primaquine therapy for *Plasmodium vivax* malaria acquired in Guyana, South America. Clin Infect Dis. 1996;23(5):1171-3.
- 78 Alecrim M, Alecrim W, Macedo V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. Rev Soc Bras Med Trop. 1999;32(1):67-8.
- 79 de Santana Filho FS, Arcanjo AR, Chehuan YM, Costa MR, Martinez-Espinosa FE, Vieira JL, et al. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. Emerg Infect Dis. 2007;13(7):1125-6.
- 80 Wellems TE, Panton LJ, Gluzman IY, do Rosario VE, Gwadz RW, Walker-Jonah A, et al. Chloroquine resistance not linked to mdr-like genes in a *Plasmodium falciparum* cross. Nature. 1990;345(6272):253-5.
- 81 Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y, et al. A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. N Engl J Med. 2001;344(4):257-63.
- 82 Pagola S, Stephens PW, Bohle DS, Kosar AD, Madsen SK. The structure of malaria pigment beta-haematin. Nature. 2000;404(6775):307-10.
- 83 Sanchez CP, Dave A, Stein WD, Lanzer M. Transporters as mediators of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. Int J Parasitol. In press 2010.
- 84 Endicott JA, Ling V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. Annu Rev Biochem. 1989;58:137-71.

85 Bolhuis H, van Veen HW, Poolman B, Driessen AJ, Konings WN. Mechanisms of multidrug transporters. FEMS Microbiol Rev. 1997;21(1):55-84.

86 Krogstad DJ, Gluzman IY, Kyle DE, Oduola AM, Martin SK, Milhous WK, et al. Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. Science. 1987;238(4831):1283-5.

87 Martin SK, Oduola AM, Milhous WK. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. Science. 1987;235(4791):899-901.

88 Van Es HH, Renkema H, Aerts H, Schurr E. Enhanced lysosomal acidification leads to increased chloroquine accumulation in CHO cells expressing the *pfmdr1* gene. Mol Biochem Parasitol. 1994;68(2):209-19.

89 Van Es HH, Karcz S, Chu F, Cowman AF, Vidal S, Gros P, et al. Expression of the plasmodial *pfmdr1* gene in mammalian cells is associated with increased susceptibility to chloroquine. Mol Cell Biol. 1994;14(4):2419-28.

90 Volkman SK, Cowman AF, Wirth DF. Functional complementation of the *ste6* gene of *Saccharomyces cerevisiae* with the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(19):8921-5.

91 Foote SJ, Thompson JK, Cowman AF, Kemp DJ. Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P. falciparum*. Cell. 1989;57(6):921-30.

92 Wilson CM, Serrano AE, Wasley A, Bogenschutz MP, Shankar AH, Wirth DF. Amplification of a gene related to mammalian *mdr* genes in drug-resistant *Plasmodium falciparum*. Science. 1989;244(4909):1184-6.

93 Triglia T, Foote SJ, Kemp DJ, Cowman AF. Amplification of the multidrug resistance gene *pfmdr1* in *Plasmodium falciparum* has arisen as multiple independent events. Mol Cell Biol. 1991;11(10):5244-50.

94 Peel SA, Bright P, Yount B, Handy J, Baric RS. A strong association between mefloquine and halofantrine resistance and amplification, overexpression, and mutation in the P-glycoprotein gene homolog (*pfmdr*) of *Plasmodium falciparum* in vitro. Am J Trop Med Hyg. 1994;51(5):648-58.

95 Peel SA, Merritt SC, Handy J, Baric RS. Derivation of highly mefloquine-resistant lines from *Plasmodium falciparum* in vitro. Am J Trop Med Hyg. 1993;48(3):385-97.

