Universidade de São Paulo

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Lilian de Oliveira Guimarães

Análise da diversidade genética de isolados brasileiros

de *Plasmodium malariae*

Dissertação apresentada ao Instituto de
Medicina Tropical de São Paulo,
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Doenças Tropicais
e Saúde Internacional

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karin Kirchgatter

**São Paulo
2012**

Ficha catalográfica
Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo
© Reprodução autorizada pelo autor

Guimarães, Lilian de Oliveira

Análise da diversidade genética de isolados brasileiros de
Plasmodium malariae / Lilian de Oliveira Guimarães. – São Paulo,
2012.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São
Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientadora: Karin Kirchgatter

Descritores: 1. MALÁRIA. 2. *PLASMODIUM*. 3. DIVERSIDADE
GENÉTICA.

USP/IMTSP/BIB-04/2012.

Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Candidato (a): Lilian de Oliveira Guimarães

Titulo da Dissertação: “Análise da diversidade genética de isolados brasileiros de *Plasmodium malariae*”

Orientador (a): Profa. Dra. Karin Kirchgatter

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada em/...../....., considerou

() APROVADO(A) () REPROVADO(A)

Examinador (a) Assinatura _____
Nome _____
Instituição _____

Examinador (a) Assinatura _____
Nome _____
Instituição _____

Presidente Assinatura _____
Nome _____
Instituição _____

**Aos meus pais, Laertes e Aparecida,
minha irmã Vivian e ao meu “namorado” Wellington.**

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra Karin Kirchgatter, pela orientação, pelos esforços para realização do trabalho, pela amizade, pelo incentivo, ensinamentos e pela confiança.

Ao Prof Dr Gerhard Wunderlich, por disponibilizar seu laboratório, pelos ensinamentos e auxílio em todo o projeto.

Ao Prof Dr Marcelo Urbano Ferreira por disponibilizar seu laboratório, pelo auxílio durante o projeto.

À Dra Silvia Maria Fátima Di Santi, por disponibilizar as amostras pertencentes ao banco de amostras do Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN e por disponibilizar este laboratório para a realização do projeto.

À Dra Marina Galvão Bueno, ao Dr Fabio Röhle e ao Prof Dr José Luiz Catão-Dias, por disponibilizar as amostras de primatas.

Ao Prof Luis Fabio Silveira (Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo), por disponibilizar a amostra P169.

À Profa Dra Luzia Helena Carvalho, por fornecer a amostra de *P. brasilianum*, cepa Perulll.

Ao Prof Dr Ricardo Luis Dantas Machado por disponibilizar a amostra humana do Acre.

À Dra Rosely dos Santos Malafronte e sua aluna Amanda Neves, por disponibilizar a amostra proveniente do mosquito.

À Dra Izilda Curado, por disponibilizar a amostra de paciente do município de Iporanga – SP.

Às Profas Dra Sandra do Lago Moraes e Dra Sabrina Ephifanio, pela atenção e discussão detalhada durante o exame de qualificação.

À Carmen Silva de Almeida Takata, Marcio Massao Yamamoto e Wolfgang Fischer pela ajuda com a eletroforese capilar e sequenciamento.

À Pamela Orjuela Sánchez, Michelle Brandi e Melissa Bastos, pelos ensinamentos, incentivo e auxílio na utilização do software Strand.

Aos alunos do Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN, Eliana, Giselle, Angélica, Juliana e Giovanni, pelos favores, convívio, incentivo e amizade.

À equipe do Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN, Dida, Morgana, Christina, Lia e Maria Silvia, pelo apoio diário e incentivo.

As secretárias Eliane Araújo e Solange Fernandes Ferreira, pela atenção e esclarecimentos de dúvidas ao longo de todo o projeto.

À CAPES por prover a bolsa de mestrado.

Aos meus amores, meu pai Laertes, minha mãe Aparecida e minha irmã Vivian, pelo carinho, apoio e por confiarem em minhas escolhas.

Ao meu “namorado” Wellington, pelo auxílio com parte dos softwares utilizados neste trabalho, pela compreensão, pelo estímulo e por me ajudar a atravessar todas as dificuldades encontradas durante este período.

***“O que não dá prazer não dá proveito.
Em resumo, senhor, estude apenas o que lhe agradar.”***

William Shakespeare

RESUMO

Guimaraes LO. Análise da diversidade genética de isolados brasileiros de *Plasmodium malariae* (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2012.

Plasmodium malariae é um parasita protozoário que causa malária em humanos e é geneticamente indistinguível de *P. brasilianum*, um parasita que infecta macacos do Novo Mundo nas Américas do Sul e Central. *P. malariae* possui uma ampla distribuição mundial em regiões tropicais e subtropicais, porém de forma pontual, sendo encontrado na América do Sul, Ásia e África. Entretanto, pouco se sabe sobre a genética destes parasitas e a similaridade entre eles pode ser devido ao pequeno número de sequências genômicas disponíveis para essas espécies de *Plasmodium*. Recentemente, seis marcadores microssatélites e a sequência completa do gene que codifica a proteína de superfície do merozoíta 1 (MSP1) foram descritos para estes parasitas. Neste estudo, o polimorfismo genético de 24 isolados brasileiros de *P. malariae* e *P. brasilianum* obtidos de diferentes hospedeiros foi analisado através da utilização desses marcadores microssatélites e da região correspondente ao oitavo bloco da MSP1. Os dados epidemiológicos moleculares foram explorados em relação à origem geográfica e hospedeiros. Para todos os marcadores estudados, as amostras de símios apresentaram um polimorfismo mais elevado que as amostras humanas. Na análise de microssatélites, as amostras humanas foram polimórficas em apenas dois alelos, enquanto as amostras de símios foram polimórficas em cinco alelos. O alelo Pm42-331 foi monomórfico em todas as amostras analisadas. Na análise do bloco 8 da MSP1, as amostras símias foram altamente polimórficas e as amostras humanas apresentaram quatro tipos alélicos, sendo que dois tipos alélicos (A5 e A7) foram encontrados em alta frequência (90%). Em ambas as análises, a amostra de mosquito foi mais similar a amostras simianas. Nossos dados também mostram que há uma possível ausência de dimorfismo alélico na MSP1 de *P. malariae* e *P. brasilianum*, ao contrário de outras espécies de *Plasmodium*. Pela primeira vez, amostras de humanos, símios e mosquito foram analisadas em conjunto e utilizadas para o primeiro estudo de polimorfismos genéticos de isolados de *P. malariae* e *P. brasilianum* do Brasil.

Descritores: Malária. *Plasmodium*. Diversidade genética.

ABSTRACT

Guimaraes LO. Analysis of the genetic diversity of Brazilian isolates of *Plasmodium malariae* (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2012.

Plasmodium malariae is a protozoan parasite that causes malaria in humans and is genetically indistinguishable from *P. brasilianum*, a parasite infecting New World monkeys in Central and South America. *P. malariae* has a wide and patchy global distribution in tropical and subtropical regions, being found in South America, Asia, and Africa. However, little is known regarding the genetics of these parasites and the similarity between them could be because until now there are only a very few genomic sequences available from these *Plasmodium* species. Recently, six microsatellite markers and the complete sequence of the merozoite surface protein 1 (MSP1) gene have been described for these parasites. In this study, the genetic polymorphism of 24 *P. malariae* and *P. brasilianum* isolates obtained from different hosts was analyzed using these microsatellite markers and the corresponding region on the block 8 of MSP1. The molecular epidemiological data were explored in relation to geographical origin and hosts. For all markers studied, the simian samples showed a higher polymorphism than human samples. In microsatellite analysis, the human samples were polymorphic only in two alleles, while simian samples were polymorphic in five alleles. The allele Pm42-331 was monomorphic in all samples analyzed. In the analysis of Block 8 of MSP1, the simian samples were highly polymorphic and human samples showed four allele types with two allelic types (A5 and A7) frequently found (90%). In both analyzes, the mosquito sample was more similar to simian samples. Our data also show that there is a likely absence of allelic dimorphism of MSP1 from *P. malariae* and *P. brasilianum*, as opposed to other *Plasmodium* species. For the first time, samples of humans, monkeys and mosquito were analyzed together and used for the first study of genetic polymorphisms in *P. malariae* and *P. brasilianum* isolates from Brazil.

Descriptors: Malaria. *Plasmodium malariae*. Genetic diversity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Países ou áreas de risco de transmissão da malária em 2010..	15
Figura 2 -	Número de óbitos por malária.....	16
Figura 3 -	Ciclo de vida do <i>Plasmodium sp.</i>	19
Figura 4 -	Formas sanguíneas de <i>P. malariae</i>	19
Figura 5 -	Número de casos de malária autóctone observados na região Extra-Amazônica.....	21
Figura 6 -	Número de casos de malária registrados anualmente de 1960 a 2009 na Região Amazônica Brasileira.....	21
Figura 7 -	Áreas de risco para malária no Brasil em 2006.....	22
Figura 8 -	Dados sobre sequências nucleotídicas para <i>P. malariae</i> e <i>brasilianum</i> (2007).....	29
Figura 9 -	Alinhamento entre sequências de MSP1.....	34
Figura 10 -	Origem das amostras brasileiras de <i>P. malariae/P. brasilianum</i>	40
Figura 11 -	Amostras humanas (2-11) coletadas no município de Juquitiba – SP, de acordo com o Sistema de Posicionamento Global (GPS).....	41
Figura 12 -	Alinhamento dos oligonucleotídeos no programa Primer-BLAST.....	47
Figura 13 -	Posição dos oligonucleotídeos na sequência da PmMSP1, usando como referência a sequência MM1.....	49
Figura 14 -	Genotipagem dos loci de microssatélites da amostra 1 (após WGA).....	55
Figura 15 -	Eletroferograma dos seis microssatélites tipados na amostra 1 após PCR.....	56
Figura 16 -	Sequência da Pm09-265 descrita neste estudo.....	61
Figura 17 -	Alinhamento entre Pm09-299 e Pm09-265.....	62
Figura 18 -	Eletroforese em Gel de Agarose do oitavo bloco da MSP1.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características clínicas das 5 malárias que podem acometer o homem.....	15
Tabela 2 -	Estudos que comparam diagnóstico de <i>Plasmodium malariae</i> por gota espessa (GE) e PCR	24
Tabela 3 -	Características alélicas dos loci polimórficos de microssatélites	32
Tabela 4 -	Amostras de <i>P. malariae</i> e <i>P. brasilianum</i> usadas neste estudo	41
Tabela 5 -	Oligonucleotídeos usados no PCR “semi-nested” para amplificação de locus de microssatélites de <i>P. malariae/P.brasilianum</i>	45
Tabela 6 -	Oligonucleotídeos usados para amplificar o Bloco 8 da MSP1 .	48
Tabela 7 -	Resultados dos 6 microssatélites obtidos nas amostras	54
Tabela 8 -	Tipos alélicos da região de repetições imperfeitas (Bloco 8) da proteína de superfície do merozoíta 1 (MSP1) e prevalência geográfica	66
Tabela 9 -	Variações nas sequências de aminoácidos no Bloco 8 dos alelos de MSP1 de <i>P. malariae</i> e <i>P. brasilianum</i>	68
Tabela 10 -	Porcentagem de similaridade entre as sequências de aminoácidos dos tipos alélicos da região de repetições imperfeitas (Bloco 8) da proteína de superfície do merozoíta 1 (MSP1) de isolados de <i>P. malariae/P. brasilianum</i>	69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	O Ciclo de Vida dos Plasmódios	17
1.2	A Malária no Brasil	20
1.3	<i>Plasmodium malariae</i> e <i>P. brasilianum</i>	22
1.4	Genética do <i>P. malariae</i> / <i>P. brasilianum</i>	27
1.5	Microssatélites	30
1.6	Proteína de Superfície do Merozoíta 1	32
2	OBJETIVOS	36
2.1	Objetivo Geral	36
2.2	Objetivos Específicos	36
2.2.1	Análise dos Microssatélites.....	36
2.2.2	Análise da Proteína de Superfície do Merozoíta 1.....	37
2.2.3	Marcadores Moleculares e Relacionamento Genético entre <i>P. malariae</i> / <i>P. brasilianum</i>	38
3	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1	Amostras	39
3.2	Obtenção dos Parasitas e Extração do gDNA	42
3.3	Identificação dos Parasitas	42
3.4	Amplificação do Genoma Inteiro	43
3.5	Análise dos Microssatélites.....	44
3.5.1	PCR Microssatélites.....	44
3.5.2	Eletroforese Capilar	45
3.5.3	Análise dos Dados de Microssatélites.....	46
3.6	Análise da Proteína de Superfície do Merozoíta 1	47
3.6.1	PCR da Proteína de Superfície do Merozoíta 1.....	48
3.6.2	Eletroforese em Gel de Agarose e Purificação dos Fragmentos	49
3.6.3	Clonagem	50
3.6.4	Sequenciamento dos Fragmentos de DNA	51
3.6.5	Alinhamento e Análise das Sequências	51
3.6	Aspectos Éticos	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1	Microssatélites.....	53
4.1.1	Avaliação da utilidade dos seis microssatélites para amostras brasileiras.....	53
4.1.2	Avaliação do polimorfismo dos seis microssatélites em amostras brasileiras.....	57
4.1.3	Comparação do polimorfismo presente em amostras de Região Amazônica com amostras de Mata Atlântica.....	58
4.1.4	Comparação dos haplótipos presentes em diferentes hospedeiros....	58
4.1.5	Comparação dos haplótipos obtidos de isolados envolvidos em transmissão transfusional.....	59
4.1.6	Comparação dos haplótipos presentes em duas infecções consecutivas de dois pacientes.....	59
4.1.7	Avaliação longitudinal da dinâmica de haplótipos em foco de malária residual.....	59
4.1.8	Avaliação da utilização do alelo Pm09-299 como marcador de amostras da América do Sul.....	60
4.1.9	Comparação das frequências alélicas e heterozigosidade obtidas nas amostras brasileiras com aquelas de outras regiões	63

geográficas.....	65
4.2 Proteína de Superfície do Merozoíta 1	65
4.2.1 Estabelecimento e validação de uma ferramenta molecular de análise de um marcador polimórfico baseada na Proteína de Superfície do Merozoíta 1, para utilização em amostras brasileiras...	65
4.2.2 Avaliação do polimorfismo do bloco 8 em isolados brasileiros.....	65
4.2.3 Verificação da presença de dimorfismo alélico no bloco 8 da MSP1 em amostras brasileiras.....	66
4.2.4 Comparação do polimorfismo presente em amostras de Região Amazônica com amostras de Mata Atlântica.....	70
4.2.5 Comparação dos alelos presentes em diferentes hospedeiros.....	70
4.2.6 Comparação dos alelos obtidos de isolados envolvidos em duas transmissões transfusionais.....	71
4.2.7 Comparação dos alelos presentes em duas infecções consecutivas de três pacientes.....	71
4.2.8 Avaliação longitudinal da dinâmica de alelos em foco de malária residual.....	72
4.2.9 Avaliação da presença de algum possível marcador para amostras da América do Sul.....	73
4.3 Marcadores moleculares e relacionamento genético entre <i>P. malariae</i> / <i>P. brasilianum</i>	73
5 CONCLUSÕES	76
5.1 Microssatélites	76
5.2 Proteína de Superfície do Merozoíta 1	77
5.3 Marcadores Moleculares e Relacionamento Genético entre <i>P. malariae</i> / <i>P. brasilianum</i>	78
REFERÊNCIAS	79
APÊNDICES	92
Apêndice A – Manuscrito: “A diversidade genética de <i>Plasmodium malariae</i> e <i>Plasmodium brasilianum</i> de hospedeiros humanos, símios e mosquito no Brasil”	92
Apêndice B – Manuscrito: “Diversidade genética no Bloco 8 da Proteína de Superfície do Merozoíta 1 de <i>Plasmodium malariae</i> e <i>Plasmodium brasilianum</i> ”	118
ANEXOS	143
Anexo A – Parecer 749 emitido pela Comissão de Ética	143
Anexo B – Declaração 065/2008 emitida pela Comissão de Ética	144

1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença causada por um protozoário parasita do gênero *Plasmodium* e é transmitida através da picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*. No entanto, existem outras formas de transmissão, que embora raras, devem ser consideradas, tais como: transfusão sanguínea de sangue infectado, transplantes de órgãos infectados e transmissão transplacentária. A doença em seres humanos pode apresentar diferentes formas, dependendo da espécie do parasita, seus aspectos genéticos e fatores individuais do hospedeiro, como idade e situação imunológica. Estas variáveis têm grande influência sobre todos os aspectos da doença, tais como: epidemiologia, patogênese, manifestações clínicas (Tabela 1) e de gestão. A malária é a doença parasitária mais importante para o homem, com distribuição em mais de 100 países (Figura 1). Mais de um bilhão de pessoas são afetadas por esta endemia que causa cerca de 1-3 milhões de mortes a cada ano (Scotto, 2010; WHO, 2010).

De acordo com o CDC (2012), 3,3 milhões de pessoas vivem em áreas de risco para transmissão de malária (109 países). Ainda, 35 países (30 na África Sub-Saariana e 5 na Ásia) são responsáveis por 98% das mortes globais pela doença, sendo a quinta causa de morte por doença infecciosa no mundo e a segunda na África. Em sua revisão, Murray et al. (2012) estimaram que 1.238.000 pessoas morreram de malária no mundo em 2010 (Figura 2).

Figura 1 - Países ou áreas de risco de transmissão da malária, 2010. Em azul escuro estão áreas ou países onde ocorre a transmissão e em azul claro onde há um risco limitado de transmissão da malária. Fonte: World Health Organization, 2010.

Tabela 1 - Características clínicas das 5 malárias que podem acometer o homem.

Infecção	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. knowlesi</i>
Período de incubação	8-17 d	10-17 d	18-40 d	8-11 d	9-12 d
Sinais e Sintomas					
Padrão inicial de febre	Irregular (48h)	Irregular (48h)	Regular (72h)	Continuamente remitente	Regular (24h)
Periodicidade dos sintomas	48 h	48 h	72 h	36-48 h	24-27 h
Paroxismo inicial					
Severidade	Moderado a severo	Leve	Moderado a severo	Severo	Moderado a severo
Duração média	10 h	10 h	11 h	16-36 h	Não disponível
Limitações na parasitemia	He jovens	He jovens	He maduros	Todos os He	Todos os He
Anemia	Leve a moderada	Leve	Leve a moderada	Severa	Moderada a Severa
Síndrome nefrótica	Possível	Rara	Muito comum	Rara	Comum

He= eritrócitos.

Fonte: Garcia, 2010.

Figura 2 - Número de óbitos por malária, por região, de 1980 a 2010. A. Em indivíduos menores de cinco anos. B. em indivíduos maiores de cinco anos. Fonte: Murray et al. (2012).

Existem mais de 100 espécies de plasmódios que podem infectar numerosas espécies de animais. Destas, apenas cinco podem causar infecções em humanos sob condições naturais: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi* (Bray et al., 1982; Schawartz 2009; Vythilingam et al., 2008). Estas espécies diferem morfológicamente, imunologicamente, em suas distribuições geográficas, em seus padrões de recaídas e em suas respostas a drogas. O *P. falciparum* é o agente da malária severa, potencialmente fatal e o principal causador de mortes em crianças jovens na África (Snow et al., 2004). O *P. vivax* é a espécie mais comum e as infecções por esta espécie raramente são fatais. O parasita menos comum é o *P. ovale* que é restrito ao Oeste Africano e o *P. malariae* é encontrado por todo mundo, mas também em baixa frequência. O *P. knowlesi* foi recentemente descrito como a quinta espécie de *Plasmodium* causadora de malária em humanos, e sua distribuição está limitada a áreas do sudeste Asiático. Apesar de *P. falciparum* e *P. vivax* poderem causar anemia severa, anemia leve é mais comum em infecções por *P. vivax*, enquanto anemia severa por *P. falciparum* é a maior causa de mortes na África. Adicionalmente, no caso de *P. falciparum*, os eritrócitos infectados podem

obstruir pequenos vasos sanguíneos e, se isso ocorrer no cérebro, resulta em malária cerebral, uma complicação que é muitas vezes fatal. *P. ovale* e *P. vivax* possuem estágios dormentes no fígado denominados hipnozoítas que podem permanecer neste órgão durante semanas até muitos anos, antes de iniciarem uma nova rodada de esquizônia pré-eritrocítica, resultando em recaídas da doença. Em alguns casos o *P. malariae* pode produzir uma infecção de longa duração em estágios sanguíneos que, se não tratada, pode persistir assintomaticamente no hospedeiro humano por longos períodos que se estendem a várias décadas (rev. por Tuteja et al., 2007). A contagem parasitária de *P. malariae* é comumente baixa, em comparação com *P. falciparum* e *P. vivax*. Esta parasitemia é devida a alguns fatores como: pequeno número de merozoítas produzidos pelo ciclo eritrocítico, um ciclo eritrocítico longo (72 h), preferência do parasita por eritrócitos velhos e a combinação de fatores que propiciam o desenvolvimento de imunidade precoce no hospedeiro, mantendo esta baixa parasitemia (Collins e Jeffery, 2007).

1.1 O Ciclo de Vida dos Plasmódios

O ciclo de vida dos parasitas é extremamente complexo e necessita de expressão de proteínas especializadas para sua sobrevivência em seus hospedeiros invertebrados e vertebrados. Estas proteínas são necessárias para sobrevivência intracelular e extracelular, para invasão de uma variedade de tipos celulares e para seu escape da resposta imune do hospedeiro. O seu ciclo de vida está esquematizado na figura 3. Para todas as espécies de *Plasmodium* que infectam humanos, o ciclo é basicamente o mesmo, havendo uma fase sexuada seguida por esporogonia em um mosquito do gênero *Anopheles* e uma fase

assexuada no hospedeiro humano com esquizogonia eritrocítica e pré-eritrocítica (Cogswell, 1992; SUCEN, 2012). Os gametócitos são ingeridos durante a alimentação do mosquito e ocorre um processo chamado de exflagelação no microgametócito, resultando na formação de oito microgametas móveis que fertilizarão o macrogameta, formando o oocineto móvel. Este oocineto penetrará na parede do intestino do *Anopheles*. Sobre a membrana basal, o oocineto se desenvolve. Após um período de duas a três semanas, dependendo da temperatura, centenas a milhares de esporozoítas são originados de cada oocisto. O oocisto se rompe, os esporozoítas são liberados na hemolinfa do mosquito e, pela circulação, são levados até as glândulas salivares, onde eles se concentram nas células acinares. Durante a alimentação da fêmea do *Anopheles*, um pequeno número de esporozoítas (>100) é injetado nas vênulas do hospedeiro vertebrado. No homem, dentro de uma hora após a inoculação de esporozoítas na corrente sanguínea, estes irão invadir os hepatócitos, onde o parasita matura em aproximadamente 15 dias. Centenas de merozoítas são produzidos em cada esquizonte. Após liberação, estes merozoítas invadem os eritrócitos e iniciam o ciclo eritrocítico, formando trofozoítas (Figura 4). Em *P. malariae*, não há evidência de forma quiescentes no fígado (hipnozoítas) como ocorre nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale* em humanos. No entanto, nem todas as formas do fígado irão maturar no mesmo dia. Estudos indicam que estas formas podem liberar esporozoítas durante alguns dias. Seguindo o desenvolvimento do ciclo eritrocítico, que dura 72 h, uma média de 6 a 14 merozoítas são liberados de cada esquizonte e invadem outros eritrócitos. Alguns merozoítas se desenvolvem em microgametócitos ou macrogametócitos. Quando estas formas são pegas durante a alimentação do mosquito, o ciclo se repete (Coatney, 1972; Collins e Jeffery, 2007; Scotto, 2010; Tuteja, 2007).

1.2 A Malária no Brasil

No Brasil, a malária ainda é o maior problema de saúde pública nacional, com aproximadamente 306 mil casos registrados em 2009 (Oliveira-Ferreira et al, 2010). Cerca de 2/3 dos casos de infecção por malária nas Américas ocorrem na Bacia Amazônica Brasileira (Garcia, 2010). Nacionalmente a doença é causada por três espécies de plasmódios: *P. vivax* (83,7%), *P. falciparum* (16,3%) e *P. malariae*, em uma pequena proporção dos casos. Não há transmissão autóctone de *P. ovale* e *P. knowlesi* (Oliveira-Ferreira et al., 2010). Atualmente, a região Amazônica concentra 99.8% dos casos de malária descritos no Brasil. Na região Extra Amazônica, a transmissão de malária é situada principalmente em regiões de Mata Atlântica, onde é hipoendêmica e controlada (Figuras 5, 6 e 7) (Deane, 1992; Oliveira-Ferreira et al., 2010). Os Estados do Paraná, Espírito Santo e São Paulo são responsáveis por 88% da malária Extra Amazônica (Brasil, 2008). O Estado de São Paulo é o estado que detém uma das maiores áreas de Mata Atlântica remanescentes (<http://mapas.sosma.org.br/dados/>). Esta floresta tropical tem muitas bromélias que são um ambiente ideal para mosquitos do gênero *Anopheles* do subgênero *Kerteszia*, principalmente *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, que usa o áxil destas plantas como habitat para as suas formas larvárias (Forattini et al., 1996). No Estado de São Paulo, um dos municípios com alto índice de casos relatados de malária humana é Juquitiba, que anualmente apresenta casos esporádicos de malária autóctone (CVE, 2008). Apesar do pequeno número de casos clínicos de malária, grande parte da população mostra evidência sorológica de uma exposição recente a diferentes variantes de *P. vivax* ou *P. malariae* (Curado et al., 1997), sugerindo uma alta prevalência de infecção assintomática, que muitas vezes é

subestimada, visto que os programas de controle são baseados na pesquisa passiva e ativa de casos sintomáticos (Brasil. Ministério da Saúde, 2009).

Figura 5 - Número de casos de malária autóctone observados na região Extra-amazônica, de 1999 a 2007. Fonte: Oliveira-Ferreira et al., 2010.

Figura 6 - Número de casos de malária registrados anualmente, de 1960 a 2009, na Região Amazônica Brasileira. Fonte: Oliveira-Ferreira et al., 2010.

Figura 7 - Áreas de risco para malária no Brasil em 2006.
Fonte: Sivep-Malária, Sinan/SVS/MS, Brasil, 2007.

1.3 *Plasmodium malariae* e *P. brasilianum*

Não existem dados precisos sobre a prevalência de *P. malariae*, mas uma estimativa mínima de 67 milhões de infecções mundiais ao ano pode ser calculada por comparação com a prevalência de *P. falciparum* (Bremar et al., 2001; Greenwood et al., 1991). Mesmo que a distribuição da infecção por *P. malariae* seja descrita como pontual este parasita é observado em todas as regiões endêmicas para malária no mundo (Haworth, 1988).

O *P. malariae* tem sido considerado de menor importância por causar moderada patogenia e ser de baixa prevalência. Em regiões endêmicas, a prevalência de *P. malariae*, baseada no exame microscópico padrão, a gota espessa, pode variar entre 4 e 20% (Fandeur et al., 2000; Greenwood et al., 1987;

Molineaux e Grammiccia, 1980; Smith et al., 1993, 2001; Trape et al., 1994). Estudos baseados em diagnóstico pelo método de PCR (reação em cadeia da polimerase) mostram que esta prevalência baseada na microscopia é grosseiramente subestimada, devido sua incapacidade de detectar baixos níveis de parasitemia, particularmente quando esta espécie está em co-infecção com outras espécies de plasmódios (Kawamoto et al., 1999; Singh et al., 1999). Quando o diagnóstico de *P. malariae* é realizado comparando-se gota espessa e PCR, a prevalência deste parasita é 8 a 30 vezes maior pelo PCR, que é capaz de detectar baixíssimas parasitemias e diferenciar *P. malariae* de *P. vivax*, o que é uma grande dificuldade na gota espessa (Mehlotra et al., 2000; Scopel et al., 2004; Voorham et al., 1993; Zhou et al., 1998).

Estudos sorológicos (Arruda et al., 1996; Curado et al., 1997) e moleculares (Cavasini et al., 2000; Di Santi et al., 2004; Scopel et al., 2004), realizados em humanos no Brasil, também demonstraram que *P. malariae* é bem mais prevalente do que o mostrado pela gota espessa. Como em outros estudos, os trabalhos realizados em diferentes regiões endêmicas brasileiras indicam que por PCR, *P. malariae* é detectado em aproximadamente 10% dos casos de malária (Tabela 2).

Epidemias causadas por *P. malariae* são muito raras. Elas podem ocorrer em comunidades isoladas, mas são leves e se desenvolvem vagarosamente, como ocorreu em uma ilha de Granada em 1978 (Tikasingh et al., 1980). Interessantemente, essa epidemia aconteceu 16 anos após o final da campanha de erradicação da malária, provavelmente devido à renovação da transmissão a partir de casos recrudescentes.

Tabela 2 - Estudos que comparam diagnóstico de *Plasmodium malariae* por gota espessa (GE) e PCR.

Região e País	GE (%)	PCR (%)	Mistas ^a (%)	Referências
Pacífico				
PNG (Drikikir)	14,4	37,0	91,8	Mehlotra et al. (2000)
PNG (Liksul)	1,1	10,0	75,8	Mehlotra et al. (2000)
PNG (Wosera)	2,0	21,8	72,9	Mehlotra et al. (2000)
PNG (Wosera)	4,0	12,4	69,3	Kasehagen et al. (2006)
África				
Camarões	1,1	7,6	100,0	Walker-Abbey et al. (2005)
Guiné Equatorial	18,7	39,2	92,9	Rubio et al. (1999)
Guiné Bissau	0,0	23,3	97,7	Snounou et al. (1993)
Américas				
Brasil	1,2	11,9	69,5	Scopel et al. (2004)
Brasil	3,1	13,8	88,9	Di Santi et al., (2004)
Brasil	0,0	9,4	88,9	Cavasini et al. (2000)
Ásia				
Fronteira Tailândia-Mianmar	2,2	24,3	99,2	Zhou et al. (1998)

^a Proporção de infecções por *P. malariae* diagnosticadas por PCR que são co-infecções com *P. falciparum* e/ou *P. vivax*. Fonte: Mueller et al., 2007.

Apesar do *P. malariae* ser classicamente descrito como um parasita responsável por casos oligossintomáticos ou mesmo assintomáticos, com evolução benigna do quadro clínico e parasitológico, altas parasitemias e malária cerebral já foram descritas em paciente esplenectomizado (Tapper e Armstrong, 1976). Há ainda uma complicação imunológica conhecida como “Síndrome nefrótica”, resultante de uma infecção crônica, que leva à deposição de complexos antígeno-anticorpo dentro dos glomérulos, e pode causar mortalidade infantil, mesmo após o tratamento da malária (Abdurrahman et al., 1990; van Velthuisen et al., 2000).

O *P. malariae* não recai a partir de formas persistentes no fígado. No entanto, os parasitas do estágio sanguíneo persistem por períodos extremamente longos, sem sintomas no homem. Existem relatos de indivíduos que após deixarem áreas endêmicas, transmitiram a doença através de transfusão sanguínea e seus receptores adoeceram. Há também relatos de indivíduos assintomáticos nos quais,

após estresse, a infecção recrudesceu após muitos anos de dormência (Mueller et al., 2007).

Para malária transfusional, o *P. malariae* tem notável importância, sendo o principal plasmódio detectado (Nahlen et al., 1991). Collins et al. (1994) descrevem um caso de malária transfusional em que o doador provavelmente adquiriu a infecção por *P. malariae* na China 50 anos antes. Vinetz et al. (1998) relataram um caso de infecção adquirida 40 anos antes de uma esplenectomia quando, então, o indivíduo adoeceu.

No Brasil, há três relatos recentes de malária transfusional devido *P. malariae* que envolveram doadores assintomáticos com deslocamento exclusivamente para áreas de Mata Atlântica (Di Santi et al., 2005; Kirchgatter et al., 2005; Scuracchio et al., 2011). Em um desses casos, o paciente era esplenectomizado, desenvolveu uma alta parasitemia e foi a óbito (Kirchgatter et al., 2005).

Dos 45 casos de malária transfusional notificados nos Estados Unidos da América, de 1972 a 1988, 38% foram causados por *P. malariae* (Nahlen et al., 1991). Na Nigéria, nos anos 80, 1,2% do total de doadores apresentava *P. malariae* (Emeribe e Ejezie, 1989). Essa prevalência em malária transfusional deve-se ao fato de *P. malariae* ser o único agente etiológico da malária humana capaz de causar infecções assintomáticas por décadas (Vinetz et al., 1998), associadas a baixas parasitemias e exame físico normal (Guerrero et al., 1983; Bruce-Chwatt, 1972). Entretanto, após imunossupressão, os sintomas clássicos de malária quartã podem aparecer (Vinetz et al., 1998).

Na América do Sul, *P. malariae* é considerado um agente de infecção zoonótica, porque este parasita é idêntico ao *P. brasilianum*, um parasita que infecta macacos do novo mundo e ambos, homens e primatas não humanos em áreas endêmicas mostram soropositividade a antígenos de *P. malariae* e *P.*

brasilianum (Mueller et al., 2007). De fato, *P. malariae* e *P. brasilianum* não podem ser distinguidos nem morfológicamente (Coatney et al., 1972; Taliaferro, 1934), nem molecularmente (Cochrane et al., 1985; Lal et al., 1988) e não há diferenças em seus ciclos esporogônicos (Collins et al., 1969) e exoeritrocíticos (Garnham et al., 1963). Estudos realizados por Deane (1964; 1976; 1992) demonstram uma ampla distribuição geográfica para *P. brasilianum*, do Panamá à Bacia Amazônica Brasileira. *P. brasilianum* foi a única espécie detectada em macacos na Bacia Amazônica e estudos sorológicos têm demonstrado alta prevalência de anticorpos contra *P. malariae* / *P. brasilianum* em macacos e em tribos indígenas locais, sugerindo que esta forma de malária é uma zoonose autêntica nesta região (De Arruda et al., 1989).

Deane (1992) sugeriu que espécies de malária simiana poderiam ser responsáveis por estes casos de “malária-bromeliana” em áreas de floresta, onde macacos do gênero *Allouata* e *Cebus* e o *An. (K.) cruzii* e *An. (K.) bellator*, que se reproduzem no interior das coleções de água formadas dentro das bromélias, estão presentes.

O primeiro relato de malária simiana no continente americano foi em 1908, quando Gonder & von Berenberg-Gossler encontraram o parasita em um macaco (*Cacajao cabus* – macaco inglês) oriundo do estado brasileiro do Amazonas. Neste estudo o parasita foi nomeado de *P. brasilianum* e após um estudo detalhado de sua morfologia já foi verificada sua similaridade com *P. malariae*. Este parasita, após alguns anos, foi observado novamente em algumas espécies de símios em diversos países americanos. Em 1951, o *P. simium* foi descrito em primatas de região de Mata Atlântica (revisado por Deane, 1992) e, até o momento, estas são as duas únicas espécies de *Plasmodium* encontradas em símios no Brasil (Deane, 1992; Duarte et al., 2008; Yamasaki et al., 2011).

1.4 Genética do *P. malariae* / *P. brasilianum*

Devido à dificuldade de se desenvolver estudos com *P. malariae*, poucos projetos têm esse parasita como alvo, apesar de sua importância, como descrito anteriormente. O cultivo contínuo *in vitro* deste parasita ainda não foi estabelecido e maiores quantidades de parasitas precisam ser obtidas de infecções em primatas não humanos, o que é muito difícil e tem um alto custo (Deane, 1964; Nacional Research Council, 1996). Portanto, a disponibilidade limitada de DNA de *P. malariae* tem resultado em uma escassez de informação sobre a genética ou o genoma deste parasita. Em outubro de 1998, uma busca no banco de dados GenBank mostrou que menos de 15 genes haviam sido identificados para *P. ovale* e *P. malariae* (Carlton et al., 1999). Em 2008, a situação havia mudado muito pouco: das sequências nucleotídicas no GenBank para *P. malariae*, a maioria eram de genes que codificavam a proteína circumsporozoíta (CSP) ou regiões de genes ribossomais (nucleares ou do apicoplasto). Existiam ainda duas sequências de genes mitocondriais (cytb e COX1), uma de gene de apicoplasto, uma de pseudogene e seis eram de outros genes [dihidrofolato redutase timidato sintase, lactato desidrogenase, superóxido dismutase, plasmepsina, *msh1*-like (apenas uma pequena região) e cisteína protease] (Figura 8). Atualmente, este cenário apresenta pouca diferença, pois embora o número de sequências depositadas tenha aumentado, a maioria foram sequências repetidas dos genes citados anteriormente. As novas sequências adicionadas foram quatro sequências de microssatélites e duas de minissatélites (Bruce et al., 2007) e a sequência completa do gene que codifica a Proteína de Superfície do Merozoíta (MSP1) (Birkenmeyer et al., 2010).

Até pouco tempo atrás, apenas três genes eram estudados quanto a polimorfismos genéticos entre cepas de *P. malariae*: *ssrRNA* (Liu et al., 1998;

Kawamoto et al., 2002), *msp1* (Fandeur et al., 2000) e *csp* (Ayala et al., 1999; Escalante et al., 1995; Tahar et al., 1998). Entretanto, a utilidade destes genes como marcadores genéticos no estudo de populações é limitada, visto que *ssrRNA* é sujeito a conversão gênica e os produtos de *msp1* e *csp* são os principais alvos do sistema imune do hospedeiro e estão, portanto, sob pressão seletiva.

Por esta escassez de dados pouco se sabe sobre a genética ou estrutura de população deste parasita. Como a sequência completa da PmMSP1 foi descrita recentemente, não há estudos utilizando sequências polimórficas deste gene para análise da estrutura de população de *P. malariae*. Há apenas um estudo que compara sequências de uma pequena região gênica obtidas de isolados de *P. brasilianum* com apenas uma sequência de isolado de *P. malariae* (Fandeur et al., 2000). Os únicos dados epidemiológicos moleculares para este parasita foram descritos a partir do estudo de seis marcadores microssatélites (Bruce et al., 2007, 2011).

Pelas limitações dos estudos que comparam *P. malariae* e *P. brasilianum*, as questões sobre a história evolucionária entre *P. malariae* e *P. brasilianum* continuam não resolvidas. Assim, pela impossibilidade de diferenciá-los sugere-se uma recente transferência entre hospedeiros humanos e primatas (Escalante et al., 1995, 1998; Qari et al., 1996). Entretanto, a direção da transferência ainda é duvidosa, com razões apontando para a transferência do humano para o macaco e vice-versa (Ayala, 1998).

NCBI Resources How To My NCBI Sign In

Nucleotide Nucleotide Plasmodium malariae [organism] OR Plasmodium brasilianum Search

Save search Limits Advanced Help

Display Settings: Summary, 20 per page, Sorted by Default order Send to: Filter your results:

Limits Activated: Published between: 1986/1/1 and 2007/12/31 Change Remove

Results: 1 to 20 of 83 << First < Prev Page 1 of 5 Next > Last >>

1. [Plasmodium brasilianum isolate Ase60 merozoite surface protein 1-like protein gene, partial cds](#)
261 bp linear DNA
Accession: AF138882.1 GI: 5326851
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [Related Sequences](#)

2. [Plasmodium malariae merozoite surface protein 1-like protein gene, partial cds](#)
387 bp linear DNA
Accession: AF138881.1 GI: 5326849
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [Related Sequences](#)

3. [Plasmodium brasilianum isolate Ase18 merozoite surface protein 1-like protein gene, partial cds](#)
261 bp linear DNA
Accession: AF138880.1 GI: 5326847
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [Related Sequences](#)

4. [Plasmodium brasilianum isolate Ase92 merozoite surface protein 1-like protein gene, partial cds](#)
261 bp linear DNA
Accession: AF138879.1 GI: 5326845
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [Related Sequences](#)

5. [Plasmodium brasilianum isolate Ase117 merozoite surface protein 1-like protein gene, partial cds](#)
237 bp linear DNA
Accession: AF138878.1 GI: 5326843
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [Related Sequences](#)

[Plasmodium malariae circumsporozoite \(CS\) gene, complete cds](#)

Filter your results:

All (83)

Bacteria (0)

INSDC (GenBank) (83)

mRNA (0)

RefSeq (0)

Manage Filters

Top Organisms [Tree]

Plasmodium malariae (73)

Plasmodium brasilianum (8)

Plasmodium cf. malariae (2)

Find related data

Database: Select

Find items

Search details

"Plasmodium malariae"
[Organism] OR "Plasmodium
brasilianum"[Organism] OR
"Plasmodium cf. malariae"
[Organism]

Figura 8 - Dados sobre sequências nucleotídicas de *P. malariae* e *P. brasilianum* (2007).

Em seu estudo, Tazi e Ayala (2011) analisaram sequências disponíveis no GenBank de três diferentes genes (*csp*, *msp1* e *ssurRNA*) demonstrando que a transferência de hospedeiro provavelmente ocorreu do *P. brasilianum* para o *P. malariae*, devido à baixa diversidade alélica encontrada no *P. malariae*. Mesmo que seus resultados estejam de acordo com estudos anteriores (Escalante et al., 1995), os autores concluem que estes resultados são limitados em razão da pouca quantidade de sequências disponíveis para estas espécies.

1.5 Microssatélites

Os microssatélites são sequências simples de DNA que se repetem em “tandem” e são encontrados em menor ou maior abundância no genoma de quase todos os organismos conhecidos (Chambers e MacAvoy, 2000). Segundo Goldstein e Pollock (1997), quando a unidade de repetição possui de 1 a 6 pb são denominadas microssatélites, acima disto são ditas minissatélites. Para simplificar, o termo microssatélites será utilizado neste trabalho para descrever esses marcadores (tanto microssatélites, como minissatélites).

Os microssatélites se distribuem de forma uniforme entre áreas intergênicas, com exceção dos telômeros, e raramente em regiões codificantes, no caso da unidade de repetição ser um trinucleotídeo (Hancock, 1999).

Estas repetições são consideradas fáceis de caracterizar (Barker, 2002) e mostram um vasto polimorfismo, devido à variação no número de repetições de suas unidades, graças ao processo de perda ou ganho de suas unidades de repetição (Scholetter, 1998). Segundo Chambers et al. (2000), os microssatélites são classificados de acordo com o tipo de unidade de repetição no locus, sendo puro (quando há apenas um tipo de unidade de repetição), composto (quando há dois tipos de unidades de repetição) e complexo (existindo três ou mais tipos de unidades de repetição). Adicionalmente, utiliza-se o termo interrompido ou imperfeito para indicar a presença de unidades simples não repetitivas internamente no locus.

Atualmente, os microssatélites são uns dos marcadores de escolha para estudos de genética de populações e têm sido amplamente utilizados para investigar a diversidade genética de *Plasmodium* como *P. vivax* e *P. falciparum*, devido sua abundância, alto grau de mutações e uma evolução neutra (Albrecht et

al., 2006; Anderson et al., 2000; Ferreira et al., 2002; Hoffmann et al., 2003; Hoffmann et al., 2006; Joy et al., 2004; Karunaweera et al., 2007; Martha et al., 2007).

Somente em 2007, Bruce e colaboradores estabeleceram um protocolo para caracterização genética das amostras de *P. malariae* através de microssatélites, onde seis loci foram utilizados (Tabela 3). Os autores realizaram uma análise preliminar com esses marcadores em alguns isolados de laboratório (quatro isolados) e de campo (74 isolados) provenientes de sete países (Uganda, Brasil, Colômbia, Peru, Malaui, Gâmbia e Tailândia). Apesar do número pequeno de amostras da América do Sul (uma de *P. malariae* e duas de *P. brasilianum*), a diversidade alélica nestes isolados foi restrita, visto que duas dessas amostras apresentaram genótipos multilocus idênticos e a outra variou destas em apenas um locus. Além disso, eles verificaram que o alelo Pm09-299 foi encontrado apenas nessas amostras, sendo considerado por esses autores como um marcador para amostras da América do Sul. Porém, esses encontros podem estar relacionados ao fato dessas amostras serem isolados mantidos em laboratório já há muito tempo. É importante ressaltar que em todos os casos, os genótipos detectados mais que uma vez foram encontrados na mesma região geográfica (Bruce et al., 2007), podendo a metodologia ser utilizada para análise de populações geograficamente distintas. Digno de nota ainda é o fato de que os isolados de *P. brasilianum* apresentaram praticamente o mesmo genótipo de *P. malariae*, o que confirma a hipótese de alguns autores de que *P. brasilianum* e *P. malariae* são uma só espécie (Ayala et al., 1999). Entretanto, a análise de um número maior de amostras é necessária para esclarecer esses resultados.

Tabela 3 - Características alélicas dos loci polimórficos de microssatélites.

Lócus	Unidade de repetição*	Tamanho do alelo (bp)	Nº. de alelos distintos
Pm02	(CATA) ₂₃	167–205	10
Pm09	(GCAAAATAACAAAAAGA) ₁₁	299–351	5
Pm11	(TAAACAAAAA) ₁₁	256–309	6
Pm25	(GT) ₁₇	100–135	10
Pm34	(CA) ₂₅	204–231	9
Pm42	(CAATT) ₇	326–341	4

* O número de repetições é dado para o isolado de laboratório *P. malariae* Brasil I.

Fonte: Bruce et al., 2007.

1.6 Proteína de Superfície do Merozoíta 1

A proteína de superfície do merozoíta 1 (MSP1) é o principal antígeno de superfície das formas invasivas de *Plasmodium sp.* nas células sanguíneas. Provavelmente por causa da sua abundância e localização proeminente na superfície celular, a MSP1 é um alvo primário do sistema imune do hospedeiro e os anticorpos que reconhecem várias regiões desta proteína são detectados em uma grande percentagem dos indivíduos em áreas endêmicas (Tolle et al., 1993). Anticorpos reconhecendo MSP1 são rapidamente detectáveis depois da infecção por *Plasmodium* fazendo desta proteína um importante componente para o desenvolvimento de uma vacina para malária (Greenwood e Targett, 2011; Putaponrtip et al., 2002). No entanto, tanto em *P. falciparum* quanto em *P. vivax*, a MSP1 apresenta um extenso polimorfismo em diferentes áreas geográficas, representando o maior obstáculo para o desenvolvimento para uma vacina efetiva (Brito e Ferreira, 2011; Kadekoppala e Holder, 2010). Embora sequências do gene codificante da MSP1 para *P. falciparum* e *P. vivax* (PfMSP1 e PvMSP1) tenham sido descritas há muito tempo (Holder et al., 1985; del Portillo et al., 1991), este

gene foi identificado apenas recentemente para *P. malariae* (GenBank FJ824669) (Birkenmeyer et al., 2010).

A MSP1 é sintetizada no início da esquizogonia como um precursor de aproximadamente 195 kDa que sofre uma série de clivagens proteolíticas (Holder, 1988; Holder et al., 1992). No momento de saída do merozoíta da célula do hospedeiro, a MSP1 sofre uma etapa de processamento primário pela protease subtilisina-like SUB1 para produzir quatro polipeptídeos (Koussis et al., 2009). O complexo multipartido da MSP1 residente na superfície dos merozoítas livres é eliminado no momento da invasão do eritrócito em uma etapa de processamento secundário por uma segunda protease subtilisina-like, SUB2 (Harris et al., 2005), que media a clivagem proteolítica da MSP1₄₂ em dois fragmentos, MSP1₃₃ e MSP1₁₉. Esta clivagem libera o complexo contendo MSP1₃₃ na forma solúvel e a MSP1₁₉ permanece ancorada por GPI (“glycosylphosphatidylinositol”) na superfície do parasita que invade o eritrócito. A MSP1₁₉ é composta de dois domínios EGF (fator de crescimento epidermal)-like e após a invasão é rapidamente transferida ao vacúolo alimentar em desenvolvimento, onde permanece até o final do próximo ciclo intracelular (Dluzewski et al., 2008).

Tanabe et al. (1987) descreveram sete blocos variáveis flanqueados por regiões conservadas e semiconservadas, a partir de alinhamentos entre sequências do gene da MSP1 de diferentes isolados de *P. falciparum*. Em 1991, após descrever a MSP1 de *P. vivax*, del Portillo et al. (1991) demonstraram que dentro dos blocos conservados e semiconservados descritos por Tanabe, existiam regiões conservadas também interespecies (*P. falciparum*, *P. vivax* e *P. yoelli*). Naquele momento, as sequências nucleotídicas completas para os genes *msp1* de *P. malariae* e de *P. ovale* ainda não estavam disponíveis. Estas só foram descritas recentemente por Birkenmeyer et al. (2010). Embora este estudo tenha utilizado apenas um isolado de *P. malariae* (GenBank FJ824669), após alinhamento com

sequências de aminoácidos de outras espécies, pôde-se visualizar o padrão de blocos com regiões conservadas, semiconservadas e polimórficas (Figura 9).

A MSP1 é muito utilizada em estudos de polimorfismo genético para *P. falciparum* e *P. vivax* (Brito e Ferreira, 2011), se mostrando uma ferramenta para análise da genética de população de parasitas do gênero *Plasmodium*. O único estudo de identidade entre sequências de *msp1* de *P. malariae* e *P. brasilianum* foi realizado na Guiana Francesa (Fandeur et al., 2000). Este estudo utilizou as sequências obtidas para a região do bloco 2 do gene *msp1* e mostrou limitado polimorfismo, com identidades de 93 a 100% entre as sequências de aminoácidos obtidas em um isolado humano e quatro de símios.

A.

B.

Figura 9 - Alinhamento entre sequências de MSP1. A. Alinhamento da sequência proteica da MSP1 (Fonte: Birkenmeyer et al., 2010). Em vermelho o fragmento correspondente ao bloco 8 (ou quarto bloco polimórfico) da MSP1. B. Representação esquemática da MSP1, segundo Tanabe et al., 2007. Os blocos em cinza indicam a localização dos blocos conservados.

A região correspondente ao bloco 8 apresentou regiões de repetições imperfeitas e um alto polimorfismo após alinhamento com a MSP1 de outras espécies de *Plasmodium* (Birkenmeyer et al., 2010). Esta região já se mostrou muito polimórfica em estudos com *P. falciparum* (Rich e Ayala, 2000; Rev. em Rich et al., 2000; Tanabe et al., 1987) e *P. vivax* (Brito e Ferreira, 2011).