- 96 Barnes DA, Foote SJ, Galatis D, Kemp DJ, Cowman AF. Selection for high-level chloroquine resistance results in deamplification of the *pfmdr1* gene and increased sensitivity to mefloquine in *Plasmodium falciparum*. EMBO J. 1992;11(8):3067-75.
- 97 Price RN, Uhlemann AC, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, et al. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. Lancet. 2004;364(9432):438-47.
- 98 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;31(6):1291-3.
- 99 Suwanarusk R, Russell B, Chavchich M, Chalfein F, Kenangalem E, Kosaisavee V, et al. Chloroquine resistant *Plasmodium vivax*: in vitro characterisation and association with molecular polymorphisms. PLoS One. 2007;2(10):e1089.
- 100 Baird JK, Leksana B, Masbar S, Suradi, Sutanihardja MA, Fryauff DJ, et al. Whole blood chloroquine concentrations with *Plasmodium vivax* infection in Irian Jaya, Indonesia. Am J Trop Med Hyg. 1997;56(6):618-20.
- 101 Nomura T, Carlton JM, Baird JK, del Portillo HA, Fryauff DJ, Rathore D, et al. Evidence for different mechanisms of chloroquine resistance in 2 *Plasmodium* species that cause human malaria. J Infect Dis. 2001;183(11):1653-61.
- 102 Bray PG, Martin RE, Tilley L, Ward SA, Kirk K, Fidock DA. Defining the role of PfCRT in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance. Mol Microbiol. 2005;56(2):323-33.
- 103 Sa JM, Yamamoto MM, Fernandez-Becerra C, de Azevedo MF, Papakrivos J, Naude B, et al. Expression and function of *pvcrt-o*, a *Plasmodium vivax* ortholog of *pfCRT*, in *Plasmodium falciparum* and *Dictyostelium discoideum*. Mol Biochem Parasitol. 2006;150(2):219-28.
- 104 Sa JM, Nomura T, Neves J, Baird JK, Wellems TE, del Portillo HA. *Plasmodium vivax*: allele variants of the *mdr1* gene do not associate with chloroquine resistance among isolates from Brazil, Papua, and monkey-adapted strains. Exp Parasitol. 2005;109(4):256-9.
- 105 Brega S, Meslin B, de Monbrison F, Severini C, Gradoni L, Udomsangpetch R, et al. Identification of the *Plasmodium vivax* *mdr*-like gene (*pvmdr1*) and analysis of single-nucleotide polymorphisms among isolates from different areas of endemicity. J Infect Dis. 2005;191(2):272-7.

106 Picot S, Brega S, Gerome P, Velut G, de Monbrison F, Cheminel V, et al. Absence of nucleotide polymorphism in a *Plasmodium vivax* multidrug resistance gene after failure of mefloquine prophylaxis in French Guyana. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2005;99(3):234-7.

107 Suwanarusk R, Chavchich M, Russell B, Jaidee A, Chalfein F, Barends M, et al. Amplification of *pvm-dr1* associated with multidrug-resistant *Plasmodium vivax*. *J Infect Dis.* 2008;198(10):1558-64.

108 Imwong M, Pukrittayakamee S, Pongtavornpinyo W, Nakeesathit S, Nair S, Newton P, et al. Gene amplification of the multidrug resistance 1 gene of *Plasmodium vivax* isolates from Thailand, Laos, and Myanmar. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(7):2657-9.

109 Barnadas C, Ratsimbao A, Tichit M, Bouchier C, Jahevitra M, Picot S, et al. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in Madagascar: clinical efficacy and polymorphisms in *pvm-dr1* and *pvcrt-o* genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(12):4233-40.

110 Marfurt J, de Monbrison F, Brega S, Barbolat L, Muller I, Sie A, et al. Molecular markers of in vivo *Plasmodium vivax* resistance to amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine: mutations in *pvdhfr* and *pvm-dr1*. *J Infect Dis.* 2008;198(3):409-17.

111 Gama BE, de Oliveira NK, de Souza JM, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz Mde F. Characterisation of *pvm-dr1* and *pvdhfr* genes associated with chemoresistance in Brazilian *Plasmodium vivax* isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(7):1009-11.

112 Fernandez-Becerra C, Pinazo MJ, Gonzalez A, Alonso PL, del Portillo HA, Gascon J. Increased expression levels of the *pvcrt-o* and *pvm-dr1* genes in a patient with severe *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J.* 2009;8:55.

113 Moll K, Ljungström I, Perlmann H, Scherf A, Wahlgren M, editors. Methods in malaria research. Manassas: Malaria Research and Reference Reagent Resource Center (MR4); 2008 [cited. Available from: http://www.mr4.org/Portals/3/Methods_In_Malaria_Research-5theditionv5-2.pdf [2009 Nov 09].

114 Kimura M, Kaneko O, Liu Q, Zhou M, Kawamoto F, Watayad Y, et al. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasitology International* 1997;46:91-5.