Além de ajudar a esclarecer o relacionamento entre *P. malariae* e *P. brasilianum*, a análise de marcadores moleculares é uma ferramenta importante para estudos de vacinação, testes de drogas *in vivo*, duração das infecções, recaídas, dinâmica parasita-hospedeiro e biologia da população (Bruce et al., 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a extensão do polimorfismo de amostras brasileiras de *P. malariae* e *P. brasilianum* usando como ferramenta seis marcadores microsatélites e a região correspondente ao oitavo bloco da proteína de superfície do merozoita 1.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Análise dos Microsatélites

Avaliar a utilidade dos seis microsatélites para amostras brasileiras;

Avaliar o polimorfismo dos seis microsatélites em amostras brasileiras;

Comparar o polimorfismo presente em amostras de Região Amazônica com amostras de Mata Atlântica;

Comparar os haplótipos presentes em diferentes hospedeiros;

Comparar os haplótipos obtidos de isolados envolvidos em transmissão transfusional;

Comparar os haplótipos presentes em duas infecções consecutivas de dois pacientes;

Avaliar longitudinalmente a dinâmica de haplótipos em foco de malária residual;

Avaliar a utilização do alelo Pm09-299 como marcador de amostras da América do Sul;

Comparar as frequências alélicas e heterozigosidade obtidas nas amostras brasileiras com aquelas de outras regiões geográficas;

2.2.2 Análise da Proteína de Superfície do Merozoíta 1

Estabelecer e validar uma ferramenta molecular de análise de um marcador polimórfico baseada na Proteína de Superfície do Merozoíta 1, para utilização em amostras brasileiras;

Avaliar o polimorfismo do bloco 8 em isolados brasileiros;

Verificar a presença de dimorfismo alélico no bloco 8 da MSP1 em amostras brasileiras;

Comparar o polimorfismo presente em amostras de Região Amazônica com amostras de Mata Atlântica;

Comparar os alelos presentes em diferentes hospedeiros;

Comparar os alelos obtidos de isolados envolvidos em duas transmissões transfusionais;

Comparar os alelos presentes em duas infecções consecutivas de três pacientes;

Avaliar longitudinalmente a dinâmica de alelos em foco de malária residual;

Avaliar a presença de algum possível marcador para amostras da América do Sul;

2.2.3 Marcadores Moleculares e Relacionamento Genético entre *P. malariae*/*P. brasilianum*

Avaliar a utilidade dos marcadores de microssatélites e bloco 8 da MSP1 como ferramentas em estudos de relacionamento genético.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

Vinte e cinco amostras de DNA genômico (gDNA) de *P. malariae* e *P. brasilianum* foram usadas neste estudo e estão organizadas na Tabela 4. Quatro amostras foram obtidas de quatro pacientes envolvidos em dois casos de malária transfusional: duas amostras foram obtidas de dois pacientes esplenectomizados que foram infectados durante uma transfusão sanguínea e duas outras amostras foram obtidas de seus doadores de sangue, dois portadores assintomáticos que provavelmente adquiriram a infecção em Juquitiba - SP (Di Santi et al., 2005) (amostras 1 e 2) e Iguape – SP (Kirchgatter et al., 2005) (amostras A e J) . Em um projeto anterior (projeto de pesquisa “Malária autóctone em áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo: caracterização do problema e subsídios para seu controle”, apoio FAPESP- Programa de Pesquisa em Políticas Públicas (Processo no. 03/06420-0), mais de 300 amostras de sangue foram coletadas de habitantes de Juquitiba por 4 anos. Parte destas amostras foi usada neste trabalho (indivíduos 3 a 12, totalizando 13 amostras). Dentre estas amostras, três foram coletadas de um mesmo indivíduo em datas diferentes (amostras 4a e 4b; 5a e 5b; 6a e 6b). Outras amostras de *P. malariae* e *P. brasilianum* disponíveis também foram analisadas: uma amostra de *P. malariae* (I11) obtida de um paciente infectado em Iporanga - SP (região de Mata Atlântica); uma amostra de *P. malariae* (RBR) obtida de um paciente (RBR714) infectado em Rio Branco - AC (Região Amazônica); uma amostra de *P. malariae/P. brasilianum* (Mosquito 95) obtida a partir de um pool de três exemplares de mosquitos *An. (K.) cruzii* coletados em Itanhaém – SP (região

de Mata Atlântica); três amostras de *P. brasilianum* obtidas de hospedeiros símios capturados em Abunã, aproximadamente 200km de Porto Velho (RO) (*Callicebus dubius*, amostra P169) e Igapó-Açu, aproximadamente 300km de Manaus (AM) (*Callicebus caligatus*, amostras P177 e P 182), localizadas em Região Amazônica e amostra (47/00), de paciente infectado em Tomé-Açu – PA. A localização das amostras esta demonstrada nas figuras 10 e 11. Adicionalmente, a cepa de *P. brasilianum* (Peru III) (Collins et al., 1990) foi usada como controle positivo. Com exceção das amostras de símios, M95, I11 e RBR714, todas as amostras fazem parte da coleção do Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN.

Figura 10 - Origem das amostras brasileiras de *P. malariae* e *P. brasilianum*. **A-** amostras originadas do Estado de São Paulo: amostras humanas de Juquitiba (2-12), amostras transfusionais (1 e J); amostra humana de Iporanga (I11), amostra humana de Iguape (A) e amostra de mosquito de Itanhaém (M95). **B-** Amostras originadas da Região Amazônica Brasileira: amostra humana do Acre (RBR), amostra humana do Pará (47/00) e amostras de hospedeiros símios capturados em Rondônia (P169) e Amazonas (P177 e P182). Modificado de Google5 Earth e Wikimedia Commos.

Tabela 4 - Amostras de *P. malariae* e *P. brasilianum* usadas neste estudo.

Amostra	Data da Coleta	Fonte	Localidade
47	2000	Paciente 47/00	Tomé-Açu/PA
A	2000	Paciente A	Iguape/SP
J	2000	Paciente J	Transfusão de sangue do paciente A
I11	01/2002	Paciente I11	Iporanga/SP
1	09/2004	Paciente 58/04	Transfusão de sangue do paciente 72/04
2	12/2004	Paciente 72/04	Juquitiba/SP
3	08/2005	Paciente PPP23	
4a	09/2005	Paciente PPP16	
4b	02/2006		
5a	06/2005	Paciente PPP62	
5b	03/2006		
6a	04/2006	Paciente PPP190	
6b	05/2007		
7	08/2006	Paciente PPP68	
8	05/2007	Paciente PPP194	
9	06/2007	Paciente PPP222	
10	08/2007	Paciente PPP157	
11	09/2006	Paciente PPP156	
12	06/2007	Paciente PPP234	
RBR	07/2004	Paciente RBR714	Rio Branco/AC
M95	05/2010	<i>Anopheles (K.) cruzii</i>	Itanhaém/SP
P169	03/2010	<i>Callicebus dubius</i>	Porto Velho/RO
P177	02/2011	<i>Callicebus caligatus</i>	Manaus/AM
P182			
Perulll	1983	<i>Saimiri sciureus peruviansis</i>	Iquitos, Peru

Figura 11 - Amostras humanas (2-11) coletadas no município de Juquitiba – SP, de acordo com o Sistema de Posicionamento Global (GPS).

3.2 Obtenção dos Parasitas e Extração do DNA genômico

Com exceção das amostras M95, RBR e Peru III, que foram fornecidas com DNA genômico já extraído, todas as outras amostras passaram inicialmente por uma lise com saponina 1%. O produto da lise foi centrifugado e o material sedimentado foi lavado duas vezes. Na última lavagem retirou-se o sobrenadante e 200 µl do sedimento foi submetido a uma extração de DNA genômico usando-se resina comercialmente disponível GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Biosciences), conforme instruções do fabricante, como previsto em seus projetos originais.

3.3 Identificação dos Parasitas

Todas as amostras foram analisadas microscopicamente pelo Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN (NEM/SUCEN), situado no Ambulatório dos Viajantes do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. As amostras provenientes do município de Juquitiba utilizadas neste trabalho foram gota espessa negativa, e o seu diagnóstico foi realizado por metodologias moleculares. O mesmo aconteceu com todas as demais amostras, onde o diagnóstico também foi por biologia molecular. Para todas as amostras foram utilizados dois protocolos de PCR e sequenciamento para confirmação da espécie sendo: um “nested” PCR baseado na amplificação da subunidade menor do RNA ribossomal (ssrRNA) usando uma modificação da técnica originalmente descrita por Snounou et al. (Snounou et al., 1993; Singh et al., 1999), onde a primeira reação foi modificada no

primer reverse para reduzir o tamanho do fragmento a ser amplificado e aumentar a sensibilidade, considerando amostras com baixa parasitemia (Dos Santos et al., 2009) e um “nested” PCR baseado na amplificação do gene mitocondrial citocromo b (cytb) (Perkins and Schall, 2002).

3.4 Amplificação do Genoma Inteiro

Devido às baixas parasitemias, à inexistência de cultivo contínuo *in vitro* e ao pouco volume de DNA genômico disponível nas amostras já extraídas, realizamos uma pré-amplificação genômica conhecida como WGA (“whole genome amplification”), que se baseia na amplificação por deslocamento múltiplo com uma DNA polimerase capaz de replicar até 100 kb sem dissociar-se do DNA molde. Esta enzima possui atividade de exonuclease de 3’ a 5’, garantindo a fidelidade dos produtos durante a replicação. Através dessa metodologia, até 40 µg de DNA podem ser gerados em 50 µl de reação (Dean et al., 2002). Esta técnica já foi utilizada em análise de microssatélites de *P. vivax*, com excelente concordância com os resultados obtidos diretamente a partir de DNA genômico (Karunaweera et al., 2007). O kit REPLIg (Qiagen, Valencia, CA) foi empregado para essa amplificação do genoma inteiro e foi utilizado conforme as instruções do fabricante.

3.5 Análise dos Microssatélites

3.5.1 PCR dos Microssatélites

Para avaliar a extensão do polimorfismo nas amostras, seis microssatélites foram amplificados usando uma reação de PCR “semi-nested” (Bruce et al., 2007).

As sequências dos oligonucleotídeos utilizados no primeiro PCR e no “semi-nested” estão listados na Tabela 5 (Bruce et al., 2007). As condições de amplificação foram as seguintes: 0,6 U de ThermoPrime *Taq* DNA polimerase (ABgene, UK), 75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3,0 mM MgCl_2 , 0,01% Tween[®]20, 0,2 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP. Os oligonucleotídeos foram empregados na concentração de 40 nM cada para o primeiro PCR e a 80 nM para a reação “semi-nested”. Um volume de 2 µl da primeira reação foi utilizado na segunda amplificação. As condições de ciclagem foram: primeira reação (94°C por 4 min, 1 ciclo; 94°C por 30 seg, 48°C por 30 seg, 68°C por 60 seg, 35 ciclos; 68°C por 2 min, 1 ciclo); reação “semi-nested” (94°C por 4 min, 1 ciclo; 94°C por 30 seg, 52°C por 30 seg, 68°C por 60 seg, 19 ciclos; 68°C por 2 min, 1 ciclo).

Tabela 5 - Sequências dos oligonucleotídeos usados no PCR “semi-nested” para amplificação de lócus de microssatélites de *P. malariae*.

Lócus	Sequência do oligonucleotídeo de 5' para 3'	Fluoróforo
Pm02	for GGG GCA TAA AGG AAA AAC	6-Fam
	rev GAA TTT TTG AAT AAC AAG AAA CC	
	for* GCA TAA TAC AGT GAT GCT TAG	
Pm09	rev GTT CAT AAC TTT GAT CTT AAC	Ned
	for ACG ATA ATA ATA TAA ATG GGG	
	rev* CAT TTG ACC AAT TTA ACA CAT TC	
Pm11	for GGG ATA TGA ATT ACA TAC AC	Hex
	rev CTT TAT TTG TGG TCG AGG	
	for* GAG GAA AGG TTG AAG TGG	
Pm25	for CCA AAT AAG TGA CAT ACA AC	Ned
	rev GAG GTA ACT TAA AAA ATT CAC	
	for* CTC CCC ATT TTT CGT TC	
Pm34	rev TTG GAC AAT GAA AAA ACT AAG	Hex
	for GAA TGG AAA AAT TCC TTC AG	
	rev* CAA GAT GAA CAA CTG ATA GGG	
Pm42	rev TGT ATG TTT TAT GTT CAC TTC	Hex
	for TAA AGG TGT AGT GTA GAG	
	rev* AAA CCG CTG GCT TTA CG	

As primeiras duas sequências para cada lócus foram utilizadas na primeira reação. A segunda e terceira foram utilizadas no PCR “semi-nested”. O terceiro oligonucleotídeo é marcado na extremidade 5' com o fluoróforo descrito.

3.5.2 Eletroforese Capilar

Os produtos do PCR foram separados por eletroforese capilar para detectar o tamanho dos fragmentos amplificados. Foram utilizados 2 µl de produto do PCR sem diluição, 0,25 µl de marcador de peso molecular (GeneScan ROX 500, Applied Biosystems) e 12,75 µl de Formamida HI-DI (Applied Biosystems) e então foram separados em um sequenciador de capilar 310 (Applied Biosystems) do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Somente as amostras 1 e Peru III foram diluídas (1:10) devido às altas parasitemias.

3.5.3 Análise dos Dados de Microssatélites

Neste estudo, 100 unidades de fluorescência arbitrária (FU) no eletroferograma foram utilizadas como altura mínima para análise das amostras (Havryliuk et al., 2008), tendo em vista as baixíssimas parasitemias encontradas em infecções por *P. malariae*.

O tamanho dos fragmentos amplificados e a altura dos picos foram analisados pelo programa STRand (<http://www.vgl.ucdavis.edu/STRand>) (Toonen e Hughes, 2001). Cada isolado foi definido com um haplótipo (alelo encontrado em cada marcador). Aos isolados que apresentaram um segundo pico no mesmo marcador (outro alelo) com altura correspondente a pelo menos um terço da altura do pico maior, foram atribuídos um segundo haplótipo (Anderson et al., 2000). O alelo dominante nas amostras com múltiplos alelos foi definido como aquele com o pico mais alto. O número de genótipos distintos de *P. malariae* detectáveis por amostras (multiplicidade da infecção ou MOI) foi considerado como o maior número de alelos detectados em um único locus (Smith et al., 1999).

A diversidade genética das populações foi examinada através do cálculo da heterozigosidade virtual (H_E) de cada locus, definida como $H_E = [n/(n-1)] [1 - \sum p_i^2]$, onde n é o número de isolados analisados e p_i é a frequência de cada alelo na população. Esta análise foi realizada através do programa Arlequin 3.0 (Excoffier et al., 2005).

3.6 Análise da Proteína de Superfície do Merozoíta 1

Após alinhamento das sequências nucleotídicas do gene que codifica MSP1 de algumas espécies de *Plasmodium*, incluindo o PmMSP1, oligonucleotídeos forward e reverse foram criados para analisar o fragmento correspondente ao oitavo bloco da MSP1. Este bloco foi escolhido por apresentar regiões com repetições imperfeitas (Birkenmeyer et al., 2010) que facilitam eventos de recombinação e então pode ser um marcador genético informativo. Estes oligonucleotídeos estão localizados em ilhas de seqüências conservadas que flanqueiam o Bloco 8. Os oligonucleotídeos foram submetidos à ferramenta Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) para analisar sua especificidade (Figura 12).

Figura 12 - Alinhamento dos oligonucleotídeos no programa Primer-BLAST.

3.6.1 PCR da Proteína de Superfície do Merozoíta 1

As sequências dos oligonucleotídeos utilizados no primeiro PCR e no “nested” PCR estão listadas na Tabela 6 e sua localização no gene da MSP1 está ilustrada na figura 13. As condições de amplificação foram as seguintes: 0,5 U de *Taq* polimerase, 20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,125 mM de cada dNTP. Os oligonucleotídeos foram empregados na concentração de 250 nM cada para o primeiro PCR e para o “nested” PCR. Um volume de 1 µl da primeira reação foi utilizado na segunda amplificação. As condições de ciclagem foram: primeira reação (94°C por 5 min, 1 ciclo; 94°C por 60 seg, 58°C por 2 min, 72°C por 2 min, 25 ciclos; 72°C por 5 min, 1 ciclo); “nested” PCR (94°C por 5 min, 1 ciclo; 94°C por 60 seg, 58°C por 2 min, 72°C por 2 min, 30 ciclos; 72°C por 5 min, 1 ciclo).

Tabela 6 - Oligonucleotídeos usados para amplificar o Bloco 8 da MSP1

Reação	Oligonucleotídeo	Sequência de 5' para 3'
Primeiro PCR	PmP5F	For: CCATACTATTTAATTGCACTAAAG
	PmP5R	Rev: ACACACATAAGCAGTTTTCAAAAAG
“Nested” PCR	PmP5F2	For: AGGGAAATTGATAAATTAAATATTTTC
	PmP5R2	Rev: CTTTTCAAGATATTGCAATTTGGA

Figura 13 - Posição dos oligonucleotídeos na sequência da PmMSP1, usando como referência a sequência MM1.

3.6.2 Eletroforese em Gel de Agarose e Purificação dos Fragmentos

Os produtos amplificados por PCR foram analisados por eletroforese em gel de Agarose a 1% e tampão TBE (89 mM Tris-Borato, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA), corados com GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA) na diluição de 5×10^5 . Os fragmentos de aproximadamente 600 pb foram purificados com sílica conforme descrito (Boyle e Lew, 1995).

3.6.3 Clonagem

Os fragmentos purificados foram ligados ao vetor pGEM-T Easy de 2,7 kb (Promega). A ligação foi realizada por 1 hora à temperatura ambiente e em seguida mantida a 4°C durante a noite, conforme orientações do fabricante, para aumentar a eficiência de ligação. Células competentes (*E. coli* cepa DH10B), obtidas como descrito (Sambrook et al., 1989), foram transformadas termicamente (Sambrook et al., 1989). O material deixado em gelo por 30 minutos sofreu choque térmico a 42°C por 45 segundos e foi retornado ao gelo por 2 minutos. Esse material, então, foi cultivado em 120 µl de meio LB (Lennox L Broth Base) (Invitrogen), por uma hora a 37°C. Para seleção dos transformantes, as células foram plaqueadas em placas de LB-ágar-ampicilina (Lennox L Agar) (Invitrogen), suplementadas com 80 µg/ml de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) e 0,5 mM de IPTG (isopropyl β-D-thiogalactoside), e incubadas a 37°C por 16 horas. As colônias transformantes (brancas) foram crescidas por 16 horas a 37°C e 150 rpm, em meio LB-ampicilina (Sambrook et al., 1989). A preparação de DNA plasmidial foi realizada com a utilização do kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Uma alíquota de 3 µl de cada extração foi digerida por 2 horas a 37°C com 1 U de *EcoRI* (Fermentas) (que flanqueia os sítios de clonagem) utilizando o Tampão *EcoRI* 10X (Fermentas) em um volume final de 10 µl. O volume final da digestão foi analisado em gel de agarose a 1% em tampão TBE, na presença de GelRed (Biotium). Os plasmídeos que continham insertos do tamanho previsto foram selecionados para o sequenciamento.

3.6.4 Sequenciamento dos Fragmentos de DNA

A reação de sequenciamento foi realizada em ambas as fitas utilizando o kit BigDye Terminator (Applied Biosystems). Primeiramente, foram acrescentados 1 µl do oligonucleotídeo 5 pmol, 3,25 µl do tampão "Save Money", 0,75 µl de BigDye, 1 µl do DNA plasmidial (ou produto de PCR) e 4,5 µl de água ultrapura. A termociclagem foi a seguinte: 96°C por 60 seg; 96°C por 15 seg, 50°C por 15 seg, 60°C por 4 min, 35 ciclos. Para a precipitação do material foi adicionado 90 µl de isopropanol 66% e mantido a temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, foi realizada a centrifugação do material a 12.000 rpm por 20 minutos e foi descartado o sobrenadante. A lavagem da amostra foi feita com 150 µl de isopropanol 75% e centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, o etanol foi removido e a amostra permaneceu à temperatura ambiente até completa evaporação do álcool. A amostra recebeu então 10 µl de formamida, foi desnaturada e aplicada em sequenciador de capilar 3100 (Applied Biosystems) do Departamento de Parasitologia do ICB/USP.

3.6.5 Alinhamento e Análise das Sequências

A avaliação da qualidade do sequenciamento e a construção da sequência consenso foram realizadas com o software SeqMan versão 7.0.0 (DNASTar, Inc.). As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos foram alinhadas com a utilização do software ClustalX versão 1.81 (Thompson et al., 1997) e com esses dados foram criadas matrizes de similaridade com o uso do programa GeneDoc versão 2.6.002

(<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>). A fim de remover a possíveis erros de sequenciamento que possam interferir na análise e interpretação dos resultados, os polimorfismos únicos (“singletons”) foram excluídos.

3.6.6 Aspectos Éticos

As amostras de Mata Atlântica que fazem parte deste estudo são provenientes do projeto “Malária autóctone em área de Mata Atlântica do Estado de São Paulo: caracterização do problema e subsídios para seu controle” (Políticas Públicas FAPESP, Processo nº 03/06420-0, Coordenador: Gerhard Wunderlich, Dep. Parasitologia/ICB/USP) que foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (Protocolo nº19/2011). Todos os pacientes assinaram Termo de Consentimento informado. Com relação às amostras simianas todos os procedimentos adotados foram aprovados em total conformidade com permissões específicas emitidas pelo Ministério Brasileiro do Meio Ambiente (SISBIO, números 18861-3 e 24319-3). Todas as amostras humanas utilizadas (exceto I11 e RBR) fazem parte da coleção do Núcleo de Estudos em Malária, conforme as diretrizes contidas na Resolução nº 347, de 13 de janeiro de 2005 do Conselho Nacional de Saúde que foi constituída mediante solicitação à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq). A utilização das amostras neste estudo foi autorizada pelo responsável por sua guarda (Dra. Silvia Maria Di Santi, Chefe do Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para padronizar as técnicas de microssatélites bem como a análise do oitavo Bloco da MSP1 no laboratório, analisou-se inicialmente a amostra 1, porque este paciente era esplenectomizado e, portanto, apresentava alta parasitemia. É importante notar que a técnica de WGA foi útil apenas para amostras com altas parasitemias (1 e Peru III), uma vez que esta metodologia não é capaz de aumentar a concentração de DNA alvo, mas apenas aumentar o volume disponível para as reações. Parte da amplificação dos marcadores foi realizada com o gDNA original.

4.1 Microssatélites

4.1.1 Avaliação da utilidade dos seis microssatélites para amostras brasileiras

Além dos resultados mostrados neste trabalho, outras 20 amostras de *P. malariae* e *P. brasilianum* foram testadas, com resultados negativos para todos os marcadores, embora tivessem resultado positivo no PCR para *ssrRNA*. Esse resultado pode ser explicado porque o gene utilizado para diagnóstico (*ssrRNA*) possui várias cópias no genoma e os marcadores microssatélites são provavelmente cópia única, e neste caso, as amostras provavelmente tinham pouco DNA alvo. Aqui são discutidos apenas os resultados obtidos para três ou mais marcadores.

Das amostras analisadas, 18 amplificaram os 6 microsatélites, uma (6b) amplificou 5 microsatélites e uma (RBR) amplificou apenas 3 microsatélites, totalizando 20 amostras. Estes resultados são mostrados na Tabela 7. Nestas duas últimas amostras, a definição do haplótipo ficou incompleta e infelizmente, estas reações não puderam ser repetidas, devido à quantidade insuficiente de amostra.

Tabela 7 - Resultado dos 6 microsatélites obtidos nas amostras.

Sample	Pm02	Pm09	Pm11	Pm25	Pm34	Pm47
1	185	342	288	107	220	331
2	185	342	288	107	220	331
3	185	342	277	107	220	331
4	185	342	288	107	220	331
5a	185	342	277	107	222	331
5b	185	342	288	107	222	331
6a	185	342	288	107	222	331
6b	185	342	288	107	Nd	331
7	185	342	277	107	222	331
8	185	342	288	107	222	331
9	185	342	288	107	222	331
10	185	342	277	107	220	331
11	185	342	288	107	220	331
12	185	342	277	107	220	331
13	185	Nd	277	107	Nd	Nd
M95	181	325	277	107	222	331
P169	185	325	288	107	222	331
P177	177	325	288	100	220	331
P182	185	325	277	107	210	331
PeruIII	185	265	277	107	220	331
Peru I*	181	299	288	107	220	331

*resultado obtido por Bruce et al., 2007. Nd=não determinado.

A amplificação de alguns loci e outros não a partir da mesma amostra não é um resultado incomum, uma vez que é possível haver diferenças na eficiência do desempenho dos oligonucleotídeos utilizados. Neste caso, o limiar de sensibilidade do PCR deve ser levado em conta. Este limiar foi maximizado através da concentração da amostra antes da extração de DNA (por uma lise de saponina),

pela utilização de um protocolo de “nested” PCR e pela detecção do produto por eletroforese capilar com fluoróforos (Figuras 14 e 15). Portanto, assume-se que as infecções por clones mistos não foram perdidas. Além disso, essas amostras foram estudadas anteriormente para outros alvos, como os genes ribossomais e mitocondrial, apresentando apenas sequências únicas (dados não mostrados).

Figura 14 - Genotipagem dos loci microssatélites da amostra 1 (após o WGA). Os fragmentos foram resolvidos em gel de agarose a 1%, corados com Brometo de Etídio e visualizados em luz UV. Marcador de peso molecular: 100 bp DNA ladder (Invitrogen).

É importante notar que Pm34 é um marcador microssatélite dinucleotídeo [(CA) n] e, por consequência, as estimativas de frequência alélica para este locus são muitas vezes confundidas pela sobreposição de bandas “sombra” (Murray et al., 1993). Neste caso, além da banda principal produto do PCR, bandas “sombra” de 2 pb podem ser vistas abaixo da banda principal. A presença destas bandas “sombra” é especialmente problemática se os alelos diferem por 2 pb. Assim, os alelos Pm34-220 e Pm34-222 poderiam ser considerados o mesmo alelo.

Figura 15 - Eletroferograma dos 6 microssatélites analisados na amostra 1. A escala de fluorescência varia para cada microssatélite. O eixo X apresenta o tamanho do fragmento de DNA em pares de base (pb) e os picos vermelhos correspondem ao padrão GeneScan Rox 500.

Na análise de microssatélites o único marcador monomórfico para todas as amostras foi Pm47-331, que foi descrito com poucas repetições (CAATT)⁷ (Bruce et al., 2007), e portanto não seria de esperar altas variações. No entanto, os outros cinco marcadores apresentaram de dois a quatro alelos por locus em uma população limitada e podem ser considerados bons marcadores de genotipagem para estudar a diversidade genética destes parasitas.

4.1.2 Avaliação do polimorfismo dos seis microssatélites em amostras brasileiras

Das 14 amostras humanas da Mata Atlântica (1-11 e I11), 5 diferentes genótipos multilocus foram registrados (Tabela 7): haplótipo 1 (185/342/288/107/220/331) encontrado em quatro amostras; haplótipo 2 (185/342/277/107/220/331) em três amostras; haplótipo 3 (185/342/277/107/222/331) em duas amostras; haplótipo 4 (185/342/288/107/222/331) em quatro amostras; haplótipo 5 (185/342/288/107/Nd/331) em uma amostra. O haplótipo 6 (185/Nd/277/107/Nd/Nd) foi encontrado na amostra humana da Amazônia (RBR). O haplótipo 7 (181/325/277/107/222/331) foi encontrado apenas na amostra de mosquito (M95). A partir das 4 amostras obtidas de hospedeiros símios, 4 diferentes genótipos multilocus foram registrados (Tabela 7): haplótipo 8 (185/325/288/107/222/331), haplótipo 9 (177/325/288/100/220/331), haplótipo 10 (185/325/277/107/210/331) e haplótipo 11 (185/265/277/107/220/331). Não foram encontrados alelos múltiplos nas amostras.

No experimento realizado com a amostra de mosquito, apenas um alelo por locus foi detectado, indicando que na amostra analisada o parasita estava no estágio de esporozoíto ou esta amostra era homozigota para estes 6 loci. Ainda a chance de se encontrar múltiplos clones em um mesmo mosquito é baixa, mesmo para regiões endêmicas (Razakandrainibe et al., 2005). Neste sentido, a observação de uma infecção aparentemente por um único clone na amostra de mosquito pode ser esperada.

4.1.3 Comparação do polimorfismo presente em amostras de Região Amazônica com amostras de Mata Atlântica

P. malariae foi encontrado praticamente conservado em amostras humanas variando apenas em dois loci para todas as amostras analisadas, independentemente da sua origem geográfica. Embora a análise da amostra humana da Região Amazônica tenha sido parcial, somente com três loci, os alelos encontrados nesses foram idênticos àqueles obtidos para isolados de amostras de Mata Atlântica, indicando baixa diversidade em isolados brasileiros.

No entanto, a falta de evidência de aglomeração geográfica de haplótipos pode ser devida ao pequeno número de amostra disponível. Uma análise mais aprofundada das amostras brasileiras de origem geográficas diferentes será importante para caracterizar a epidemiologia de isolados de *P. malariae* brasileiros.

4.1.4 Comparação dos haplótipos presentes em diferentes hospedeiros

Em relação aos hospedeiros, diferentes haplótipos foram encontrados nas amostras a partir dos três grupos de diferentes hospedeiros. *P. brasilianum* apresentou um maior polimorfismo, variando em quatro loci de microssatélites. Entretanto, seria interessante comparar isolados de *P. malariae* e *P. brasilianum* ambos de áreas de Mata Atlântica, onde os seres humanos e símios estão sujeitos à infecção transmitida pelos mesmos vetores anofelinos. Esta circunstância permite, possivelmente, o contato frequente de *Plasmodium* derivado de símios com os seres humanos e vice-versa.

4.1.5 Comparação dos haplótipos obtidos de isolados envolvidos em transmissão transfusional

As duas amostras de *P. malariae* obtidas de um doador de sangue (2) e do seu receptor (1) envolvidas em um relato anterior de malária transfusional (Di Santi et al., 2005), mostraram o mesmo haplótipo. Isto proporciona evidência adicional de que ambos foram infectados com a mesma cepa, como esperado.

4.1.6 Comparação dos haplótipos presentes em duas infecções consecutivas de dois pacientes

Duas amostras foram avaliadas longitudinalmente em dois pacientes assintomáticos não tratados (5 e 6), durante um longo intervalo de tempo (12 meses). Os genótipos circulantes nas duas amostras do mesmo paciente apresentaram haplótipos multilocus quase idênticos (diferindo apenas por um único locus).

4.1.7 Avaliação longitudinal da dinâmica de haplótipos em foco de malária residual

O mesmo o haplótipo *P. malariae* persistiu durante quase 3 anos na população (ver amostras 2 e 11 na Tabela 7) de Juquitiba.

Usando o sistema de informações geográficas para localizar as amostras humanas na região de Juquitiba, de acordo com o Sistema de Posicionamento Global (GPS), verificamos que há claramente dois grupos (Figura 11), que são distante de cerca de 3 km. No entanto, não houve qualquer agrupamento de haplótipos nestas duas sub-populações. Esta falta de sub-estruturação na população também tem sido demonstrada em aldeias separadas por distâncias muito maiores (Bruce et al., 2011). Considerando que o raio de ação de um *An. (K.) cruzii* é cerca de 1 km (Ferreira et al., 1969), no nosso caso, a mistura pode ser atribuída ao movimento humano.

4.1.8 Avaliação da utilização do alelo Pm09-299 como marcador de amostras da América do Sul

O alelo Pm09-299 anteriormente descrito anteriormente como um marcador genético para *P. malariae* na América do Sul (Bruce et al., 2007) não foi encontrado nas amostras Brasileiras. Outro achado interessante é que este mesmo marcador foi descrito com tamanhos que variaram de 281-351 pb (Bruce et al., 2011), no entanto, este marcador mostrou um novo alelo de 265 pb na cepa PeruIII. Para confirmar este resultado, o novo alelo foi clonado e sequenciado (GenBank HQ677907, Figura 16).

Plasmodium brasilianum minisatellite Pm09 sequence

GenBank: HQ677907.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

```

LOCUS      HQ677907                260 bp    DNA        linear    INV 02-JUN-2011
DEFINITION Plasmodium brasilianum minisatellite Pm09 sequence.
ACCESSION  HQ677907
VERSION    HQ677907.1   GI:330689880
KEYWORDS
SOURCE     Plasmodium brasilianum
ORGANISM   Plasmodium brasilianum
            Eukaryota; Alveolata; Apicomplexa; Aconoidasida; Haemosporida;
            Plasmodium; Plasmodium (Plasmodium).
REFERENCE  1 (bases 1 to 260)
AUTHORS    Guimaraes,L.O., Wunderlich,G. and Kirchgatter,K.
TITLE      The genetic diversity of Plasmodium malariae from a residual
            malaria transmission focus in the Atlantic forest of Sao Paulo,
            Brazil
JOURNAL    Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 260)
AUTHORS    Guimaraes,L.O., Wunderlich,G. and Kirchgatter,K.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (02-DEC-2010) Malaria, SUCEN, Av Dr Eneas de Carvalho
            Aguiar 470, Sao Paulo, SP 05403-000, Brazil
FEATURES   Location/Qualifiers
            source                1..260
                                     /organism="Plasmodium brasilianum"
                                     /mol_type="genomic DNA"
                                     /strain="Peruvian III"
                                     /host="Saimiri peruviansis"
                                     /db_xref="taxon:5824"
                                     /PCR_primers="fwd_name: Pm09for, fwd_seq:
acgataataatataaatgggg, rev_name: Pm09rev, rev_seq:
gttcataactttgatcttaac"
                                     /PCR_primers="fwd_name: Pm09for, fwd_seq:
acgataataatataaatgggg, rev_name: Pm09rev, rev_seq:
catttgaccaatttaacacattc"
            repeat_region        1..260
                                     /rpt_type=tandem
                                     /satellite="minisatellite:Pm09"
ORIGIN
1  acgataataa  tataaatggg  gaaaaaagat  aagagaaaac  aggaaaaaca  gaaaaaacgag
61  caaaatagca  aaatgagtaa  aatagcaaaa  tgagtataat  agcaaaaacta  gtaaaataac
121  aaaacgagta  aaatagcaaa  acaagaaaag  tagcaaaaata  acaaaaagag  caaaatagc
181  aaaataagta  taaggataac  aagcaaaaata  aacaaaataa  agcaaaacat  gcatatgaat
241  gtgttaaatt  ggtcaaatga
//

```

Figura 16 - Sequência Pm09-265 descrita neste estudo.

Esta sequência mostrou deleção de duas unidades de repetição em relação à sequência original de Pm09 de *P. brasilianum* (cepa Colombian I/NYU) (GenBank DQ787849) (Bruce et al., 2007)(Figura 17).

Figura 17 - Alinhamento entre Pm09-299 (Bruce et al. 2007) e Pm09-265.

A cepa de *P. brasilianum* denominada Peru III também foi comparada a cepa Peru I, já analisada por outros autores (Bruce et al., 2007). Entre estas duas cepas, três marcadores apresentaram tamanhos diferentes (Tabela 7). Além do Pm09, foram obtidas diferenças também nos alelos Pm02 e Pm11. Embora as duas cepas fossem isoladas a partir de macacos de Iquitos, a Peru I foi obtida em 1983 a partir de *Aotus vociferans* (Collins et al., 1985) e a PeruIII foi obtida a partir de *Saimiri sciureus peruviansis* em 1987 (Collins et al., 1990).

4.1.9 Comparação das frequências alélicas e heterozigosidade obtidas nas amostras brasileiras com aquelas de outras regiões geográficas

As frequências alélicas foram calculadas como uma porcentagem do número total de alelos detectados para cada locus usando amostras humanas brasileiras de *P. malariae* (Tabela 7) em comparação com aquelas encontradas em um estudo anterior, onde amostras de Malauí, Gâmbia e Tailândia foram analisadas (Bruce et al., 2007). A diversidade alélica foi mais restrita nas amostras brasileiras. Este resultado pode, ou não, estar relacionado ao menor número de amostras analisadas no nosso estudo (15 versus 52). Diferentes genótipos foram registrados em 39 de 52 amostras de Malauí / Tailândia / Gâmbia (Bruce et al., 2007) e em 6 de 15 amostras humanas do Brasil (este estudo). A proporção de genótipos diferentes foi significativamente maior nas amostras não brasileiras comparadas com amostras brasileiras ($\chi^2 = 6,47$, $P < 0,05$). Pm02-185 foi o único alelo encontrado neste locus nas amostras humanas enquanto Pm02-181 foi encontrado na amostra de mosquito, mas estes alelos foram também os mais frequentes em amostras da Ásia e África. Do mesmo modo, Pm09-342 foi o único alelo encontrado neste locus nas amostras humanas, enquanto Pm09-325 foi encontrado na amostra de mosquito. Embora ausente na população humana brasileira, este último foi encontrado em mais de 80% das amostras Asiáticas e Africanas e em todas as amostras de símios brasileiros. Pm11-288 foi encontrado com mais frequência e Pm11-277 foi o segundo mais frequente, e estes também são os alelos mais frequentes em amostras da Ásia e África em uma proporção inversa. Os alelos Pm34-220 e Pm34-222 foram encontrados nas mesmas frequências em isolados brasileiros e são o segundo e o terceiro mais frequente em amostras da Ásia e África. Pm25-107 e Pm47-331, monomórficos na população humana estudada,

foram o mais frequente e o terceiro mais frequente em amostras da Ásia e África. Essa distribuição manteve-se inalterada em um estudo recente, realizado somente com amostras de Malaui (Bruce et al., 2011).

O índice de diversidade nas populações estudadas variou de 0,2218+/- 0,0668 (amostras humanas) a 0,4095 +/- 0,0447 (amostras não humanas) (H_E médio: 0,3211 +/- 0,0518). Nas amostras humanas, outros autores obtiveram valores de H_E entre 0,236 e 0,811 (Bruce et al., 2007) ou 0,192 e 0,849 (Bruce et al., 2011), dependendo do locus usado. Interessantemente, foi encontrada alta heterozigosidade no locus Pm09, que foi um locus com menores valores de heterozigosidade nos outros dois estudos (Bruce et al., 2007, 2011).

Pode-se supor que a diversidade e multiplicidade de *P. falciparum* aumentam com o aumento da frequência de transmissão (rev. por Babiker e Walliker, 1997). Detectou-se diversidade alélica baixa nos isolados brasileiros, que reflete uma taxa de transmissão muito baixa. Sabe-se que *P. malariae* tem uma taxa de crescimento reduzida (Gilles e Warrell, 1993), além de baixas parasitemias, que são possivelmente causadas pela sua preferência para eritrócitos maduros (Garnham, 1966). *P. malariae* também é conhecido para produzir infecções, que são frequentemente assintomáticas e de longa duração (até 40 anos, na ausência de re-infecção) (Vinetz et al., 1998). É também possível que a infecção exclusivamente com *P. malariae* explique as taxas de transmissão muito baixas encontradas na área de estudo. Em outros locais onde *P. malariae* ocorre em co-infecções principalmente com *P. falciparum*, *P. malariae* desenvolveu meios de eficiência de transmissão aumentada na presença de um co-parasita de outras espécies (Bruce et al., 2011).

4.2 Proteína de Superfície do Merozoíta 1

4.2.1 Estabelecimento e validação de uma ferramenta molecular de análise de um marcador polimórfico baseada na Proteína de Superfície do Merozoíta 1, para utilização em amostras brasileiras

A especificidade dos oligonucleotídeos e as condições de amplificação foram testadas por PCR com DNA humano e de símios e não houve amplificação (dados não mostrados).

Além das amostras apresentadas na Tabela 1, outras amostras de *P. malariae* foram também analisadas, mas resultaram em PCR negativo para a *msp1*. Provavelmente, a quantidade de DNA alvo nessas amostras foi insuficiente para amplificação de genes de cópia única como a *msp1*.

4.2.2 Avaliação do polimorfismo do bloco 8 em isolados brasileiros

Das amostras analisadas, 24 amostras brasileiras e o isolado Peru III amplificaram o oitavo bloco da MSP1 e estes resultados são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Tipos alélicos da região de repetições imperfeitas (Bloco 8) da proteína de superfície do merozoíta 1 (MSP1) e prevalência geográfica.

Tipo Alélico	Nº de Amino-ácidos	Nº de Amostra			Total	Nº de acesso no GenBank
		Brasil		Peru		
		Mata Atlântica	Região Amazônica	Iquitos		
A1	173	1 M				JX045639
A2	207		1 P			JX045640
A3	219	1 H	1 P	1 P		JX045641
A4	220		1 P			JX045642
A5 YQ	221	9 H	1 H			JX045643
A5 YR	221	1 H				-
A5 NQ	221		1 P			-
A6	224	1 H				JX045644
A7	225	6 H				JX045645
Total		19	5		25	

M= Isolado de Mosquito, H= Isolado Humano e P= Isolado de Primata não humano.

4.2.3 Verificação da presença de dimorfismo alélico no bloco 8 da MSP1 em amostras brasileiras

Na eletroforese em gel de agarose (Figura 18), onde parte dos resultados obtidos após amplificação por “nested” PCR são apresentados, foram visualizadas bandas de basicamente dois tamanhos distintos. Portanto, a princípio foi levantada a hipótese de dimorfismo alélico na MSP1 de *P. malariae* e *P. brasilianum*. Entretanto, após o sequenciamento dos fragmentos de PCR, esse dimorfismo não foi confirmado. As sequências de aminoácidos obtidas foram alinhadas e, considerando os diferentes tamanhos, foram agrupadas em sete diferentes alelos (A1-A7) (Tabelas 8 e 9). A sequência com menor tamanho foi a obtida na amostra M95, que apresentou uma região com uma grande deleção (cerca de um terço da sequência) quando comparada com os outros seis alelos encontrados. Todavia, esta sequência foi altamente conservada nos outros dois terços (Tabela 9).

Figura 18 - Eletroforese em Gel de Agarose do oitavo bloco da MSP1. 1 a 9 amostras de humanos, M = amostra de mosquito; P = amostras de símios; H = amostras humanas. 11 = controle negativo (sem DNA). 1 e 12 = GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

A análise da percentagem de similaridade entre as sequências de aminoácidos dos sete alelos, com exceção da região de deleção encontrada em A1, mostrou identidades entre 89-100% (Tabela 10). Trabalhos com esse bloco em isolados de *P. falciparum* mostraram apenas 10% de identidade entre os diferentes grupos alélicos (Tanabe et al., 1987). A menor percentagem de identidade (89%) foi encontrada entre os alelos A2 e A7, obtidos a partir de amostras de símio e humano, respectivamente. Um polimorfismo ainda mais limitado (identidades de 93 a 100%) entre isolados de *P. malariae* e *P. brasilianum* foi encontrado com a análise do bloco 2 da *msp1* na Guiana Francesa (Fandeur et al., 2000). Assim, pode-se sugerir que há uma provável ausência de dimorfismo alélico da MSP1 destes parasitas ao contrário do que acontece com outras espécies de *Plasmodium* (Tanabe et al., 1987; rev. em Roy et al., 2008). Outra explicação seria a presença de diferenças muito acentuadas entre as sequências dos grupos alélicos, incluindo os blocos conservados, impossibilitando a ligação dos oligonucleotídeos. Assim, ou a arquitetura de domínios é fundamentalmente diferente em *P. malariae* ou esta espécie de fato não apresenta dimorfismo no gene da MSP1, o que poderia ser inédito entre todas as espécies de *Plasmodium* estudadas até então.

Tabela 9 - Variações na sequência de aminoácidos no Bloco 8 dos alelos de MSP1 de *P. malariae* e *P. brasilianum*.

Hosp.	47	78-83	92	95	96-101	102	110-115	128-135	136-138	139-171	172	173-176	No. AA	
MM1#	H	N	VSVGET	P	Q	POPOQ	T	-----	SGSQSG	QSG	AEGTTETTTGQAGTTGTPEQAAAAGPQAE	A	TPGQ	222
A1	M	N	VSVGET	P	Q	POPOQ	T	-----	---	-----	---	---	173	
A2	P	N	-----	P	Q	-----	T	-----	SGSQSG	---	AEGTTETTTGQAGTTGTPEQAAAAGPQAE	G	TPGQ	207
A3	P/H	N	VSVGET	P	Q	POPOQ	T	-----	SGSQSG	---	AEGTTETTTGQAGTTGTPEQAAAAGPQAE	G	TPGQ	219
A4	P	N	VSVGET	A	Q	POQ--	T	-----	SGSQSG	QSG	AEGTTETTTGQAGTTGTPEQAAAAGPQAE	G	TPGQ	220
A5NQ	P	N	VSVGET	P	Q	POPOQ	P	TQ----	SGSQSG	---	AEGTTETTTGQAGTTGTPEQAAAAGPQAE	G	TPGQ	221
A5YQ	H	Y	VSVGET	P	Q	POPOQ	P	TQ----	SGSQSG	---	AEGTTETTTGQAGTTGTPEQAAAAGPQAE	G	TPGQ	221
A5YR	H	Y	VSVGET	P	R	POPOQ	P	TQ----	SGSQSG	---	AEGTTETTTGQAGTTGTPEQAAAAGPQAE	G	TPGQ	221
A6	H	N	VSVGET	P	Q	POPOQ	T	TQ----	SGSQSG	QSG	AEGTTETTTGQAGTTGTPEQAAAAGPQAE	G	TPGQ	224
A7	H	N	VSVGET	P	Q	POPOQ	T	TQTQTQ	SGSQSG	---	AEGTTETTTGQAGTTGTPEQAAAAGPQAE	G	TPGQ	225

Traços significam deleção. #FJ824669.

Tabela 10 - Percentagem de similaridade entre as sequências de aminoácidos dos tipos alélicos da região de repetições imperfeitas (Bloco 8) da proteína de superfície do merozoíta 1 (MSP1) de isolados de *P. malariae*/*P. brasilianum*.

	A1	A7	A5NQ	A5YR	A5YQ	A3	A2	A4	MM1	A6
A1	173	96%	98%	97%	97%	100%	93%	98%	100%	98%
A7	173	179	97%	96%	96%	96%	89%	94%	96%	97%
A5NQ	172	174	175	98%	99%	98%	91%	96%	98%	99%
A5YR	170	172	173	175	99%	97%	90%	95%	97%	98%
A5YQ	171	173	174	174	175	97%	90%	96%	97%	98%
A3	173	173	172	170	171	173	93%	98%	100%	98%
A2	161	161	160	158	159	161	161	93%	93%	92%
A4	170	170	169	167	168	170	160	171	98%	97%
MM1	173	173	172	170	171	173	161	170	173	98%
A6	173	175	174	172	173	173	161	170	173	175

Estágios sanguíneos de *Plasmodium* são haplóides e a detecção de múltiplas sequências em uma amostra de humano ou símio indicaria a presença de múltiplos genótipos. Também uma amostra a partir de um mosquito foi testada, onde as fases de *Plasmodium* podem ser haplóide (esporozoítos) ou diplóide (oocineto e oocistos). No entanto, múltiplas sequências não foram detectadas, indicando infecções clonais. Estes resultados foram obtidos com o sequenciamento de fragmentos clonados ou diretamente a partir de PCR.

Considerando o tamanho das sequências obtidas, sete alelos foram identificados (Tabelas 8 e 9). A partir das 19 amostras de *P. malariae*, 4 sequências diferentes foram registradas (A3, A5, A6 e A7) (Tabela 9): A3 (219 aa) foi encontrada em apenas uma amostra (6a); A5 (221 aa) foi encontrada na maioria das amostras (47, 1,2, 4b, 5a, 5b, 6b, 7, 8, 9 12); A6 (224 aa) foi encontrada em apenas uma amostra (4a); e A7 (225 aa) foi encontrada em seis amostras(A, J, I11, 3, 10 e 11). A partir das cinco amostras de *P. brasilianum*, cinco diferentes sequências foram registados (A1, A2, A3, A4 e A5NQ) (Tabela 9). Todas as sequências foram únicas. A sequência obtida a partir da amostra de mosquito foi incluída neste grupo, devido seu tamanho e porque apresentou uma maior

identidade com a sequência encontrada na amostra Peru III (Tabela 10). Em Juitiba, o alelo A5 foi encontrado em amostras coletadas de 2004 a 2007.

4.2.4 Comparação do polimorfismo presente em amostras de Região Amazônica com amostras de Mata Atlântica

Quanto à origem geográfica das amostras humanas e as sequências detectadas, pode-se considerar que o bloco 8 da MSP1 variou pouco nas amostras analisadas. Entretanto, os resultados apresentados na Tabela 8 demonstram que apenas dois alelos foram compartilhados entre as duas regiões geográficas (A3 e A5).

4.2.5 Comparação dos alelos presentes em diferentes hospedeiros

Em relação aos hospedeiros, diferentes sequências foram encontradas nas amostras a partir dos três diferentes hospedeiros. Esses resultados concordam com as análises de microssatélites.

É importante notar que as sequências mais curtas foram obtidas em isolados de símio (173-221 aminoácidos) e amostras de humanos mostraram sequências mais longas (219-225 aminoácidos) (Figura 18 e Tabela 9). A única exceção foi a sequência obtida para a primeira infecção a partir do isolado 6. Se este achado pode indicar uma infecção zoonótica, ainda precisa ser determinado. Do mesmo modo, a sequência obtida para o isolado P182 (A5) foi comumente

encontrada em isolados humanos e pode indicar um caso onde o mosquito transmitiu a infecção do homem para o macaco.

4.2.6 Comparação dos alelos obtidos de isolados envolvidos em duas transmissões transfusionais

Nos dois casos de malária adquiridos por transfusão de sangue previamente relatados (Kirchgatter et al., 2005; Santi et al., 2005), as duas amostras de *P. malariae* obtidas a partir dos doadores mostraram as mesmas sequências de seus receptores. Isto proporciona evidência adicional de que em ambos os casos, o doador e o receptor foram infectados com a mesma cepa, como era de se esperar.

4.2.7 Comparação dos alelos presentes em duas infecções consecutivas de três pacientes

Analizamos também a mudança longitudinal da sequência do bloco 8 da MSP1 nos genomas circulantes de plasmódio em três pacientes assintomáticos não tratados. Um alelo diferente foi encontrado entre os genótipos circulantes em dois casos. No caso do paciente 4, a mudança do alelo de A6 a A5 corresponde a dois aminoácidos substituídos e três aminoácidos excluídos. No caso do paciente 6, o alelo detectado na primeira infecção (A3) foi curiosamente idêntico (embora com um nucleotídeo diferente) ao da amostra Peru III que foi obtida em 1987 a partir de *Saimiri sciureus peruviansis* de Iquitos (Collins et al., 1990). No entanto, na segunda infecção deste paciente o alelo A5YR foi encontrado. *P. malariae* do outro

paciente (paciente 5) manteve a sequência inalterada ao longo de 9 meses. Estes dados são parcialmente compatíveis com os obtidos por análise de microssatélites, quando haplótipos diferentes foram encontrados em ambos os pacientes (Paciente 5 e 6). Os parasitas do paciente 4 não puderam ser analisados longitudinalmente pela metodologia de microssatélites. Embora o resultado seja conflitante para um paciente, sabe-se que esta última técnica permite a análise de seis loci, possibilitando a visualização de um panorama mais preciso sobre a diversidade genética.