- 115 Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;61(2):315-20.
- 116 Dean FB, Hosono S, Fang L, Wu X, Faruqi AF, Bray-Ward P, et al. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(8):5261-6.
- 117 Su X, Ferdig MT, Huang Y, Huynh CQ, Liu A, You J, et al. A genetic map and recombination parameters of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*. 1999;286(5443):1351-3.
- 118 Toonen R, Hughes S. Increased throughput for fragment analysis on ABI Prism 377 automated sequencer using a membrane comb and STRand software. *Biotechniques*. 2001;31:1320-4.
- 119 Haubold B, Hudson RR. LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. *Linkage Analysis. Bioinformatics*. 2000;16(9):847-8.
- 120 Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol*. 2004;186(5):1518-30.
- 121 Mantel N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*. 1967;27:209-20.
- 122 Hood G. PopTools version 2.7.1. 2006. Available from: <http://www.cse.csiro.au/poptools> [2010 May 06].
- 123 Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987;4(4):406-25.
- 124 Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 2007;24(8):1596-9.
- 125 Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155(2):945-59.
- 126 Eisen D, Billman-Jacobe H, Marshall VF, Fryauff D, Coppel RL. Temporal variation of the merozoite surface protein-2 gene of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*. 1998;66(1):239-46.

- 127 Felger I, Irion A, Steiger S, Beck HP. Genotypes of merozoite surface protein 2 of *Plasmodium falciparum* in Tanzania. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1999;93 Suppl 1:3-9.
- 128 Imwong M, Pukrittayakamee S, Gruner AC, Renia L, Letourneur F, Looareesuwan S, et al. Practical PCR genotyping protocols for *Plasmodium vivax* using Pvcs and Pvmsp1. Malar J. 2005;4(1):20.
- 129 Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. Genome Res. 1998;8(3):186-94.
- 130 Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. Genome Res. 1998;8(3):175-85.
- 131 Green P. Phrap. 2004. Available from: <http://www.genome.washington.edu/UWGC/analysistools/phrap.htm> [2007 Jan 10].
- 132 Green P. Cross_match. 2003. Available from: <http://www.genome.washington.edu/UWGC/analysistools/phrap.htm> [2007 Jan 10].
- 133 Gordon D, Abajian C, Green P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. Genome Res. 1998;8(3):195-202.
- 134 Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 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(22):4673-80.
- 135 Hall TA. BioEdit: a userfriendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp Ser. 1999;41:95-8.
- 136 Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. J Mol Biol. 2001;305(3):567-80.
- 137 Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. Bioinformatics. 1998;14(4):378-9.
- 138 Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. Nucleic Acids Res. 1999;27(2):573-80.

- 139 Volkman SK, Barry AE, Lyons EJ, Nielsen KM, Thomas SM, Choi M, et al. Recent origin of *Plasmodium falciparum* from a single progenitor. *Science*. 2001;293(5529):482-4.
- 140 Fares MA. SWAPSC: sliding window analysis procedure to detect selective constraints. *Bioinformatics*. 2004;20(16):2867-8.
- 141 Fernandez-Becerra C, de Azevedo MF, Yamamoto MM, del Portillo HA. *Plasmodium falciparum*: new vector with bi-directional promoter activity to stably express transgenes. *Exp Parasitol*. 2003;103(1-2):88-91.
- 142 de Koning-Ward TF, Speranca MA, Waters AP, Janse CJ. Analysis of stage specificity of promoters in *Plasmodium berghei* using luciferase as a reporter. *Mol Biochem Parasitol*. 1999;100(1):141-6.
- 143 Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 1976;193(4254):673-5.
- 144 Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2002;419(6906):498-511.
- 145 Deitsch K, Driskill C, Wellems T. Transformation of malaria parasites by the spontaneous uptake and expression of DNA from human erythrocytes. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(3):850-3.
- 146 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- 147 Rosario V. Cloning of naturally occurring mixed infections of malaria parasites. *Science*. 1981;212(4498):1037-8.
- 148 Kyes S, Pinches R, Newbold C. A simple RNA analysis method shows *var* and *rif* multigene family expression patterns in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 2000;105(2):311-5.
- 149 Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*. 1979;65(3):418-20.

150 Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979;16(6):710-8.

151 Noedl H. Analysis of malaria *in vitro* drug sensitivity data - LN-NonLin V 1.1. 2001. Available from: <http://www.meduniwien.ac.at/user/harald.noedl/malaria/> [2010 May 08].

152 Brudno M, Chapman M, Gottgens B, Batzoglou S, Morgenstern B. Fast and sensitive multiple alignment of large genomic sequences. *BMC Bioinformatics.* 2003;4:66.

153 Rozas J, Rozas R. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics.* 1999;15(2):174-5.

154 Myakishev MV, Khripin Y, Hu S, Hamer DH. High-throughput SNP genotyping by allele-specific PCR with universal energy-transfer-labeled primers. *Genome Res.* 2001;11(1):163-9.