4.2.8 Avaliação longitudinal da dinâmica de alelos em foco de malária residual

Assumindo que uma ausência de polimorfismos no bloco 8 da MSP1 reflete a estabilidade também em outros blocos, parece que o mesmo haplótipo de *P. malariae* persistiu cerca de 3 anos em uma população.

Usando o sistema de informações geográficas para localizar as amostras humanas na região de Juquitiba, de acordo com o Sistema de Posicionamento Global (GPS), verificamos que há claramente dois grupos (Figura 11), que são distantes cerca de 3 km. No entanto, os dois alelos mais prevalentes (A5 e A7) foram distribuídos aleatoriamente nos dois grupos.

4.2.9 Avaliação da presença de algum possível marcador para amostras da América do Sul

Surpreendentemente, todas as amostras (com exceção da amostra de mosquito, que tem uma deleção na região) apresentaram um aminoácido glicina na posição 172, que não foi encontrada na amostra de Camarões (MM1) (Tabela 9). A análise de um maior número de amostras da África e da Ásia é importante para determinar se este aminoácido pode ser considerado como um marcador genético para amostras de *P. malariae* / *P. brasilianum* da América do Sul.

4.3 Marcadores moleculares e relacionamento genético entre *P. malariae* e *P. brasilianum*

Este trabalho nunca objetivou mostrar que *P. malariae* e *P. brasilianum* são uma única espécie, pois este fato já foi documentado em estudos anteriores. Assim, é impossível diferenciar infecções de *P. malariae* de infecções de *P. brasilianum*, porque eles podem, de fato, ser uma mesma espécie exibindo um polimorfismo de hospedeiro (Escalante e Ayala, 1994). Foi objetivo deste trabalho, entretanto, analisar a diversidade genética destes parasitas e lançar uma luz sobre o seu relacionamento.

A alta identidade genética encontrada entre *P. malariae* dos seres humanos e *P. brasilianum* de primatas e a recente expansão das populações humanas de *P. malariae* sugerem a ocorrência de transferência recente entre hospedeiros. Essa transferência pode ter ocorrido por meio de um evento único associado a um

“bottleneck”, após a colonização europeia das Américas, no século 16 (Escalante et al., 1995, 1998; Qari et al., 1996), mas não há nenhuma evidência de passagem de humanos para macacos ou vice-versa. A direção da transferência pode ser sugerida pela comparação da diversidade genética dos parasitas humanos e primatas (Tazi e Ayala, 2011). Embora sejam raros os estudos que se concentram sobre esses parasitas, um estudo recente indicou que as cepas de *P. brasilianum* parecem ser mais divergentes que as de *P. malariae* e, portanto, *P. malariae* poderia derivar de *P. brasilianum* (Tazi e Ayala, 2011). Aqui também foi encontrada uma maior diversidade entre os isolados de *P. brasilianum*, o que poderia apoiar esta hipótese.

Entretanto, essa teoria de transferência do parasita de macacos do Novo Mundo para os seres humanos pode ser contestada, uma vez que os sintomas característicos da malária por *P. malariae*, como a febre quartã, foram especificamente registrados na Grécia por Hipócrates, no século IV a.C., e também eram conhecidos no tempo dos romanos na Itália (Boyd, 1949; Russell, 1955), ou seja, antes de qualquer migração de seres humanos do Velho Mundo ao Novo Mundo. Nesta visão, *P. brasilianum* teria naturalmente se adaptado a crescer em macacos após ocupação humana da América do Sul nos últimos 500 anos (Collins e Jeffery, 2007).

Através da análise dos resultados do bloco 8 da msp1, poderíamos suportar essa segunda teoria, de transferência do parasita do homem para o macaco. Considerando o tamanho das sequências, repetições presentes em trechos longos são possivelmente mais velhas do que as repetições em trechos curtos, já que as maiores necessitam de mais tempo para acumular bases (Bell e Jurka, 1997). Nesta teoria, as sequências símias (trechos mais curtos neste trabalho) poderiam ter surgido a partir das sequências humanas (trechos mais longos). Entretanto, devemos ter em mente que a evolução de microssatélites é um processo dinâmico,

durante o qual as repetições podem encolher, bem como expandir, na escala evolutiva (Ellegren, 2004).

Por fim, embora tenhamos analisado novos isolados de *P. brasilianum*, assim como de *P. malariae* e utilizado novos marcadores, como o bloco 8 da *msp1*, acrescentando dados na escassa literatura sobre a genética desses parasitas, análises adicionais são necessárias para gerar mais informação e possibilitar a resolução definitiva da questão da transferência.

5 CONCLUSÕES

P. brasilianum apresentou um maior polimorfismo em relação às amostras de *P. malariae*.

5.1 Microssatélites

Os microssatélites foram úteis para análise do polimorfismo genético de amostras brasileiras, embora sua utilização seja prejudicada em amostras com baixas parasitemias.

P. malariae foi encontrado praticamente conservado em amostras humanas variando apenas em dois loci para todas as amostras analisadas. Amostras de *P. brasilianum*, embora em menor número, apresentaram um polimorfismo maior, variando em quatro loci de microssatélites.

As amostras da Região Amazônica foram mais polimórficas que as amostras de Mata Atlântica.

O haplótipo obtido na amostra do mosquito foi mais similar aos encontrados nas amostras de símios.

As amostras obtidas do doador e do receptor, envolvidos no caso de malária transfusional, apresentaram o mesmo haplótipo.

Em um dos pacientes com infecções consecutivas, o haplótipo manteve-se inalterado após um ano. No outro paciente, o haplótipo variou em apenas um locus.

Um mesmo haplótipo persistiu por pelo menos três anos em foco de malária residual de região de Mata Atlântica.

O alelo Pm09-299 não é um marcador genético para *P. malariae* da América do Sul.

Há uma baixa diversidade alélica entre os isolados brasileiros, quando comparada aos isolados de outras regiões geográficas.

5.2 Proteína de Superfície do Merozoíta 1

Um protocolo de PCR “nested” para amplificação do bloco 8 foi estabelecido, mostrando-se específico e capaz de detectar polimorfismos em amostras brasileiras.

Sete diferentes alelos foram identificados nas amostras brasileiras.

Não foi encontrado dimorfismo alélico para o bloco 8 da *msp1* em isolados brasileiros.

As amostras da Região Amazônica foram mais polimórficas que as amostras de Mata Atlântica.

O polimorfismo genético nas amostras de símios foi maior que o de amostras humanas.

Para cada caso de malária transfusional, as amostras obtidas do doador e do receptor, apresentaram o mesmo alelo.

Em um dos pacientes com infecções consecutivas, o alelo manteve-se inalterado. Nos outros dois pacientes, o alelo variou na segunda infecção.

Um mesmo alelo persistiu por pelo menos três anos em foco de malária residual de região de Mata Atlântica.

O aminoácido G na posição 172 foi encontrado em todos os alelos de isolados brasileiros e também na amostra do Peru.

5.3 Marcadores Moleculares e Relacionamento Genético entre *P. malariae*/*P. brasilianum*

O maior polimorfismo de microssatélites e bloco8/*msp1* em isolados de *P. brasilianum* em relação aos isolados de *P. malariae*, concordam com os dados de estudos anteriores e sinalizam para uma possível direção de transferência do *Plasmodium* do macaco para o homem.

REFERÊNCIAS

Abdurrahman MB, Aikhionbare HA, Babaoye FA, Sathiakumar N, Narayana PT. Clinicopathological features of childhood nephrotic syndrome in northern Nigeria. *Q J Med.* 1990 Jun;75(278):563-76.

Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, Bockarie M, Mokili J, Mharakurwa S, French N, Whitworth J, Velez ID, Brockman AH, Nosten F, Ferreira MU, Day KP. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol.* 2000 Oct;17(10):1467-82.

Albrecht L, Merino EF, Hoffmann EH, Ferreira MU, de Mattos Ferreira RG, Osakabe AL, Dalla Martha RC, Ramharter M, Durham AM, Ferreira JE, del Portillo HA, Wunderlich G. Extense variant gene family repertoire overlap in Western Amazon *Plasmodium falciparum* isolates. *Mol Biochem Parasitol.* 2006 Dec;150(2):157-65.

Arruda ME, Aragaki C, Gagliardi F, Haile RW. A seroprevalence and descriptive epidemiological study of malaria among Indian tribes of the Amazon basin of Brazil. *Ann Trop Med Parasitol.* 1996 Apr;90(2):135-43.

Ayala FJ, Escalante AA, Rich SM. Evolution of *Plasmodium* and the recent origin of the world populations of *Plasmodium falciparum*. *Parassitologia.* 1999 Sep;41(1-3):55-68.

Ayala FJ, Escalante AA, Rich SM. Evolutionary relationships of human malaria parasites. In: Sherman LW (Ed.), *Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis and Protection*. ASM Press, Washington, DC. 1998;pp.285-300.

Babiker HA, Walliker D. Current views on the population structure of *Plasmodium falciparum*: Implications for control. *Parasitol Today.* 1997 Jul;13(7):262-7.

Barker GC. Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002 Apr;96Suppl1:S21-4.

Bell GI, Jurka J. The length distribution of perfect dimer repetitive DNA is consistent with its evolution by an unbiased single-step mutation process. *J Mol Evol.* 1997 Apr;44(4):414-21.

Birkenmeyer L, Muerhoff AS, Dawson GJ, Desai SM. Isolation and Characterization of the MSP1 Genes from *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*. *Am J Trop Med. Hyg.* 2010 Jun;82(6):996-1003.

Boyd MF. Malariology, ed. M. F. Boyd, 3-28. Philadelphia: Saunders; 1949.1643p.

Boyle JS, Lew AM. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. Trends Genet. 1995 Jan;11(1):8.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Publicação: Situação Epidemiológica da Malária no Brasil 2006. Brasília – DF. 2007.[citado 2012 Mai 10] Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2007_w eb.pdf.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Publicação: Situação Epidemiológica da Malária no Brasil 2007. Brasília – DF. 2008. [citad 2012 Maio 10] Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2008 _final .pdf.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Malária in: Guia de vigilância epidemiológica. 7. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

Bray RS, Garnham PC. The life-cycle of primate malaria parasites. Br Med Bull 1982 May;38(2):117-22.

Breman JG, Egan A, Keusch GT. The intolerable burden of malaria: a new look at the numbers. Am J Trop Med Hyg. 2001 Jan-Feb;64(1-2 Suppl):iv-vii.

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

Bruce MC, Macheso A, Galinski MR, Barnwell JW. Characterization and application of multiple genetic markers for *Plasmodium malariae*. Parasitology. 2007 May;134(Pt 5):637-50.

Bruce MC, Macheso A, McConnachie A, Molyneux ME. Comparative population structure of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium falciparum* under different transmission settings in Malawi. Malar J. 2011 Feb 11;10:38.

Bruce-Chwatt LJ. Blood transfusion and tropical disease. Trop Dis Bull. 1972 Sep;69(9):825-62.

Cavasini MT, Ribeiro WL, Kawamoto F, Ferreira MU. How prevalent is *Plasmodium malariae* in Rondonia, Western Brazilian Amazon? Rev Soc Bras Med Trop. 2000 Sep-Oct;33(5):489-92.

Carlton JM, Galinski MR, Barnwell JW, Dame JB. Karyotype and synteny among the chromosomes of all four species of human malaria parasite. Mol Biochem Parasitol. 1999 Jun 25;101(1-2):23-32.

Centers for Disease Control and Prevention-CDC. Malária. [citado 2010 Fev 14] Disponível em: <http://www.cdc.gov/malaria>.

Chambers GK, MacAvoy ES. Microsatellites: consensus and controversy. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2000 Aug;126(4):455-76.

Coantey G, Collins W, Warren M, Contacos P. The primate malarias. Washington; 1972.

Cochrane AH, Barnwell JW, Collins WE, Nussenzweig RS. Monoclonal antibodies produced against sporozoites of the human parasite *Plasmodium malariae* abolish infectivity of sporozoites of the simian parasite *Plasmodium brasilianum*. Infect Immun. 1985 Oct;50(1):58-61.

Cogswell, FB. The Hypnozoite and Relapse in Primate Malaria. Clin Microbiol Rev. 1992 Jan;5(1):26-35.

Collins WE, Contacos P, Guinn EG, Held JR. Infectivity of *Plasmodium brasilianum* for six species of Anopheles. J Parasitol. 1969 Jun;55(3):685-6.

Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium malariae*: parasite and disease. Clin Microbiol Rev. 2007 Oct;20(4):579-92.

Collins WE, Lobel HO, McClure H, Strobert E, Galland GG, Taylor F, Baretto AL, Roberto RR, Skinner JC, Adams S, Morris CL, Sullivan J. The China I/CDC strain of *Plasmodium malariae* in *Aotus* monkeys and chimpanzees. Am J Trop Med Hyg. 1994 Jan;50(1):28-32.

Collins WE, Ruebush TK, Skinner JC, Filipski VK, Broderson JR, Stanfill PS, Morris CL. The Peruvian III strain of *Plasmodium brasilianum* in *Saimiri sciureus boliviensis* monkeys. J Parasitol. 1990 Oct;76(5):676-80.

Collins WE, Skinner JC, Huong AY, Broderson JR, Sutton BB, Mehaffey P. Studies on a newly isolated strain of *Plasmodium brasilianum* in *Aotus* and *Saimiri* monkeys and different anophelines. J Parasitol. 1985 Dec;71(6):767-70.

Curado I, Duarte AM, Lal AA, Oliveira SG, Kloetzel JK. Antibodies anti bloodstream and circumsporozoite antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae*/*P. brasilianum*) in area of very low malaria endemicity in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1997 Mar-Apr;92(2):235-43.

CVE (Centro de Vigilância Epidemiológica). Epidemiological situation of malaria in the State of São Paulo, 2007. BEPA, São Paulo. v.5, n.56. 2008 Aug. [citado 2012 Mai 10] Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa56.htm>.

Dean FB, Hosono S, Fang L, Wu X, Faruqi AF, Brayward P, Sun Z, Zong Q, Du Y, Du J, Driscoll M, Song W, Kingsmore SF, Egholm M, Lasken RS. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Apr 16;99(8):5261-6.

Deane LM. Studies on simian malaria in Brazil. Bull World Health Organ. 1964;31:752-3.

Deane LM. Simian malaria in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992;87 Suppl 3:1-20.

Deane LM, Ferreira Neto JA, Deane SP, Silveira IP. *Anopheles (Kerteszia) cruzi*, a natural vector of the monkey malaria parasites, *Plasmodium simium* and *Plasmodium brasilianum*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1970;64(4):647.

Deane LM. Epidemiology of simian malaria in the American Continent. Hlth. Org., Scientific publ. 1976;317:144-163.

De Arruda M, Nardin HE, Nussenzweig RS, Cochrane AH. Sero-epidemiological studies of malaria in Indian tribes and monkeys of the Amazon Basin of Brazil. Am J Trop Med Hyg. 1989 Oct;41(4):379-85.

del Portillo HA, Longacre S, Khouri E, David PH. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 May 1;88(9):4030-4.

Di Santi SM, Carvalho ME, Costa MJ, Kirchgatter K, Pereira BF, Toniolo CRC, Langui-Jr D, Marret AC. Malária transfusional causada por *Plasmodium malariae* transmitido por doador assintomático infectado na Mata Atlântica do Estado de São Paulo [resumo]. Rev Soc Bras Med Trop 2005;38(supl. 1):333.

Di Santi SM, Kirchgatter K, Brunialti KC, Oliveira AM, Ferreira SR, Boulos M. PCR --based diagnosis to evaluate the performance of malaria reference centers. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2004 Jul-Aug;46(4):183-7.

Dluzewski AR, Ling IT, Hopkins JM, Grainger M, Margos G, Mitchell GH, Holder AA, Bannister LH. Formation of the food vacuole in *Plasmodium falciparum*: a potential role for the 19 kDa fragment of merozoite surface protein 1 (MSP1(19)). *PLoS One*. 2008 Aug 29;3(8):e3085.

dos Santos LC, Curotto SM, de Moraes W, Cubas ZS, Costa-Nascimento MJ, de Barros Filho IR, Biondo AW, Kirchgatter K. Detection of *Plasmodium* sp. in capybara. *Vet Parasitol*. 2009 Jul 7;163(1-2):148-51.

Duarte AM, Malafronte RS, Cerutti C, Curado I, de Paiva BR, Maeda AY, Yamasaki, T, Summa ME, Neves DV, de Oliveira SG, Gomes AC. Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? *Acta Trop*. 2008 Aug;107(2):179-85.

Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet*. 2004 Jun;5(6):435-45.

Emeribe AO, Ejezie GC. Haemoparasites of blood donors in Calabar. *Trop Geogr Med*. 1989 Jan;41(1):61-5

Escalante AA, Ayala FJ . Phylogeny of the malarial genes *Plasmodium*, derived from rRNA gene sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Nov 22;91(24):11373-7.

Escalante AA, Barrio E, Ayala F J. Evolutionary origin of human and primate malarias: evidence from the circumsporozoite protein gene. *Mol Biol Evol*. 1995 Jul;12(4):616-26.

Escalante AA, Freeland DE, Collins WE, Lal AA. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome 1 b from the linear mitochondrial genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jul 7;95(14):8124-9.

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

Fandeur T, Volney B, Peneau C, de Thoisy B. Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum*/*P. malariae* malaria. *Parasitology*. 2000 Jan;120 (Pt 1):11-21.

Ferreira E, Corrêa RR, Tomich A, de Sá FT. Flying range of *Anopheles (Kerteszia) cruzii* and *Anopheles (Kerteszia) bellator* in Guaratuba, coast line of the State of Paraná, Brazil. Rev Bras Malariol Doencas Trop. 1969 Oct-Dec;21(4):819-22..

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

Ferreira MU, Nair S, Hyunh TV, Kawamoto F, Anderson TJ. Microsatellite characterization of *Plasmodium falciparum* from cerebral and uncomplicated malaria patients in southern Vietnam. J Clin Microbiol. 2002 May;40(5):1854-7.

Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 11--Biting activity and blood-seeking parity of *Anopheles (Kerteszia)* in south-eastern Brazil. Rev Saude Publica. 1996 Apr;30(2):107-14.

Garcia LS. Malaria. Clin Lab Med. 2010 Mar;30(1):93-129.

Garnham PCC. Malaria Parasites and Other Haemosporidia. Oxford:Blackwell; 1966.

Garnham PCC, Barker JR, Nesbitt PE. Transmission of *Plasmodium brasilianum* by sporozoites and the discovery of an exo-erythrocytic schizont in the monkey liver. Parasitologia. 1963;5:5-9.

Gilles HM, Warrell DA. Bruce-Chwatt's Essential Malariology. London: Edward Arnold; 1993.

Guerrero IC, Weniger BG, Schultz MG. Transfusion malaria in the United States, 1972-1981. Ann Intern Med. 1983 Aug;99(2):221-6.

Greenwood BM, Bradley AK, Greenwood AM, Byass P, Jammeh L, Marsh K, Tulloch S, Oldfield FST, Hayes R. Mortality and morbidity from malaria among children in a rural area of The Gambia, West Africa. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1987;81(3):478-86.

Greenwood BM, Marsh K, Snow R. Why do some African children develop severe malaria? Parasitol Today. 1991 Oct;7(10):277-81.

Greenwood BM, Targett GA. Malaria vaccines and the new malaria agenda. Clin Microbiol Infect. 2011 Nov;17(11):1600-7.

Hancock JM. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: Goldstein DB, Schlötter C, editors. *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford: Oxford University Press; 1999. p.1-9.

Harris PK, Yeoh S, Dluzewski AR, O'Donnell RA, Withers-Martinez C, Hackett F, Bannister LH, Mitchell GH, Blackman MJ. Molecular identification of a malaria merozoite surface sheddase. *PLoS Pathog*. 2005 Nov;1(3):241-51.

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

Haworth J. The global distribution of malaria and the present control effort. In: Wensdorfer WH, McGregor I. *Malaria – Principle and Practice of Malariology* New York: Churchill Livingstone; 1988. p.1379-1420.

Hoffmann EH, Malafronte RS, Moraes-Avila SL, Osakabe AL, Wunderlich G, Durham AM, Ribolla PE, del Portillo HA, Ferreira MU. Origins of sequence diversity in the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-2 (MSP-2) in Amazonian isolates of *Plasmodium falciparum*. *Gene*. 2006 Jul 19;376(2):224-30.

Hoffmann EH, Ribolla PE, Ferreira MU. Genetic relatedness of *Plasmodium falciparum* isolates and the origin of allelic diversity at the merozoite surface protein-1 (MSP-1) locus in Brazil and Vietnam. *Malar J*. 2003 Jul 23;2:24.

Holder AA. The precursor to major merozoite surface antigens: structure and role in immunity. *Prog Allergy*. 1988;41:72-97.

Holder AA, Blackman MJ, Burghaus PA, Chappel JA, Ling IT, McCallum- Deighton N, Shai S. A malaria merozoite surface protein (MSP1)- structure, processing and function. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992;87 Suppl 3:37-42.

Holder AA, Lockyer MJ, Odink KG, Sandhu JS, Riveros-Moreno V, Nicholls SC, Hillman Y, Davey LS, Tizard MLV, Schwarz RT, Freeman RR. Primary structure of the precursor to the three major surface antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Nature*. 1985 Sep 19-25;317(6034):270-3.

Joy D, Mu J, Su X. Microsatellites markers and population genetics in *Plasmodium falciparum*. In: Waters AP, Jense CJ, editores. *Malaria Parasites: Genomes and Molecular Biology*. Wymondham, United Kingdom: Caister Academic Press; 2004. p.177-186.

Kadekoppala M, Holder AA. Merozoite surface proteins of the malaria parasite: the MSP1 complex and the MSP7 family. *Int J Parasitol*. 2010 Aug 15;40(10):1155-61.

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

Kasehagen LJ, Mueller I, McNamara DT, Bockarie MJ, Kiniboro B, Rare L, Lorry K, Kastens W, Reeder JC, Kazura JW, Zimmerman PA. Changing patterns of *Plasmodium* blood-stage infections in the Wosera region of Papua New Guinea monitored by light microscopy and high throughput PCR diagnosis. Am J Trop Med Hyg. 2006 Oct;75(4):588-96.

Kawamoto F, Liu Q, Ferreira M, Tantular I. How prevalent are *Plasmodium ovale* and *P. malariae* in East Asia? Parasitol Today. 1999 Oct;15(10):422-6.
Kawamoto F, Win TT, Mizuno S, Lin K, Kyaw O, Tantular IS, Mason DP, Kimura M, Wongsrichanalai C. Unusual *Plasmodium malariae*-like parasites in southeast Asia. J Parasitol. 2002 Apr;88(2):350-7.

Kirchgatter K, Nogueira SL, Padilha A, Curado I, Boulos M, Di Santi SM. Lethal malaria caused by *Plasmodium malariae* in an asplenic patient in Brazil. BMJ online 2005. Disponível em: (<http://www.bmj.com/rapid-response/2011/10/31/lethal-malaria-caused-plasmodium-malariae-asplenic-patient-brazil>).

Koussis K, Withers-Martinez C, Yeoh S, Child M, Hackett F, Knuepfer E, Juliano L, Woehlbier U, Bujard H, Blackman MJ. A multifunctional serine protease primes the malaria parasite for red blood cell invasion. EMBO J. 2009 Mar 18;28(6):725-35.

Lal M, Cruz FV, Collins WE, Campebell GH, Procell PM, McCutchan TF. Circumsporozoite protein from *Plasmodium brasilianum*: animal reservoirs of human malaria parasites? J Biol Chem. 1988 Apr 25;263(12):5495-8.

Liu Q, Zhu S, Mizuno S, Kimura M, Liu P, Isomura S, Wang X, Kawamoto F. Sequence variation in the small-subunit rRNA gene of *Plasmodium malariae* and prevalence of isolates with the variant sequence in Sichuan, China. J Clin Microbiol. 1998 Nov;36(11):3378-81.

Martha RC, Tada MS, Ferreira RG, da Silva LH, Wunderlich G. Microsatellite characterization of *Plasmodium falciparum* from symptomatic and non-symptomatic infections from the Western Amazon reveals the existence of non-symptomatic infection-associated genotypes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102:293-8.

Mehlotra RK, Lorry K, Kastens W, Miller SM, Alpers MP, Bockarie M, Kazura JW, Zimmerman PA. Random distribution of mixed species malaria infections in Papua New Guinea. Am J Trop Med Hyg. 2000 Feb;62(2):225-31.

Molineaux L, Grammiccia G. The Garki Project: Research on the Epidemiology and Control of Malaria in the Sudan Savanna of West Africa. Geneva: The World Health Organization; 1980.

Mueller I, Zimmerman PA, Reeder JC. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*—the "bashful" malaria parasites. Trends Parasitol. 2007 Jun;23(6):278-83..

Murray V, Monchawin C, England PR. The determination of the sequences present in the shadow bands of a dinucleotide repeat PCR. Nucleic Acids Res. 1993 May 25;21(10):2395-8.

Murray CJ, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, Fullman N, Naghavi M, Lozano R, Lopez AD. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. Lancet. 2012 Feb 4;379(9814):413-31.

Nacional Research Council. "4 Current Obstacles to Development". Vaccines Against Malaria. Washington, DC: The National Academies Press, 1996. [citado 2012 Fev 14] 1 Print. Disponível em: http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=9027&page=15.

Nahlen BL, Lobel HO, Cannon SE, Campbell CC. Reassessment of blood donor selection criteria for United States travelers to malarious areas. Transfusion. 1991 Nov-Dec;31(9):798-804.

Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. Malar J. 2010 Apr 30;9:115.

Perkins SL, Schall JJ. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. J Parasitol. 2002 Oct;88(5):972-8.

Putaporntip C, Jongwutiwes S, Sakihama N, Ferreira MU, Kho W, Kaneko A, Kanbara H, Hattori T, Tanabe K. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Dec 10;99(25):16348-53.

Qari SH, Shi YP, Pieniazek NJ, Collins WE, Lal AA. Phylogenetic relationship among the malaria parasites based on small subunit rRNA gene sequences: monophyletic nature of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. Mol Phylogenet Evol. 1996 Aug;6(1):157-65.

Razakandrainibe FG, Durand P, Koella JC, De Meeüs T, Rousset F, Ayala FJ, Renaud F. "Clonal" population structure of the malaria agent *Plasmodium falciparum* in high-infection regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov 29;102(48):17388-93.

Rich SM, Ayala FJ. Population structure and recent evolution of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jun 20;97(13):6994-7001.

Rich SM, Ferreira MU, Ayala FJ. The origin of antigenic diversity in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today*. 2000 Sep;16(9):390-6.

Roy SW, Ferreira MU, Hartl DL. Evolution of allelic dimorphism in malarial surface antigens. *Heredity (Edinb)*. 2008 Feb;100(2):103-10.

Rubio JM, Benito A, Roche J, Berzosa PJ, García ML, Micó M, Edú M, Alvar J. Semi-nested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of *Plasmodium vivax* infection in Equatorial Guinea. *Am J Trop Med Hyg*. 1999 Feb;60(2):183-7.

Russell PF. *Man's Mastery of Malaria*. London: Oxford. 1955.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.

Schlötterer C. Genome evolution: Are microsatellites really simple sequences?. *Curr Biol*. 1998 Feb 12;8(4):R132-4.

Schwartz E. *Tropical Diseases in Travellers*. Wiley-Blackwell; 2009. Malaria – Prevention; p 216-2003.

Scopel KK, Fontes CJ, Nunes AC, Horta MF, Braga EM. High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apiacas-Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. *Acta Trop*. 2004 Mar;90(1):61-4.

Scotto G. Aggiornamenti sulla malaria. *Malaria: an update*. *Infez Med*. 2010 Dec;18(4):213-34.

Scuracchio P, Vieira SD, Dourado DA, Bueno LM, Colella R, Ramos-Sanchez EM, Lima GF, Inoue J, Sanchez MC, Di Santi SM. Transfusion-transmitted malaria: case report of asymptomatic donor harboring *Plasmodium malariae*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2011 Jan-Feb;53(1):55-9.

Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Shukri Abdullah M, Abdul Rahman H. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 Apr;60(4):687-92.

Smith T, Beck HP, Kitua A, Mwankusye S, Felger I, Fraser-Hurt N, Irion A, Alonso P, Teuscher T, Tanner M. Age dependence of the multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections and of other malariological indices in an area of high endemicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999 Feb;93 Suppl 1:15-20.

Smith T, Charlwood JD, Kihonda J, Mwankusye S, Billingsley P, Meuwissen J, Lyimo E, Takken W, Teuscher T, Tanner M. Absence of seasonal variation in malaria parasitaemia in an area of intense seasonal transmission. *Acta Trop.* 1993 Jun;54(1):55-72.

Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaitong S, Brown KN. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol.* 1993 Oct;61(2):315-20.

Snounou G, Pinheiro L, Gonçalves A, Fonseca L, Dias F, Brown KN, do Rosario VE. The importance of sensitive detection of malaria parasites in the human and insect hosts in epidemiological studies, as shown by the analysis of field samples from Guinea Bissau. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1993 Nov-Dec;87(6):649-53.

Snow RW, Korenkromp EL, Gouws E. Pediatric mortality in Africa: *Plasmodium falciparum* malaria as a cause or risk. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Aug;71(2 Suppl):16-24.

Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN. Vetores e Doenças – Malária. [citado em 2012 Fev 14] Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/malaria/doenca>.

Tahar R, Ringwald P, Basco LK. Heterogeneity in the circumsporozoite protein gene of *Plasmodium malariae* isolates from sub-Saharan Africa. *Mol Biochem Parasitol.* 1998 Apr 1;92(1):71-8.

Taliaferro WH, Taliaferro LG. Morphology, periodicity and course of infection of *Plasmodium brasilianum* in Panamanian monkeys. *Am J Epidemiol.* 1934;20(1): 1-49

Tanabe K, Escalante A, Sakihama N, Hondac M, Arisue N, Horii T, Culleton R, Hayakawa T, Hashimoto T, Longacre S, Pathirana S, Handunnetti S, Kishino H. Recent independent evolution of msp1 polymorphism in *Plasmodium vivax* and related simian malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol*. 2007 Nov;156(1):74-9.

Tanabe K, Mackay M, Goman M, Scaife JG. Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol*. 1987 May 20;195(2):273-87.

Tapper ML, Armstrong D. Malaria complicating neoplastic disease. *Arch Intern Med*. 1976 Jul;136(7):807-10.

Tazi L, Ayala FJ. Unresolved direction of host transfer of *Plasmodium vivax* v. *P. simium* and *P. malariae* v. *P. brasilianum*. *Infect Genet Evol*. 2011 Jan;11(1):209-21.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 1997 Dec 15;25(24):4876-82.

Tikasingh E, Edwards C, Hamilton PJ, Commissiong LM, Draper CC. 1980. A malaria outbreak due to *Plasmodium malariae* on the Island of Grenada. *Am J Trop Med Hyg*. 1980 Sep;29(5):715-9.

Tolle R , Fruh K , Doumbo O , Koita O , N'Diaye M , Fischer A , Dietz K , Bujard H , 1993 . A prospective study of the association between the human humoral immune response to *Plasmodium falciparum* blood stage antigen gp190 and control of malarial infections. *Infect Immun*. 1993 Jan;61(1):40-7.

Toonen RJ e Hughes S. Increased Throughput for Fragment Analysis on ABI Prism 377 Automated Sequencer Using a Membrane Comb and STRand Software. *Biotechniques*. 2001 Dec;31(6):1320-4.

Trape JF, Rogier C, Konate L, Diagne N, Bouganali H, Canque B, Legros F, Badji A, Ndiaye G, Ndiaye P, Brahimi K, Faye O, Druilhe P, Pereira da Silva L. The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *Am J Trop Med Hyg*. 1994 Aug;51(2):123-37.

Tuteja R. Malaria: an overview. *FEBS J*. 2007 Sep;274(18):4670-9.

van Velthuisen MLF, Florquin S. Glomerulopathy associated with parasitic infections. *Clin Microbiol Rev*. 2000 Jan;13(1):55-66.

Vinetz JM, Li J, McCutchan TF, Kaslow DC. 1998. *Plasmodium malariae* infection in an asymptomatic 74-year-old Greek woman with splenomegaly. N Engl J Med. 1998 Feb 5;338(6):367-71.

Voorham J, van Os N, van der Kaay HJ. 1993. Reappearance of *Plasmodium malariae* in Suriname? Trans R Soc Trop Med Hyg. 1993 May-Jun;87(3):243-4.

Vythilingam I, Noorazian YM, Huat TC, Jiram AI, Yusri YM, Azahari AH, Norparina I, Noorain A, Lokmanhakim S. *Plasmodium knowlesi* in humans, macaques and mosquitoes in peninsular Malaysia. Parasit Vectors. 2008 Aug 19;1(1):26.

Walker-Abbey, A. et al. 2005. Malaria in pregnant Cameroonian women: the effect of age and gravidity on submicroscopic and mixed-species infections and multiple parasite genotypes. Am J Trop Med Hyg. 2005 Mar;72(3):229-35.

WHO. Malaria. [citado 2010 Abr 1] Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>.

Yamasaki T, Duarte AMRC, Curado I, Summa MEL, Neves DVDA, Wunderlich G, Malafronte RS. Detection of etiological agents of malaria in howler monkeys from Atlantic Forests, rescued in regions of São Paulo city, Brazil. J Med Primatol. 2011 Dec;40(6):392-400.

Zhou, M. et al. 1998. High prevalence of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* in malaria patients along the Thai–Myanmar border, as revealed by acridine orange staining and PCR-based diagnoses. Trop Med Int Health. 1998 Apr;3(4):304-12.

APÊNDICES

Apêndice A – Manuscrito: “A diversidade genética de *Plasmodium malariae* e *Plasmodium brasilianum* de hospedeiros humanos, símios e mosquito no Brasil”

The genetic diversity of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium brasilianum* from human, simian and mosquito hosts in Brazil

L.O. Guimarães ^a, M.M. Bajay ^b, G. Wunderlich ^c, M.G. Bueno ^d, F. Röhe ^e, J.L. Catão-Dias ^d, A. Neves ^f, R.S. Malafronte ^{f,g}, I. Curado ^h, K. Kirchgatter ^{a,*}

^a Núcleo de Estudos em Malária, Superintendência de Controle de Endemias/Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 470, São Paulo, SP 05403-000, Brazil

^b Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP 13418-900, Brazil

^c Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP 05508-900, Brazil

^d Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP 05508-270, Brazil

^e Wildlife Conservation Society, Rio de Janeiro, RJ 22461-000, Brazil

^f Laboratório de Protozoologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP 05403-000, Brazil

^g Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP 01246-903, Brazil

^h Laboratório de Imunoepidemiologia, Superintendência de Controle de Endemias, São Paulo, SP 01027-000, Brazil

* Corresponding author. Tel: +55 (11) 3081-8039; fax: +55 (11) 3081-8039.

E-mail address: karink@usp.br (K. Kirchgatter).

Abstract

Plasmodium malariae is a protozoan parasite that causes malaria in humans and is genetically indistinguishable from *P. brasilianum*, a parasite infecting New World monkeys in Central and South America. *P. malariae* has a wide and patchy global distribution in tropical and subtropical regions, being found in South America, Asia, and Africa. However, little is known regarding the genetics of these parasites and the similarity between them could be because until now there are only a very few genomic sequences available from simian *Plasmodium* species. By using microsatellite genotyping, we discovered that of the 14 human samples obtained from areas of the Atlantic forest, 5 different multilocus genotypes were recorded, while in a sample from an infected mosquito from the same region a different haplotype was found. We also analyzed the longitudinal change of circulating plasmodial genomes in two untreated non-symptomatic patients during a 12-months interval. The circulating genotypes in the two samples from the same patient presented nearly identical multilocus haplotypes (differing by a single locus). The more frequent haplotype persisted for almost 3 years in the human population. The allele Pm09-299 described previously as a genetic marker for South American *P. malariae* was not found in our samples. Of the 3 non-human primate samples from the Amazon Region, 3 different multilocus genotypes were recorded indicating a greater diversity among isolates of *P. brasilianum* compared to *P. malariae* and thus, *P. malariae* might in fact derive from *P. brasilianum* as has been proposed in recent studies. Taken together, our data show that based on the microsatellite data there is a relatively restricted polymorphism of *P. malariae* parasites as opposed to other geographic locations.

Keywords: malaria, *Plasmodium malariae*, genetic diversity, microsatellites, Brazil, Atlantic forest.

1. Introduction

The protozoan parasite *Plasmodium malariae* causes malaria in humans and is genetically indistinguishable from *P. brasilianum* which infects New World monkeys from South and Central America. This points to a recent host transfer between humans and monkeys (Escalante et al., 1995, 1998; Qari et al., 1996). *P. malariae* is widely distributed in a patchy pattern and is found throughout tropical regions in Africa, Asia and South America. Little is known about the genetics of these parasites, since studies focusing *P. malariae* and *P. brasilianum* are still scarce and the currently observed similarity between the two species may be simply due to the fact that there are only a very few genomic sequences available from simian *Plasmodium* species. Recently, six polymorphic genetic markers were described for *P. malariae* and the first molecular epidemiological data for this parasite in naturally acquired human infections from Africa and Asia were presented (Bruce et al., 2007, 2011).

In Brazil, *P. malariae* and *P. brasilianum* are encountered in the Amazon Region and also in the Extra Amazon Region (Atlantic forest regions), but in the latter malaria transmission is considered hypoendemic and controlled (Oliveira-Ferreira et al., 2010; Deane 1992). The state of São Paulo is the second state that holds large remaining areas of Atlantic forest (<http://mapas.sosma.org.br/dados/>). This forest has many bromeliads that are an ideal environment for *Anopheles* mosquitoes of the subgenus *Kerteszia*, mainly *An. (K.) cruzii*, that use the axils of these plants as larval habitat (Forattini et al., 1996). In São Paulo state, one of the counties with higher reported incidence of human malaria cases is Juquitiba, which annually records sporadic cases of autochthonous malaria (CVE, 2008). Despite the small number of clinical cases of malaria, a significant part of the population shows

serologic evidence of recent exposure to different variants of *Plasmodium vivax* or *P. malariae* (Curado et al., 1997), suggesting that asymptomatic infections with either species may be frequent. These infections apparently are often overseen because the control programs are based on passive and active search of symptomatic cases.

Our study presents the first molecular epidemiologic data for *P. malariae* and *P. brasilianum* from Brazil obtained from different hosts and uses them to explore the genetic diversity in relation to geographic origin and hosts. For this, we used microsatellite markers and analyzed infected field samples from three different host groups, namely humans, monkeys and mosquito. It is important to keep in mind that our work was not designed to show that *P. malariae* and *P. brasilianum* are close relatives, because this fact has already been documented in previous studies, but to shed a light on the genetic diversity between both species. Considering the recent expansion of *P. malariae* in human populations, the host switch between humans and monkeys might have occurred through a single transfer associated with a bottleneck, after the European colonization of the Americas in the 16th century (Escalante et al., 1995). Therefore, the direction of the host transfer can then be suggested by comparing the genetic diversity of the human and primate parasites (Tazi and Ayala, 2011). Our results indicated a greater diversity among isolates of *P. brasilianum* compared to *P. malariae* and thus, *P. malariae* might derive from *P. brasilianum* as has been proposed in recent studies.

2. Materials and Methods

2.1. Samples

Twenty samples of *P. malariae*/*P. brasilianum* genomic DNA were used in this study (Figure 1, Table 1 and Table 2). Among these, two samples were obtained from patients involved in a case of transfusion malaria: one sample (1) was obtained from a splenectomized patient (58/04) who was infected by blood transfusion and another (2) from her blood donor, an asymptomatic carrier (72/04), which probably acquired the infection in the location of Palestina, Juquitiba (Di Santi et al., 2005). From a previous project, eleven samples (two of which were collected from the same patient at different dates) were used in our study (3-11, Figure 1A). Other available *P. malariae*/*P. brasilianum* samples were also analyzed (Figures 1A and 1B): a *P. malariae* sample (12) obtained from a patient (I11) infected in Iporanga (Atlantic forest region); a *P. malariae* sample (13) obtained from a patient (RBR714) infected in Rio Branco (AC) (Brazilian Amazon Region); a *P. malariae*/*P. brasilianum* sample (M95) obtained from a pool of three *Anopheles Kerteszia cruzii* mosquitoes collected in Itanhaém (Atlantic forest region) and three *P. brasilianum* samples obtained from simian hosts captured in Abunã, approximately 200 km from Porto Velho (RO) (*Callicebus dubius*, sample P169) and Igapó-Açú, approximately 300 km from Manaus (AM) (*Callicebus caligatus*, samples P177 and P182), both located in the Brazilian Amazon. Additionally, a *P. brasilianum* strain from Peru (Peruvian III) was used as a control. In all samples, the presence of *P. malariae*/*P. brasilianum* was confirmed by two PCR protocols and sequencing: (i) a nested PCR based on the amplification of small subunit ribosomal RNA (ssrRNA) using a modification of the technique originally described by Snounou et al. (Snounou et al. 1993; Singh et al. 1999), where the first amplification reaction was modified in order to increase the sensitivity, considering samples with low parasitemia (Dos Santos et al., 2009); and (ii) a nested PCR based on the amplification of the mitochondrial cytochrome b gene (cytb) (Perkins and Schall, 2002).

2.2. Whole-genome amplification and Microsatellite typing

In order to perform a multilocus microsatellite analysis, recovered parasite material was first submitted to WGA (whole-genome amplification), a procedure that increases DNA in a nonspecific way, thus allowing analysis of natural infections with limited sample volumes. For this, 5 µl of the original sample (gDNA) was amplified using REPLI-g Mini Kits (Qiagen, Valencia, CA) according to manufacturer's instructions, yielding 50 µl of template from each reaction. To assess the extent of polymorphism we amplified four microsatellites and two minisatellites using a semi-nested PCR reaction (Bruce et al., 2007). PCR products were separated on a 310 capillary sequencer (Applied Biosystems) without dilution (except of Peruvian III and 1 samples, which were diluted 1/10). Allele sizes were measured by comparison with size standard Gene Scan 500 (Applied Biosystems). The lengths and relative abundance of peak heights in electropherograms were determined using the open-access STRand software (available at: <http://www.vgl.ucdavis.edu/informatics/strand.php>). In this study, the minimal detectable peak height was set to 100 arbitrary fluorescence units (FU) (Havryliuk et al., 2008), to ensure allele recognition in view of very low parasitemias found in *P. malariae* infections, especially in low transmission areas. However, our samples were analyzed in duplicate in independent experiments and the reactions showed neglectable background noise (below 10 FU).

2.3. Data analysis

Arlequin 3.0 software was used to haplotype identification and analysis of molecular variance (AMOVA) (Excoffier et al., 2005). The genetic diversity of the human and non-human parasite populations was examined by calculating the virtual heterozygosity (H_E) of each group, defined as $H_E = [n / (n - 1)][1 - \sum p_i^2]$, where n is the number of isolates analyzed

and p_i is the frequency of the i -th allele in the population. Virtual heterozygosity may be defined, in this context, as the average probability that a pair of alleles randomly obtained from the population is different. Virtual heterozygosity ranges between 0 and 1, with high values (i.e. those close to 1) reflecting high genetic diversity levels of that population.

The standardized index of association (I_A^S) was used to test for evidence of overall multilocus linkage disequilibrium in each parasite population (human and non-human). Data were analyzed with LIAN 3.0 software (Haubold and Hudson, 2000).

We applied the Bayesian clustering model implemented in the STRUCTURE 2.1 software to test whether microsatellite haplotypes clustered according to the host of collection of the isolates (Pritchard et al., 2000). We run the program with seven different K values (from 2 to 8) and computed the posterior probability for each K (Evanno et al., 2005). Here we show the clustering patterns obtained with K value = 2 (human and non-human group) associated with the strongest statistical support.

We used BOTTLENECK 1.2.02 software (Luikart & Cornuet, 1998) to verify whether the population had suffered a population reduction, such as a bottleneck or a founder effect.

2.4. Ethical considerations

Approval of the study protocol was obtained from the Ethical Review Board of the Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo, Brazil (CEPSH 749/2006 and

065/2008). All procedures adopted in this work were approved in a full compliance with specific federal permits issued by the Brazilian Ministry of Environment (SISBIO, process numbers 18861-3 and 24319-3).

3. Results and Discussion

In order to standardize the *P. malariae* microsatellite characterization in our laboratory, we initially analyzed the sample 1 which was from a splenectomized patient with higher parasitemia. The results obtained after PCR amplification of the 6 markers are shown in Table 3. In this work, we include the results of samples for which all 6 loci were available (except for samples 6b and 13, where one and three markers were not amplified, respectively). In addition to the samples shown in Table 1 and 2, many other *P. malariae* samples were also tested but gave negative results in the PCR amplification of the microsatellite markers. These samples, although *P. malariae* positive by nested PCR of the *ssrRNA* (which is repetitive), probably had too small amounts of target DNA, considering that these microsatellite markers are single copy loci. It is important to note that the WGA technique was useful only for samples with higher parasitemias (1 and Peruvian III), since this technique is not able to increase the concentration of target DNA, but only increase the volume available for the reactions. Therefore, it was not possible to amplify all 6 loci in some samples without using the original gDNA sample to complete the analysis. Nevertheless, the definition of the haplotype in some samples was incomplete and unfortunately, these experiments could not be repeated due to insufficient sample amounts. Amplification of some loci and not others from the same sample is not an unusual result since differences in the efficiency of performance of primers used in the analysis is

possible. Importantly, the PCR sensitivity threshold has to be taken in account. This limit has been maximized by concentrating the sample prior to DNA extraction (by a saponin lysis), using a nested PCR protocol and detecting the product by capillary electrophoresis with fluorophores. Therefore, we assume that mixed clone infections were not missed. Moreover, these samples have been studied previously for other targets such as ribosomal and mitochondrial genes and we found only unique sequences for each locus (data not shown).

From the 14 Brazilian human samples from the Atlantic forest (1 to 12), 5 different multilocus genotypes were recorded (Table 3): haplotype 1 (185/342/288/107/220/331) was found in four samples; haplotype 2 (185/342/277/107/220/331) in three samples; haplotype 3 (185/342/277/107/222/331) in two samples; haplotype 4 (185/342/288/107/222/331) in four samples; haplotype 5 (185/342/288/107/Nd/331) in one sample. Haplotype 6 (185/Nd/277/107/Nd/Nd) was found in the Amazon Region sample (13). Haplotype 7 (181/325/277/107/222/331) was found only in the mosquito sample (M95). From the 4 samples obtained from simian hosts, 4 different multilocus genotypes were recorded (Table 3): haplotype 8 (185/325/288/107/222/331), haplotype 9 (177/325/288/100/220/331), haplotype 10 (185/325/277/107/210/331) and haplotype 11 (185/265/277/107/220/331). Multiple alleles were not detected in our samples.

When we tested a mosquito sample, we expected that a recent genetic recombination may have occurred (zygote formation and subsequent meiosis and onset of sporogony). However, only one allele per locus was detected even in this sample, indicating that the examined loci are relatively stable although obviously general data for the stability of loci in

P. malariae/brasilianum are lacking. On the other hand, the chance for seeing mixed-clone infections in mosquitoes is low even for highly endemic regions (Razakandrainibe et al., 2005). In this sense, the observation of an apparently single clone infection in the mosquito sample may be expected.

Using geographic information system to locate the human samples in the region of Juquitiba, we found that there are clearly two groups (data not shown), which are distant about 3 km. However, the five haplotypes obtained in this population were randomly distributed in both groups. This lack of population sub-structuring has also been demonstrated in villages separated by much larger distances (Bruce et al., 2011). Considering that the flying range of *An. (Ker.) cruzii* is about 1 km (Ferreira et al. 1969), in our case, the admixture is likely to be attributable to human movement.

The two samples of *P. malariae* obtained from a blood donor (2) and her recipient (1) involved in a previously reported case of transfusion malaria (Di Santi et al., 2005), showed the same haplotype. This provides further evidence that both were infected with the same strain, as would be expected. Assuming that an absence in polymorphisms in microsatellites reflects stability also in other loci, it seems that the same *P. malariae* haplotype can persist for almost 3 years in a population (see samples 2 and 11). We also analyzed the longitudinal change of circulating plasmodial genomes in two untreated non-symptomatic patients (5 and 6) during a long time interval (12 months). The circulating genotypes in the two samples from the same patient present nearly identical multilocus haplotypes (differing by a single locus).

The allele Pm09-299 described by other authors as a genetic marker for South American *P. malariae* (Bruce et al., 2007) was not found in our samples. Another interesting finding is that the Pm09 marker was described with sizes ranging from 281 to 351 bp (Bruce et al., 2011), however, this marker showed a novel allele size of 265 bp in the Peruvian III strain. To confirm this, this new allele was cloned and sequenced (GenBank HQ677907). This sequence showed two deleted repeat units when compared to the original *P. brasilianum* microsatellite Pm09 sequence (Colombian I/NYU strain) (GenBank DQ787849) (Bruce et al., 2007). The strain of *P. brasilianum* designed Peruvian III was also compared to Peruvian I, already analyzed by other authors (Bruce et al., 2007). Three markers were found in different sizes compared to those described (Table 3). In addition to Pm09, we obtained differences in markers Pm02 and Pm11. Although the two strains had been isolated from monkeys of Iquitos, Peruvian I was obtained in 1983 from *Aotus vociferans* (Collins et al., 1985), while Peruvian III was obtained from *Saimiri sciureus peruviansis* in 1987 (Collins et al., 1990).

It is important to note that Pm34 is a dinucleotide microsatellite marker $[(CA)_n]$ and therefore the estimates of allele frequency for this locus are often confounded by overlapping “shadow” bands (Murray et al., 1993). In this case, in addition to the main PCR product band, shadow bands can be seen 2 bp below the main band. The presence of these shadow bands is especially troublesome if the alleles differ by 2 bp. Thus, the alleles Pm34-220 and Pm34-222 could be considered the same allele. Also, it has been suggested that microsatellite diversity correlates positively repeat array length, as the rate of strand-slippage events that create diversity increases exponentially with repeat array lengths. In

fact in our work the only marker monomorphic for all samples was Pm47, which was described as a (CAATT)⁷ (Bruce et al., 2007), representing very few repeats and would not be expected to be variable. However, the other five markers presented from two to four alleles per locus in our limited population and could be considered good genotyping markers to study the genetic diversity of these parasites.