155 Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, et al. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques.* 2003;34(2):374-8.

156 Anderson TJ, Nair S, Sudimack D, Williams JT, Mayxay M, Newton PN, et al. Geographical distribution of selected and putatively neutral SNPs in Southeast Asian malaria parasites. *Mol Biol Evol.* 2005;22(12):2362-74.

157 Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973;70(12):3321-3.

158 Mapeamento por associação em plantas: conceitos básicos e perspectivas de uso no melhoramento de batata. 2008. Disponível em: http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/documentos/documento_248.pdf [2009 dez 02]

159 Ding K, Zhou K, He F, Shen Y. LDA-a java-based linkage disequilibrium analyzer. *Bioinformatics.* 2003;19(16):2147-8.

160 Hudson RR, Kaplan NL. Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DNA sequences. *Genetics.* 1985;111(1):147-64.

161 Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21(2):263-5.

162 Wang N, Akey JM, Zhang K, Chakraborty R, Jin L. Distribution of recombination crossovers and the origin of haplotype blocks: the interplay of population history, recombination, and mutation. *Am J Hum Genet*. 2002;71(5):1227-34.

163 Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*. 2002;296(5576):2225-9.

164 Hill WG, Babiker HA. Estimation of numbers of malaria clones in blood samples. *Proc Biol Sci*. 1995;262(1365):249-57.

165 Imwong M, Nair S, Pukrittayakamee S, Sudimack D, Williams JT, Mayxay M, et al. Contrasting genetic structure in *Plasmodium vivax* populations from Asia and South America. *Int J Parasitol*. 2007;37(8-9):1013-22.

166 Forsyth KP, Anders RF, Cattani JA, Alpers MP. Small area variation in prevalence of an S-antigen serotype of *Plasmodium falciparum* in villages of Madang, Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg*. 1989;40(4):344-50.

167 da Silva-Nunes M, Codeco CT, Malafronte RS, da Silva NS, Juncansen C, Muniz PT, et al. Malaria on the Amazonian frontier: transmission dynamics, risk factors, spatial distribution, and prospects for control. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79(4):624-35.

168 da Silva NS, da Silva-Nunes M, Malafronte RS, Menezes MJ, D'Arcadia RR, Komatsu NT, et al. Epidemiology and control of frontier malaria in Brazil: lessons from community-based studies in rural Amazonia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010;104(5):343-50.

169 Machado RL, Pova MM, Calvosa VS, Ferreira MU, Rossit AR, dos Santos EJ, et al. Genetic structure of *Plasmodium falciparum* populations in the Brazilian Amazon region. *J Infect Dis*. 2004;190(9):1547-55.

170 Orjuela-Sanchez P, Da Silva-Nunes M, Da Silva NS, Scopel KK, Goncalves RM, Malafronte RS, et al. Population dynamics of genetically diverse *Plasmodium falciparum* lineages: community-based prospective study in rural Amazonia. *Parasitology*. 2009;136(10):1097-105.

171 Boulos M, Amato Neto V, Dutra AP, di Santi SM, Shiroma M. Frequency of malaria relapse due to *Plasmodium vivax* in a non - endemic region (São Paulo, Brazil). Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1991;33:143-6.

172 Villalobos-Salcedo JM, Tada MS, Kimura E, Menezes MJ, Pereira da Silva LH. In-vivo sensitivity of *Plasmodium vivax* isolates from Rondonia (western Amazon region, Brazil) to regimens including chloroquine and primaquine. Ann Trop Med Parasitol. 2000;94(8):749-58.

173 Orjuela-Sanchez 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;81(6):961-8.

174 Rezende AM, Tarazona-Santos E, Fontes CJ, Souza JM, Couto AD, Carvalho LH, et al. Microsatellite loci: determining the genetic variability of *Plasmodium vivax*. Trop Med Int Health. 2010.

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

176 Kirchgatter K, del Portillo HA. Molecular analysis of *Plasmodium vivax* relapses using the MSP1 molecule as a genetic marker. J Infect Dis. 1998;177(2):511-5.

177 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;195(7):927-33.

178 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;195(7):934-41.

179 Foote SJ, Kyle DE, Martin RK, Oduola AM, Forsyth K, Kemp DJ, et al. Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. Nature. 1990;345(6272):255-8.

180 Adagu IS, Warhurst DC. *Plasmodium falciparum*: linkage disequilibrium between loci in chromosomes 7 and 5 and chloroquine selective pressure in Northern Nigeria. Parasitology. 2001;123(Pt 3):219-24.