Allele frequencies were calculated as a proportion of the total number of alleles detected for each locus using Brazilian *P. malariae* human samples showed in the table 1 and were compared with those found in a previous study where samples from Malawi, Gambia and Thailand were analyzed (Bruce et al., 2007). Although the number of samples has been lower in our study (15 versus 52), allelic diversity was more restricted in the Brazilian samples. Different genotypes were recorded in 39 of 52 samples from Malawi/Thailand/Gambia (Bruce et al., 2007) and 6 of 15 human samples from Brazil (this study). The proportion of different genotypes was significantly higher in non-Brazilian samples compared to Brazilian samples ($\chi^2=6.47$, $P<0.05$). Pm02-185 was the only allele found in this locus in our human samples while Pm02-181 was found in the mosquito sample, but these were also the most frequent alleles in Asian and African samples. Similarly, Pm09-342 was the only allele found in this locus in our human samples while Pm09-325 was found in the mosquito sample. Although absent in our human population, the latter was found in more than 80% of the Asian and African samples and in all the Brazilian simian samples (this study). Pm11-288 was found more frequently and Pm11-277 was the second most frequent, but these are also the most frequent alleles in Asian and African samples in an inverse proportion. Pm34-220 and Pm34-222 were found in the same frequencies in Brazilian isolates and are the second and third most frequent in Asian and

African samples. Pm25-107 and Pm47-331, monomorphic in our human population, were the most frequent and the third most frequent in Asian and African samples. This distribution remained unchanged in the recent study carried out only with samples from Malawi (Bruce et al., 2011).

When AMOVA was performed, we found 54.89% of the diversity within groups (human and non-human) and 45.11% among groups. However, diversity indexes in the studied populations range from 0.2218 +/- 0.0668 (human group) to 0.4095 +/- 0.0447 (non-human group) (0.3211 +/- 0.0518 mean H_E). In human samples, other authors have obtained values between 0.236 and 0.811 (Bruce et al., 2007) or 0.192 and 0.849 (Bruce et al., 2011), depending on the *P. malariae* microsatellite locus. Interestingly, we found higher heterozygosity at locus Pm09, which was the one with lowest heterozygosity values in the other two studies (Bruce et al., 2007, 2011).

Significant multilocus linkage disequilibrium (LD) was found in the isolates from human ($I_A^S = 0.2005$, $P < 0.05$) and non-human origin ($I_A^S = 0.0375$, $P < 0.05$), with a mean of $I_A^S = 0.1336$, ($P < 0.05$). The higher LD value obtained for the human group may have some explanations. The parasites from this population may have expanded more recently than the parasites from the non-human population and few mutations could arise and accumulate during this shorter time frame, although a bottleneck effect was not detected in human and non-human groups. This hypothesis agrees with the view that *P. malariae* has derived from *P. brasilianum* (Tazi and Ayala, 2011). Furthermore, the lower transmission rate of the Atlantic forest samples compared to the Amazon Region samples may also explain the higher LD value found in the human group, since the chances of recombination

in this area are certainly low. Lastly, this difference of LD values between human and non-human parasite populations can be related to the vector. Although *An. cruzii* is the principal vector for human and non-human populations in the Atlantic forest (Deane et al. 1970), in the Amazon Region, *An. darlingi* is the major vector for human parasites (Oliveira-Ferreira et al., 2010) but is unlikely to be involved in the transmission of *P. brasilianum* (Lourenço-de-Oliveira & Luz, 1996). In *P. vivax*, different parasite variants were better adapted to a specific vector than others (Joy et al., 2008), but unfortunately, there is no similar study for *P. malariae* or *P. brasilianum*. Moreover, the chromosomal position of the *P. malariae* markers is not known making it not possible to compare physical distance and linkage disequilibrium.

The population structure was evaluated using the Bayesian model-based approach implemented in STRUCTURE software, with the most likely $K = 2$. Figure 2 shows the clustering patterns obtained of *P. malariae*/*P. brasilianum* isolates into human and non-human origins. We represent in the bars the proportion of these two inferred genetic subpopulations (represented by colors) for each of the host populations. Each host population showed heterogeneity with one distinct predominant genetic subpopulation.

The high genetic identity found between *P. malariae* from humans and *P. brasilianum* from primates suggests the occurrence of recent transfers between hosts (Escalante et al., 1995, 1998; Qari et al., 1996), but there is no evidence that the transfers were from humans to monkeys or vice versa. Although studies that focus on these species are rare, a recent study indicate that *P. brasilianum* strains seem to be more divergent than *P. malariae* and thus, *P. malariae* might in fact derive from *P. brasilianum* (Tazi and Ayala, 2011). Here we also

found a greater diversity among isolates of *P. brasilianum*, however, one of the markers was monomorphic and the number of samples was limited. Moreover, this hypothesis of transfer of the parasite from New World monkeys to humans may not be plausible, since the characteristic symptoms of *P. malariae* malaria, like quartan fever, were specifically recorded in Greece by Hippocrates in the 4th century B.C. and were also known in Roman times in Italy (Boyd, 1949; Russell, 1955), this is, before any migration of humans from the Old World to the New World. Thus, *P. brasilianum* would have naturally adapted to grow in monkeys following human settlement of South America within the last 500 years (Collins and Jeffery, 2007). By all terms, it is impossible to differentiate infections of *P. malariae* from infections of *P. brasilianum* because they may, in fact, be one and the same exhibiting “host polymorphism” (Escalante and Ayala, 1994).

It may be assumed that diversity and multiplicity of *P. falciparum* infection increase as transmission frequency increases (reviewed by Babiker and Walliker, 1997). We detected low allelic diversity in the Brazilian isolates that reflects a very low transmission rate. It is known that *P. malariae* has a reduced growth rate (Gilles and Warrell, 1993) and the low parasitemias are possibly caused by its preference for mature erythrocytes (Garnham, 1966). *P. malariae* is also known to produce infections which are frequently non-symptomatic and long-lasting (up to 40 years in the absence of re-infection) (Vinetz et al., 1998). It is also possible that the infection with exclusively *P. malariae* explains the very low transmission rates found in the study area. In other locations where *P. malariae* occurs in co-infections mainly with *P. falciparum*, *P. malariae* developed means of increased transmission efficiency in the presence of a co-infecting parasite of another species (Bruce et al., 2011).

In summary, *P. malariae* was found practically conserved in human samples varying only in two loci for all samples analyzed independently of their geographical origin. The data may have been partial given that only one sample from the Amazon Region was available. On the other hand, in relation to the hosts, different haplotypes were found in the samples from the three different host groups. However, the lack of evidence of geographical clustering of haplotypes may be due to the available small sample number. The further analysis of Brazilian samples from different geographical origin will be important to characterize the epidemiology of Brazilian *P. malariae* isolates. It will be interesting to compare human and simian isolates of *P. malariae* and *P. brasilianum* in areas of Atlantic forest where humans and simians are subject to infection transmitted by the same anopheline vectors. This circumstance possibly permits the frequent contact of simian derived *Plasmodium* and humans and vice versa.

Acknowledgments

We are grateful to Prof^a Luzia Helena Carvalho (Laboratório de Malária, Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ) for the provision of *P. brasilianum* (Peruvian III strain) and to Ricardo Luiz Dantas Machado (Centro de Investigação de Microrganismos, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP) for the provision of *P. malariae* (RBR714 isolate). We are also grateful to Prof Luis Fabio Silveira (Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo) for the provision of P169 sample. This research was funded by CNPq (475727/2007-0 - Edital Universal) to Karin Kirchgatter. Lilian de Oliveira Guimarães has a CAPES scholarship.

References

- Babiker, H.A., Walliker, D., 1997. Current views on the population structure of *Plasmodium falciparum*: Implications for control. *Parasitol. Today* 13, 262-267.
- Boyd, M. F. 1949. *Malariology*, ed. M. F. Boyd, 3-28. Philadelphia: Saunders. 2 vols. 1643 pp.
- Bruce, M.C., Macheso, A., Galinski, M.R., Barnwell, J.W., 2007. Characterization and application of multiple genetic markers for *Plasmodium malariae*. *Parasitology* 134, 637-650.
- Bruce, M.C., Macheso, A., McConnachie, A., Molyneux, M.E., 2011. Comparative population structure of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium falciparum* under different transmission settings in Malawi. *Malar. J.* 10, 38.
- Collins, W.E., Jeffery, G.M., 2007. *Plasmodium malariae*: parasite and disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 579-592.
- Collins, W.E., Ruebush, T.K. 2nd, Skinner, J.C., Filipski, V.K., Broderson, J.R., Stanfill, P.S., Morris, C.L., 1990. The Peruvian III strain of *Plasmodium brasilianum* in *Saimiri sciureus boliviensis* monkeys. *J. Parasitol.* 76, 676-680.
- Collins, W.E., Skinner, J.C., Huong, A.Y., Broderson, J.R., Sutton, B.B., Mehaffey, P., 1985. Studies on a newly isolated strain of *Plasmodium brasilianum* in *Aotus* and *Saimiri* monkeys and different anophelines. *J. Parasitol.* 71, 767-770.
- Curado, I., Duarte, A.M., Lal, A.A., Oliveira, S.G., Kloetzel, J.K., 1997. Antibodies anti bloodstream and circumsporozoite antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium*

malariae/*P. brasilianum*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 92, 235-243.

CVE (Centro de Vigilância Epidemiológica), 2008. Epidemiological situation of malaria in the State of São Paulo, 2007. BEPA, São Paulo. v.5, n.56. Aug. Available on: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa56.htm>.

Deane, L.M., 1992. Simian malaria in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 87 (S3), 1-20.

Deane, L.M., Ferreira Neto, J.A., Deane, S.P., Silveira, I.P., 1970. *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, a natural vector of the monkey malaria parasites, *Plasmodium simium* and *Plasmodium brasilianum*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 64, 647.

Di Santi, S.M.F., Carvalho, M.E., Costa, M.J., Kirchgatter, K., Pereira, B.F., Toniolo, C.R.C., Langui, D., Marret, A.C., 2005. Malária transfusional causada por *Plasmodium malariae* transmitido por doador assintomático infectado na Mata Atlântica do Estado de São Paulo [abstract]. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 38, 333.

dos Santos, L.C., Curotto, S.M., de Moraes, W., Cubas, Z.S., Costa-Nascimento, M.J., de Barros Filho, I.R., Biondo, A.W., Kirchgatter, K., 2009. Detection of *Plasmodium* sp. in capybara. Vet. Parasitol. 163, 148-151.

Escalante, A.A., Ayala, F.J., 1994. Phylogeny of the malarial genus *Plasmodium*, derived from rRNA gene sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 11373-11377.

Escalante, A.A., Barrio, E., Ayala, F.J., 1995. Evolutionary origin of human and primate malarias: evidence from the circumsporozoite protein gene. Mol. Biol. Evol. 12, 616-626.

- Escalante, A.A., Freeland, D.E., Collins, W.E., Lal, A.A., 1998. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 8124–8129.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611-2620.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1, 47-50.
- Ferreira, E., Corrêa, R.R., Tomich, A., de Sá, F.T., 1969. Flying range of *Anopheles (Kerteszia) cruzii* and *Anopheles (Kerteszia) bellator* in Guaratuba, coast line of the State of Paraná, Brazil. *Rev. Bras. Malariol. Doencas Trop.* 21, 819-822.
- Forattini, O.P., Kakitani, I., Massad, E., Marucci, D., 1996. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 11--Biting activity and blood-seeking parity of *Anopheles (Kerteszia)* in south-eastern Brazil. *Rev. Saude Publica* 30, 107-114.
- Garnham, P.C.C., 1966. *Malaria Parasites and Other Haemosporidia*. Blackwell, Oxford.
- Gilles, H.M., Warrell, D.A., 1993. *Bruce-Chwatt's Essential Malariology*. Edward Arnold, London.
- Haubold, B., Hudson, R.R., 2000. LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. *Linkage Analysis. Bioinformatics.* 16, 847-848.
- Havryliuk, T., Orjuela-Sánchez, P., Ferreira, M.U., 2008. *Plasmodium vivax*: microsatellite analysis of multiple-clone infections. *Exp. Parasitol.* 120, 330-336.
- Joy, D.A., Gonzalez-Ceron, L., Carlton, J.M., Gueye, A., Fay, M., McCutchan, T.F., Su, X.Z., 2008. Local adaptation and vector-mediated population structure in *Plasmodium vivax*

malaria. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1245–1252.

Lourenço-de-Oliveira, R., Luz, S.L., 1996. Simian malaria at two sites in the Brazilian Amazon. II. Vertical distribution and frequency of anopheline species inside and outside the forest. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 687-694.

Luikart, G., Cornuet, J.M., 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conserv. Biol.* 12, 228–237.

Murray, V., Monchawin, C., England, P.R., 1993. The determination of the sequences present in the shadow bands of a dinucleotide repeat PCR. *Nucleic Acid Res.* 21, 2395–2398.

Oliveira-Ferreira, J., Lacerda, M.V., Brasil, P., Ladislau, J.L., Tauil, P.L., Daniel-Ribeiro, C.T., 2010. Malaria in Brazil: an overview. *Malar. J.* 9, 115.

Perkins, S.L., Schall, J.J., 2002. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. *J. Parasitol.* 88, 972–978.

Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.

Qari, S.H., Shi, Y.P., Pieniazek, N.J., Collins, W.E., Lal, A.A., 1996. Phylogenetic relationship among the malaria parasites based on small subunit rRNA gene sequences: monophyletic nature of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 6, 157–165.

Razakandrainibe, F.G., Durand, P., Koella, J.C., De Meeüs, T., Rousset, F., Ayala, F.J., Renaud, F., 2005. "Clonal" population structure of the malaria agent *Plasmodium falciparum* in high-infection regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17388-17393.

Russell, P. F. 1955. *Man's Mastery of Malaria*. London: Oxford. 308 pp.

- Singh, B., Bobogare, A., Cox-Singh, J., Snounou, G., Shukri Abdullah, M., Abdul Rahman, H., 1999. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60, 687–692.
- Snounou, G., Viriyakosol, S., Zhu, X.P., Jarra, W., Pinheiro, L., Rosário, V.E., Thaithong, S., Brown, K.N., 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61, 315–320.
- Tazi, L., Ayala, F.J., 2011. Unresolved direction of host transfer of *Plasmodium vivax* v. *P. simium* and *P. malariae* v. *P. brasilianum*. *Infect. Genet. Evol.* 11, 209–221.
- Vinetz, J.M., Li, J., McCutchan, T.F., Kaslow, D.C., 1998. *Plasmodium malariae* infection in an asymptomatic 74-year-old Greek woman with splenomegaly. *N. Engl. J. Med.* 338, 367–371.

Legend to Figure 1

Origins of Brazilian *P. malariae*/*P. brasilianum* samples used in the study. A. From São Paulo state: human samples from a splenectomized patient who was infected by blood transfusion (1), Juquitiba (2 to 11) and Iporanga (12); mosquito sample from Itanhaém (M95). B. From the Brazilian Amazon Region: human sample from Acre (13) and samples from simian hosts captured in Rondônia (P169) and Amazonas (P177 and P182). Modified from Google5 Earth and Wikimedia Commons

Legend to Figure 2

Population structure of *Plasmodium malariae*/*Plasmodium brasilianum* plotted in a single line according to host (Human or Non-human) inferred from microsatellite typing of 21 isolates at K = 2. Isolates are numbered as described in Table 1 and Table 2.

Table 1. Human samples used in this study.

Sample	Collection date (dd/mm/yyyy)	Source	Origin
1	22/09/2004	Patient 58/04	São Paulo, SP (Blood transfusion from Patient 72/04)
2	08/12/2004	Patient 72/04	Juquitiba, SP, Atlantic Forest, BR
3	19/08/2005	Patient PPP23	Juquitiba, SP, Atlantic Forest, BR
4	17/02/2006	Patient PPP16	Juquitiba, SP, Atlantic Forest, BR
5a	23/06/2005	Patient PPP62	Juquitiba, SP, Atlantic Forest, BR
5b	30/03/2006		Juquitiba, SP, Atlantic Forest, BR
6a	19/04/2006	Patient PPP190	Juquitiba, SP, Atlantic Forest, BR
6b	24/05/2007		Juquitiba, SP, Atlantic Forest, BR
7	10/08/2006	Patient PPP68	Juquitiba, SP, Atlantic Forest, BR
8	24/05/2007	Patient PPP194	Juquitiba, SP, Atlantic Forest, BR
9	27/06/2007	Patient PPP222	Juquitiba, SP, Atlantic Forest, BR
10	30/08/2007	Patient PPP157	Juquitiba, SP, Atlantic Forest, BR
11	19/04/2007	Patient PPP328	Juquitiba, SP, Atlantic Forest, BR
12	xx/01/2002	Patient I11	Iporanga, SP, Atlantic Forest, BR
13	09/07/2004	Patient RBR714	Rio Branco, AC, Amazon Region, BR

SP = São Paulo state; AC = Acre state; BR = Brazil.

Table 2. Non-human samples used in this study.

Sample	Collection date (dd/mm/yyyy)	Source	Origin
M95	26/05/2010	<i>Anopheles (K.) cruzii</i>	Itanhaém, SP, Atlantic Forest, BR
P169	31/03/2010	<i>Callicebus dubius</i>	Porto Velho, RO, Amazon Region, BR
P177	06/02/2011	<i>Callicebus caligatus</i>	Manaus, AM, Amazon Region, BR
P182	07/02/2011	<i>Callicebus caligatus</i>	Manaus, AM, Amazon Region, BR
Peru III	xx/xx/1987	<i>Saimiri sciureus</i> <i>peruviansis</i>	Iquitos, Peru
Peru I*	xx/xx/1983	<i>Aotus vociferans</i>	Iquitos, Peru

SP = São Paulo state; RO = Rondônia state; AM = Amazonas state; BR = Brazil.

* from Bruce et al., 2007.

Table 3. Microsatellite markers from the samples shown in table 1.

Group	Sample	Pm02	Pm09	Pm11	Pm25	Pm34	Pm47	Haplotype
Human	1	185	342	288	107	220	331	1
	2	185	342	288	107	220	331	1
	3	185	342	277	107	220	331	2
	4	185	342	288	107	220	331	1
	5a	185	342	277	107	222	331	3
	5b	185	342	288	107	222	331	4
	6a	185	342	288	107	222	331	4
	6b	185	342	288	107	Nd ^a	331	5
	7	185	342	277	107	222	331	3
	8	185	342	288	107	222	331	4
	9	185	342	288	107	222	331	4
	10	185	342	277	107	220	331	2
	11	185	342	288	107	220	331	1
	12	185	342	277	107	220	331	2
	13	185	Nd ^a	277	107	Nd ^a	Nd ^a	6
Non-human	M95	181	325	277	107	222	331	7
	P169	185	325	288	107	222	331	8
	P177	177	325	288	100	220	331	9
	P182	185	325	277	107	210	331	10
	Peruvian III	185	265	277	107	220	331	11
	Peruvian I ^b	181	299	288	107	220	331	12

^a Nd means that no readable signal was obtained after at least two repetitions.

^b from Bruce et al., 2007.

Apêndice B – Manuscrito: “Diversidade genética no Bloco 8 da Proteína de Superfície do Merozoíta 1 de *Plasmodium malariae* e *Plasmodium brasilianum*”

Genetic diversity in the block 8 region of the merozoite surface protein-1 of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium brasilianum* in Brazil

L.O. Guimarães ^a, G. Wunderlich ^b, M.G. Bueno ^c, F. Röhe ^d, J.L. Catão-Dias ^c, A. Neves ^e, R.S. Malafronte ^{e,f}, I. Curado ^g, K. Kirchgatter ^{a,*}

^a Núcleo de Estudos em Malária, Superintendência de Controle de Endemias/Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 470, São Paulo, SP 05403-000, Brazil

^b Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP 05508-900, Brazil

^c Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP 05508-270, Brazil

^d Wildlife Conservation Society, Rio de Janeiro, RJ 22461-000, Brazil

^e Laboratório de Protozoologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP 05403-000, Brazil

^f Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP 01246-903, Brazil

^g Laboratório de Imunoepidemiologia, Superintendência de Controle de Endemias, São Paulo, SP 01027-000, Brazil

* Corresponding author. Tel: +55 (11) 3081-8039; fax: +55 (11) 3081-8039.

E-mail address: karink@usp.br (K. Kirchgatter).

Abstract

The protozoan parasite *Plasmodium malariae* causes malaria in humans and genetically it is indistinguishable from *P. brasilianum*, a parasite known to infect New World monkeys in Central and South America. *P. malariae* shows widespread, uneven distribution in tropical and subtropical regions throughout South America, Asia, and Africa. Recently, the merozoite surface protein 1 (MSP1) gene was completely sequenced in a *P. malariae* isolate. It encodes the major surface antigen of invasive forms of the erythrocytic stages of *Plasmodium* which has been proposed as a candidate for a vaccine antigen against malaria. Here, we present the results of the first study of genetic diversity in MSP1 of *P. malariae* and *P. brasilianum* from Brazil. The isolates were obtained from different hosts and the sequence data were explored in relation to geographical origin and hosts, aiming to give insights into the evolutionary and phylogenetic relationships of these parasites. By using the block 8 region of the MSP1, we discovered that of the 19 Brazilian human samples, 4 different alleles were recorded. We also analyzed the longitudinal change of circulating plasmodial MSP1 in three untreated non-symptomatic patients. In two cases, different alleles were found in the two sequential samples from one patient. *P. malariae* from the other patient maintained its MSP1 haplotype unchanged. The most frequently found haplotype (allele 5) persisted for 7 years in the human population. In a sample from an infected mosquito, a different and minor allele was found. From the three nonhuman primate samples collected in the Amazon Region, we were able to identify three genotypes, indicating greater diversity among *P. brasilianum* isolates compared with *P. malariae*. Our data also show that there is a likely absence of allelic dimorphism of MSP1 from these parasites as opposed to other *Plasmodium* species.

Keywords: malaria, *Plasmodium malariae*, genetic diversity, merozoite surface protein 1, Brazil, Atlantic forest.

1. Introduction

The merozoite surface protein 1 (MSP1) is the major surface antigen of invasive forms of the erythrocytic stages of *Plasmodium* and has been proposed as a vaccine antigen against malaria (Greenwood and Targett, 2011). However, both in *P. falciparum* in *P. vivax*, an extensive polymorphism of this protein were found in different geographical areas, representing a major obstacle to the development of an effective vaccine (Kadekoppala & Holder, 2010; Brito & Ferreira, 2011). Although the sequences from *P. falciparum* and *P. vivax* MSP1 genes have been described long time ago (Holder et al., 1985; del Portillo et al., 1991), *msp1* genes were only recently identified in *P. malariae* and *P. ovale* (Birkenmeyer et al., 2010), two other parasites causing malaria in humans.

Although still without supporting complete genome data, *Plasmodium malariae* appears to be genetically indistinguishable from *P. brasilianum* which infects New World monkeys. This points to a recent host transfer between humans and monkeys (Escalante et al., 1995, 1998; Qari et al., 1996). *P. malariae* is widely, though unevenly distributed and has been identified throughout tropical regions in Africa, Asia and South America, while *P. brasilianum* has been reported in South and Central America. In Brazil, *P. malariae* and *P. brasilianum* is sparsely distributed in the Amazon Region and also in extra Amazonian Atlantic forest regions, where malaria transmission is considered hypoendemic and controlled (Deane 1992; Oliveira-Ferreira et al., 2010). In this regard, São Paulo is the state that holds one of the largest remaining areas of Atlantic forest (<http://mapas.sosma.org.br/dados/>). This tropical rainforest has an ample diversity of bromeliads that are an ideal environment for *Anopheles* mosquitoes of the subgenus

Kerteszia, mainly *An. (K.) cruzii*, which use the axils of these plants as larval habitat (Forattini et al., 1996). In São Paulo state, the county of Juquitiba reports yearly a number of human malaria cases, which are all autochthonous (CVE, 2008). Although only a small number of clinical cases of malaria are registered, an large portion of the population shows serological evidence of recent exposure to variants of *P. vivax* or *P. malariae* (Curado et al., 1997), suggesting high prevalence of asymptomatic infection, which is often missed or underestimated because control programs are focused on passive and active investigation of symptomatic cases.

The single copy *msp1* gene in the so far sequenced *Plasmodium* species is divided into 17 blocks, based on analysis of interspecies sequence diversity: seven highly variable blocks are interspersed with ten conserved regions (Tanabe et al., 1987). The only study of identity analysis between *P. malariae* and *P. brasilianum msp1* sequences was performed using the block 2 region and showed that *P. brasilianum* displayed limited polymorphism in French Guiana (Fandeur et al., 2000). In our study the genetic polymorphism of another variable region of *msp1* gene (Block 8) was analyzed between field isolates collected in Brazil. This block has been chosen because it has imperfect repeats (Birkenmeyer et al., 2010), which facilitate recombination events and thus may be an informative genetic marker. Moreover, this region proved to be the most polymorphic one in many studies with *P. falciparum* (Tanabe et al., 1987; Rich and Ayala, 2000; rev. in Rich et al., 2000) and *P. vivax* (Brito & Ferreira, 2011). This work presents the first molecular epidemiological data based on the *msp1*/block 8 region for *P. malariae*/ *P. brasilianum* from Brazil that was obtained from different hosts. This data was used to examine genetic diversity in relation to geographic origin and hosts.