- 181 Mu J, Ferdig MT, Feng X, Joy DA, Duan J, Furuya T, et al. Multiple transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine. *Mol Microbiol.* 2003;49(4):977-89.
- 182 Valderramos SG, Fidock DA. Transporters involved in resistance to antimalarial drugs. *Trends Pharmacol Sci.* 2006;27(11):594-601.
- 183 Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, Cowman AF. *Pgh1* modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2000;403(6772):906-9.
- 184 Sidhu AB, Valderramos SG, Fidock DA. *pfmdr1* mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol.* 2005;57(4):913-26.
- 185 Duraisingh MT, Cowman AF. Contribution of the *pfmdr1* gene to antimalarial drug-resistance. *Acta Trop.* 2005;94(3):181-90.
- 186 Orjuela-Sanchez P, de Santana Filho FS, Machado-Lima A, Chehuan YF, Costa MR, Alecrim MG, et al. Analysis of single-nucleotide polymorphisms in the *crt-o* and *mdr1* genes of *Plasmodium vivax* among chloroquine-resistant isolates from the Brazilian Amazon region. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(8):3561-4.
- 187 de Koning-Ward TF, Janse CJ, Waters AP. The development of genetic tools for dissecting the biology of malaria parasites. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:157-85.
- 188 Waterkeyn JG, Crabb BS, Cowman AF. Transfection of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol.* 1999;29(6):945-55.
- 189 Kocken CH, Zeeman AM, Voorberg-van der Wel A, Thomas AW. Transgenic *Plasmodium knowlesi*: relieving a bottleneck in malaria research? *Trends Parasitol.* 2009;25(8):370-4.
- 190 Wootton JC, Feng X, Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, Baruch DI, et al. Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2002;418(6895):320-3.
- 191 Vinayak S, Mittra P, Sharma YD. Wide variation in microsatellite sequences within each *Pfcr1* mutant haplotype. *Mol Biochem Parasitol.* 2006;147(1):101-8.

- 192 DaRe JT, Mehlotra RK, Michon P, Mueller I, Reeder J, Sharma YD, et al. Microsatellite polymorphism within *pfcr*t provides evidence of continuing evolution of chloroquine-resistant alleles in Papua New Guinea. *Malar J*. 2007;6:34.
- 193 Myrick A, Sarr O, Dieng T, Ndir O, Mboup S, Wirth DF. Analysis of the genetic diversity of the *Plasmodium falciparum* multidrug resistance gene 5' upstream region. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;72(2):182-8.
- 194 Ringwald P, Bickii J, Basco LK. In vitro activity of antimalarials against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in Yaounde, Cameroon. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;55(3):254-8.
- 195 Cerutti Junior C, Marques C, Alencar FE, Durlacher RR, Alween A, Segurado AA, et al. Antimalarial drug susceptibility testing of *Plasmodium falciparum* in Brazil using a radioisotope method. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(6):803-9.
- 196 Chaijaroenkul W, Wisedpanichkij R, Na-Bangchang K. Monitoring of in vitro susceptibilities and molecular markers of resistance of *Plasmodium falciparum* isolates from Thai-Myanmar border to chloroquine, quinine, mefloquine and artesunate. *Acta Trop*. 2010;113(2):190-4.
- 197 Pickard AL, Wongsrichanalai C, Purfield A, Kamwendo D, Emery K, Zalewski C, et al. Resistance to antimalarials in Southeast Asia and genetic polymorphisms in *pfmdr1*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(8):2418-23.
- 198 Weir BS, Hill WG. Nonuniform recombination within the human beta-globin gene cluster. *Am J Hum Genet*. 1986;38(5):776-81.
- 199 Conway DJ, Roper C, Oduola AM, Arnot DE, Kremsner PG, Grobusch MP, et al. High recombination rate in natural populations of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(8):4506-11.
- 200 Lewontin RC, Krakauer J. Distribution of gene frequency as a test of the theory of the selective neutrality of polymorphisms. *Genetics*. 1973;74(1):175-95.
- 201 Levinson G, Gutman GA. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol*. 1987;4(3):203-21.
- 202 Oron-Karni V, Filon D, Rund D, Oppenheim A. A novel mechanism generating short deletion/insertions following slippage is suggested by a mutation in the human alpha2-globin gene. *Hum Mol Genet*. 1997;6(6):881-5.

203 Schug MD, Hutter CM, Noor MA, Aquadro CF. Mutation and evolution of microsatellites in *Drosophila melanogaster*. *Genetica*. 1998;102-103(1-6):359-67.