2. Materials and Methods

2.1. Samples

Twenty-four specimens of *P. malariae*/*P. brasilianum* genomic DNA were used in this study (Table 1). Of these, four were obtained from four individuals involved in two cases of transfusion malaria: two samples were obtained from two splenectomized patients infected by blood transfusion and two others from their blood donors, two asymptomatic carriers, who likely acquired the infection in the towns of Juquitiba (Di Santi et al., 2005) and Iguape (Kirchgatter et al., 2005). Thirteen samples used in this study were from a previous project by our group, including three patients who were submitted to a second collection. Other samples were also analyzed: a *P. malariae* sample obtained from an individual infected in Iporanga (Atlantic forest region); another *P. malariae* sample obtained from a patient infected in Tomé-Açu (PA) (Brazilian Amazon Region); a pooled *P. malariae*/*P. brasilianum* sample obtained from three *Anopheles Kerteszia cruzii* mosquitoes collected in Itanhaém (Atlantic forest region) and three *P. brasilianum* samples obtained from simian hosts captured in Igapó-Açu, roughly 300 km from Manaus (AM) (*Callicebus caligatus*) and Abunã, roughly 200 km from Porto Velho (RO) (*Callicebus dubius*), both located in the Brazilian Amazon. A *P. brasilianum* strain from Peru was used as control. For all the samples collected, the presence of *P. malariae*/*P. brasilianum* was verified using two PCR protocols and sequencing: (i) a nested PCR amplifying a small subunit ribosomal RNA (ssrRNA) based on the technique originally described by Snounou et al. (Snounou et al. 1993; Singh et al. 1999), in which the first amplification reaction was modified in order to increase its sensitivity, due to low parasitemia samples (Dos Santos et al., 2009); and (ii) a nested PCR amplifying the mitochondrial cytochrome b gene (cytb) (Perkins & Schall, 2002).

2.2. Design of PmMSP1-Block 8 specific primers

Oligonucleotides PMP5F (5' CCA TAC TAT TTA ATT GCA CTA AAG 3') and PMP5R (5' ACA CAC ATA AGC AGT TTT CAA AAA G 3') were designed based on the only sequence available for *P. malariae* (MM1A isolate from Cameroon, GenBank #FJ824669; Birkenmeyer et al., 2010). These primers were chosen because they were located in islands of conserved sequences flanking the Block 8, where the imperfect repeats are located. This analysis was done by alignment using *Plasmodium* sequences from different species available from GenBank (available upon request). Internal primers from the first pair (PMP5F2: 5' AGG GAA ATT GAT AAA TTA AAT ATT TC 3' and PMP5R2: 5' CTT TTC AAG ATA TTG CAA TTT GGA 3') were also designed. This latter oligonucleotide pair was used in a nested protocol in order to increase the sensitivity of detection, since our samples (and usually the *P. malariae* or *P. brasilianum* infections) present very low parasitemias which are undetectable even in thick blood smears. All the oligonucleotides were checked for specificity by using Primer-BLAST provided by National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). By PCR, these oligonucleotides were also specific for *P. malariae*/*P. brasilianum* DNA, since experiments showed no amplification in DNAs from other *Plasmodium* species or hosts (data not shown).

2.3. Amplification and sequencing of the PmMSP1-Block8.

In the first amplification reaction (nested1), primers PMP5F and PMP5R were used, resulting in an amplicon of about ~700bp. The nested2 amplification was performed with primers PMP5F2 and PMP5R2 in order to obtain a ~600bp product. Each 25 µl reaction

mixture for nested1 amplifications contained 5 µl of DNA template, 250 nM of each primer (PMP5F and PMP5R), 2 mM MgCl₂, PCR buffer (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.8), 0.125 mM each of dATP, dCTP, dGTP, dTTP, and 0.5 units of Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen). Nested1 amplification conditions were as follows: step 1, 94°C for 5 min; step 2, denaturation at 94°C for 60 sec; step 3, annealing at 58°C for 2 min; step 4, extension at 72°C for 2 min; repeat steps 2–4 25 times, and step 5, 72°C for 5 min. One microliter of the nested1 amplification product served as the DNA template for each of the 25 µl nested2 amplifications. The concentration of the nested2 primers and other constituents were identical to nested1 amplifications as well as nested2 amplification conditions except that the steps 2–4 were repeated 30 times. The PCR products of nested2 amplifications were submitted to electrophoresis in 1% agarose gel stained with 5 x 10⁵ diluted GelRed nucleic acid stain (Biotium, Hayward, CA, USA). The PCR fragment was purified, cloned in pGEM-T Easy Vector (Promega) and positive clones were sequenced using Big Dye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Kit in an ABI Genetic Analyzer (ABI, USA). The sequences obtained were aligned with the published *P. malariae msp1* sequence (FJ824669) using Clustal X version 1.81.

2.4. Ethical considerations

The study protocol was approved by the Research Ethics Committee of the Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo, Brazil (CEPSH 749/2006 and 065/2008). All the procedures adopted in this work fully complied with specific federal permits issued by the Brazilian Ministry of the Environment (SISBIO, process numbers 18861-3 and 24319-3).

3. Results and Discussion

Amplification of MSP1 (Block 8) from P. malariae/P. brasilianum isolates

In addition to the samples presented in Table 1, other *P. malariae* specimens were also tested, but proved negative for PCR amplification of the *msp1* gene. The quantity of target DNA was most likely too small in these samples, even though *P. malariae* by nested PCR of the *ssrRNA* (which is repetitive) was positive, considering that *msp1* is a probably a single copy gene in *P. malariae*, similar to other *Plasmodium* species.

Sequencing of the MSP1 fragments

A first result of this study was the absence of allelic dimorphism in our sequences. Although we initially expected dimorphism due to the bands of basically two different sizes visualized after PCRs (Figure 1), only one allelic group sequences were found after cloning and sequencing. The most different sized sequence was obtained from the mosquito sample. In comparison to the other six alleles found (Table 1 and 2), it presented a region with a large deletion (about a third of the amplified sequence) (Table 2), but was highly conserved in the other two thirds (Table 3). The analysis of the similarity percentage between the amino acids sequences from all seven alleles (excluding the region of deletion found in A1) showed identities ranging from 89 to 100% (Table 3). Interestingly, the comparable region in *P. falciparum* versions of the gene showed only 10% of identity between certain allelic groups (Tanabe et al., 1987). The lowest percentage of identity (89%) was found between A2 and A7 alleles, obtained from simian and human samples, respectively. Similar results were found in another region of the *msp1* gene (block 2), that showed a polymorphism more limited with identities from 93 to 100% between *P. malariae* and *P. brasilianum*

sequences from French Guiana (Fandeur et al., 2000). Given the fact that the analyzed block is the most polymorphic one in either *P. vivax* and *P. falciparum* and we were unable to detect additional alleles (despite of finding nucleotide polymorphisms), we hypothesize that *P. malariae* perhaps does not show allelic dimorphism in *msp1* genes, as opposed to other *Plasmodium* species (Tanabe et al., 1987; rev. in Roy et al., 2008). Another possibility would be the presence of sequence differences between alleles so accentuated that our oligonucleotides were unable to amplify them. In any case, either the domain architecture is fundamentally different between *P. malariae* and other *Plasmodium* species analyzed so far or *P. malariae* indeed have no dimorphic *msp1* genes which would be inherited among all *Plasmodium* species studied so far.

Blood stages of *Plasmodium* are haploid and the detection of multiple sequences in a human or simian sample indicates the presence of multiple genotypes. We also tested a sample from a mosquito, where the *Plasmodium* stages can be haploid (sporozoites) or diploid (ookinete and oocyst). However, multiple sequences were not detected, indicating clonal infections or infections with highly similar genotypes. These results were obtained with sequencing of either cloned fragments or directly from PCR.

Distribution of alleles from the MSP1-Block 8 region

Considering the size of the sequences obtained, seven alleles were identified (Tables 1 and 2). All the alleles were different from the only sequence available in GenBank (#FJ824669), which was obtained from a Cameroonian isolate (Table 2). From the 19 *P. malariae* samples, 4 different sequences were recorded (A3, A5, A6 and A7) (Table 1): A3 (219 aa)

was found in only one sample (6a); A5 (221 aa) was found in the majority of samples; A6 (224 aa) was found in only one sample; and A7 (225 aa) was found in six samples. From the 5 *P. brasilianum* samples, 5 different sequences were recorded (A1, A2, A3, A4 and A5NQ) (Table 2). All sequences from simian hosts were unique. The sequence obtained from the mosquito sample was included in this group due the size and because it presented a higher identity with the sequence found in the Peru III sample (Table 3). In Juititaba, the A5 allele was found in samples collected from 2004 to 2007. Thus, assuming that an absence of polymorphisms in this *msp1* block reflects stability also in other blocks, it seems that the same *P. malariae* haplotype can persist for almost 3 years in a population.

Relationship of allele prevalence with geographical features and hosts

Regarding the geographical origin of the human samples and the sequence detected, *Pmmsp1* was found practically conserved for all the samples analyzed. On the other hand, in relation to the hosts, different sequences were found in the samples from the three different hosts. These results agree with those obtained by our group using other methodologies to genetic diversity analysis (Guimarães et al., submitted).

In Juititaba, although two groups of human samples about 3 km apart clearly exist, according the Global Positioning System (GPS) (data not shown), the two principal sequences identified in this population (A5 and A7) were randomly distributed in both groups. Similar lack of population sub-structuring has been demonstrated in other villages, even though these were separated by much larger distances (Bruce et al., 2011).

Considering that the range of flight for *An. (Ker.) cruzii* is roughly 1 km (Ferreira et al. 1969), the admixture is likely attributable to human movement in this case.

Surprisingly, all the samples (except the mosquito sample which has a deletion in this region) presented a glycine amino acid in the position 172, which was not found in the sample from Cameroon (MM1). Analysis of a larger number of samples from Africa and Asia is important to determine whether this amino acid can be considered as a genetic marker for South American *P. malariae*/*P. brasilianum* samples.

It is important to note that shorter sequences were obtained in simian isolates (173-221 amino acids) and human samples showed longer sequences (219-225 amino acids). The only exception was the sequence obtained for the first infection from the isolate 6 (A3). Whether this finding indicates a zoonotic infection, it remains to be determined. Similarly, the sequence obtained for the isolate P182 (A5) was commonly found in human isolates and may indicate a case where mosquitos transmitted the infection from man to monkey.

Haplotypes in related infections from different patients and haplotypes in consecutive infections from the same patient

In the two malaria cases acquired by blood transfusion previously reported (Di Santi et al., 2005; Kirchgatter et al., 2005), the two samples of *P. malariae* obtained from the donors showed the same sequence of their recipient. This provides additional evidence that the donor and recipient were infected with the same strain in both cases, as expected. Our

analysis also included the longitudinal change of the PmMSP1 sequence in circulating plasmodial genomes in three untreated non-symptomatic individuals. A different allele was found between the circulating genotypes in two cases. In the case of patient 4, the change of the allele 6 to 5 corresponds to two replaced amino acids and three deleted amino acids. In the case of patient 6, the allele detected in the first infection (A3) was curiously almost identical (only one different nucleotide at position 276) to the sequence obtained to Peruvian III sample that was obtained in 1987 from *Saimiri sciureus peruviansis* near Iquitos (Collins et al., 1990). However, in the second infection of this patient the A5YR allele was found. *P. malariae* from the other patient (Patient 5) maintained the sequence unchanged throughout 9 months. Interestingly, these data are partly consistent to those obtained by microsatellite analysis (Guimarães et al., submitted), when different haplotypes were found in the both patients (Patient 5 and 6). The parasites from patient 4 were not analyzed by microsatellite methodology. Although the results are somehow in conflict for a patient, it is known that this latter technique allows the analysis of six loci, enabling the achievement of a more precise panorama of the genetic diversity.

Relationship of P. brasilianum and P. malariae MSP1 alleles aiming to give insights into the evolutionary and phylogenetic relationships of these parasites

Considering the recent expansion of *P. malariae* in human populations, the host switch between humans and monkeys might have occurred through a single transfer associated with a bottleneck, after the European colonization of the Americas in the 16th century (Escalante et al., 1995). Therefore, the direction of the host transfer can then be suggested by comparing the genetic diversity of the human and primate parasites (Tazi and Ayala, 2011). The high genetic identity determined between *P. malariae* from humans and *P.*

brasilianum from primates suggests the occurrence of recent transference between these hosts (Escalante et al., 1995, 1998; Qari et al., 1996), but there is no evidence to determine whether the transference occurred from monkeys to humans or vice versa.

Although studies focusing on these species are rare, a recent work indicated that *P. brasilianum* strains seem to show greater divergence than *P. malariae*, thus *P. malariae* may derive from *P. brasilianum* (Tazi and Ayala, 2011). In this work, we also identified greater diversity among *P. brasilianum* isolates that could support this hypothesis. However, considering the size of the sequences, repeats present in longer stretches are likely to be older than short ones, as the former needs more time for accumulation of base substitutions (Bell and Jurka, 1997). Interpreting our data in this sense, the simian sequences (with shorter stretches in this work) could have derived from the human sequences (longer stretches in this work). Anyway, microsatellite evolution is a dynamic process during which repeats may shrink as well as expand over an evolutionary time scale (Ellegren, 2004).

4. Conclusions

The assumption that infection diversity and multiplicity is positively correlated with the frequency of transmission is reasonable (reviewed by Babiker & Walliker, 1997). Low allelic diversity was detected in Brazilian isolates, which seems to reflect a very low transmission rate. It has been established that *P. malariae* shows a reduced growth rate (Gilles & Warrell, 1993) and one hypothesis proposed that the low parasitemia obtained *in vivo* may be caused by its preference for mature erythrocytes (Garnham, 1966). *P. malariae* is also

known to promote infections that are frequently long-lasting (up to 40 years absence from reinfection) and non-symptomatic (Vinetz et al., 1998). Exclusive infections with *P. malariae*, like those found in our study area, would also explain the very low transmission rates seen in this region. In other locations, where *P. malariae* occurs in coinfections, mainly with *P. falciparum*, it has developed increased transmission efficiency in the presence of a coinfecting parasite of another species (Bruce et al., 2011).

No evidence of geographical clustering of haplotypes was verified, which is probably due to the small sample available. Further analysis of Brazilian samples of different geographical origins is important to characterize the epidemiology of Brazilian *P. malariae* isolates. Comparisons between human and simian *Plasmodium* isolates is also of interest, particularly in areas of the Atlantic forest where humans and monkeys are at risk of malaria transmission by the same anopheline vectors. This situation is the probable overlap of contact between *Plasmodium* derived from humans and simians and vice versa. Additional studies concerning the characterization of antigenic diversity in vaccine candidate antigens are valuable for future vaccine trials as well as understanding the population dynamics of *P. malariae* and *P. brasilianum* parasites.

Acknowledgments

We are grateful to Prof^a Luzia Helena Carvalho (Laboratório de Malária, Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ) for the provision of *P. brasilianum* (Peruvian III strain). We are also grateful to Prof Luis Fabio Silveira (Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo) for the provision of P169 sample. This research was funded by CNPq (475727/2007-0 - Edital Universal) to Karin Kirchgatter. Lilian de Oliveira Guimarães has a CAPES scholarship.

References

- Babiker, H.A., Walliker, D., 1997. Current views on the population structure of *Plasmodium falciparum*: Implications for control. *Parasitol. Today* 13, 262-267.
- Bell GI, Jurka J. 1997. The length distribution of perfect dimer repetitive DNA is consistent with its evolution by an unbiased single-step mutation process. *J Mol Evol.* 44, 414-421.
- Birkenmeyer L, Muerhoff AS, Dawson GJ, Desai SM. 2010. Isolation and characterization of the MSP1 genes from *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*. *Am J Trop Med Hyg.* 82, 996-1003.
- Brito CF, Ferreira MU. 2011. Molecular markers and genetic diversity of *Plasmodium vivax*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 106 (Suppl 1), 12-26.
- Bruce, M.C., Macheso, A., McConnachie, A., Molyneux, M.E., 2011. Comparative population structure of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium falciparum* under different transmission settings in Malawi. *Malar. J.* 10, 38.
- Collins, W.E., Ruebush, T.K. 2nd, Skinner, J.C., Filipski, V.K., Broderon, J.R., Stanfill, P.S., Morris, C.L., 1990. The Peruvian III strain of *Plasmodium brasilianum* in *Saimiri sciureus boliviensis* monkeys. *J. Parasitol.* 76, 676-680.
- Curado, I., Duarte, A.M., Lal, A.A., Oliveira, S.G., Kloetzel, J.K., 1997. Antibodies anti bloodstream and circumsporozoite antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae*/*P. brasilianum*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92, 235-243.

CVE (Centro de Vigilância Epidemiológica), 2008. Epidemiological situation of malaria in the State of São Paulo, 2007. BEPA, São Paulo. v.5, n.56. Aug. Available on: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa56.htm>.

Deane, L.M., 1992. Simian malaria in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 87 (S3), 1-20.

del Portillo HA, Longacre S, Khouri E, David PH. 1991. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. Proc Natl Acad Sci U S A. 88, 4030-4034.

Di Santi, S.M.F., Carvalho, M.E., Costa, M.J., Kirchgatter, K., Pereira, B.F., Toniolo, C.R.C., Langui, D., Marret, A.C., 2005. Malária transfusional causada por *Plasmodium malariae* transmitido por doador assintomático infectado na Mata Atlântica do Estado de São Paulo [abstract]. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 38, 333.

dos Santos, L.C., Curotto, S.M., de Moraes, W., Cubas, Z.S., Costa-Nascimento, M.J., de Barros Filho, I.R., Biondo, A.W., Kirchgatter, K., 2009. Detection of *Plasmodium* sp. in capybara. Vet. Parasitol. 163, 148-151.

Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nat Rev Genet. 5, 435-445.

Escalante, A.A., Barrio, E., Ayala, F.J., 1995. Evolutionary origin of human and primate malarias: evidence from the circumsporozoite protein gene. Mol. Biol. Evol. 12, 616–626.

Escalante, A.A., Freeland, D.E., Collins, W.E., Lal, A.A., 1998. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 8124–8129.

Fandeur, T., Volney, B., Peneau, C., de Thoisy, B., 2000. Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum*/*P. malariae* malaria. *Parasitology* 120, 11-21.

Ferreira, E., Corrêa, R.R., Tomich, A., de Sá, F.T., 1969. Flying range of *Anopheles (Kerteszia) cruzii* and *Anopheles (Kerteszia) bellator* in Guaratuba, coast line of the State of Paraná, Brazil. *Rev. Bras. Malariol. Doencas Trop.* 21, 819-822.

Forattini, O.P., Kakitani, I., Massad, E., Marucci, D., 1996. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 11--Biting activity and blood-seeking parity of *Anopheles (Kerteszia)* in south-eastern Brazil. *Rev. Saude Publica* 30, 107-114.

Garnham, P.C.C., 1966. *Malaria Parasites and Other Haemosporidia*. Blackwell, Oxford.

Gilles, H.M., Warrell, D.A., 1993. *Bruce-Chwatt's Essential Malariology*. Edward Arnold, London.

Greenwood BM, Targett GA. 2011. Malaria vaccines and the new malaria agenda. *Clin Microbiol Infect.* 17, 1600-1607.

Guimarães LO, Bajay MM, Wunderlich G, Bueno MG, Röhe F, Catão-Dias JL, Neves A, Malafronte RS, Curado I, Kirchgatter K. The genetic diversity of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium brasilianum* from human, simian and mosquito hosts in Brazil. *Acta Trop.* Submitted.

Holder AA, Lockyer MJ, Odink KG, Sandhu JS, Riveros-Moreno V, Nicholls SC, Hillman Y, Davey LS, Tizard ML, Schwarz RT, et al. 1985. Primary structure of the precursor to the three major surface antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Nature.* 317(6034):270-3.

Kadekoppala M, Holder AA. 2010. Merozoite surface proteins of the malaria parasite: the MSP1 complex and the MSP7 family. *Int J Parasitol.* 40, 1155-1161.

Kirchgatter K, Nogueira SL, Padilha A, Curado I, Boulos M, Di Santi SM. 2005. Lethal malaria caused by *Plasmodium malariae* in an asplenic patient in Brazil. *BMJ online* (<http://www.bmj.com/rapid-response/2011/10/31/lethal-malaria-caused-plasmodium-malariae-asplenic-patient-brazil>).

Oliveira-Ferreira, J., Lacerda, M.V., Brasil, P., Ladislau, J.L., Tauil, P.L., Daniel-Ribeiro, C.T., 2010. Malaria in Brazil: an overview. *Malar. J.* 9, 115.

Perkins, S.L., Schall, J.J., 2002. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. *J. Parasitol.* 88, 972–978.

Qari, S.H., Shi, Y.P., Pieniazek, N.J., Collins, W.E., Lal, A.A., 1996. Phylogenetic relationship among the malaria parasites based on small subunit rRNA gene sequences: monophyletic nature of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 6, 157–165.

Rich SM, Ferreira MU, Ayala FJ. 2000. The origin of antigenic diversity in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today.* 16, 390-396.

Rich, S.M., Ayala, F.J. 2000. Population structure and recent evolution of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6994–7001.

Roy SW, Ferreira MU, Hartl DL. 2008. Evolution of allelic dimorphism in malarial surface antigens. *Heredity* 100, 103–110.

Singh, B., Bobogare, A., Cox-Singh, J., Snounou, G., Shukri Abdullah, M., Abdul Rahman, H., 1999. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60, 687–692.

- Snounou, G., Viriyakosol, S., Zhu, X.P., Jarra, W., Pinheiro, L., Rosário, V.E., Thaithong, S., Brown, K.N., 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61, 315–320.
- Tanabe K, Mackay M, Goman M, Scaife JG. 1987. Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol.* 195, 273-287.
- Tazi, L., Ayala, F.J., 2011. Unresolved direction of host transfer of *Plasmodium vivax* v. *P. simium* and *P. malariae* v. *P. brasilianum*. *Infect. Genet. Evol.* 11, 209-221.
- Vinetz, J.M., Li, J., McCutchan, T.F., Kaslow, D.C., 1998. *Plasmodium malariae* infection in an asymptomatic 74-year-old Greek woman with splenomegaly. *N. Engl. J. Med.* 338, 367-371.

Figure 1

Agarose gel showing PCR products amplified with primers PMP5F2 and PMP5R2. Lanes 1 and 12, GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas); lane 2, mosquito sample infected with *Plasmodium sp.* (M); lanes 3 to 5, simian samples infected with *P. brasilianum* (P); lanes 6 to 10, human samples infected with *P. malariae* (H); lane 11, negative control (no DNA). Note that the smaller product is from the mosquito host and the larger products are from human hosts.

Table 1. Allelic types of the imperfect repeats region (Block 8) of merozoite surface protein 1 (MSP1) and geographic prevalence of each *P. malariae*/*P. brasilianum* isolate from different locations.

Allelic type	No. of amino acids	No. (%) following sources										GenBank accession no.
		Brazil					Amazon Region					
		São Paulo state, Atlantic Forest					Tomé-Açu, PA	Porto Velho, RO	Manaus, AM	Peru		
		Iguape	Iporanga	Juquitiba	Itanhaém	Total				Iquitos		
A1	173				1 M (100)						1 (4.17)	
A2	207							1 P (50)			1 (4.17)	
A3	219			1 H (6.7)						1 P (100)	2 (8.33)	
A4	220						1 P (100)				1 (4.17)	
A5	221			10 H* (9YQ/1YR) (66.6)		1 H (YQ) (100)		1 P (NQ) (50)			12 (50)	
A6	224			1 H (6.7)							1 (4.17)	
A7	225	2 H* (100)	1 H (100)	3 H (20)							6 (25)	
Total		2 (100)	1 (100)	15 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	2 (100)	1 (100)	1 (100)	24 (100)	

PA= Pará state; RO= Rondônia state; AM= Amazonas state; M=Mosquito isolate; H=human isolate; P=non-human primate isolate.*One sample

transmitted by blood transfusion in São Paulo city.

Table 2. Amino acid sequence variations from the repeats region (Block 8) of *P. malariae* and *P. brasilianum* MSP1 alleles*

	Host	47	78-83	92	95	96-101	102	110-115	128-135	136-138	139-171	172	173-176	No. AA
MM1#	H	N	VSVGET	P	Q	PQPQPQ	T	-----	SGQSGQSG	QSG	AEGTTETTTGTAAGTTGTPEQAAAAAGPQAETT	A	TPGQ	222
A1	M	N	VSVGET	P	Q	PQPQPQ	T	-----	-----	---	-----	---	---	173
A2	P	N	-----	P	Q	-----	I	-----	SGQSGQSG	---	AEGTTETTTGTAAGTTGTPEQAAAAAGPQAETT	G	TPGQ	207
A3	P/H	N	VSVGET	P	Q	PQPQPQ	T	-----	SGQSGQSG	---	AEGTTETTTGTAAGTTGTPEQAAAAAGPQAETT	G	TPGQ	219
A4	P	N	VSVGET	A	Q	PQPQPQ	T	-----	SGQSGQSG	QSG	AEGTTETTTGTAAGTTGTPEQAAAAAGPQAETT	G	TPGQ	220
A5NQ	P	N	VSVGET	P	Q	PQPQPQ	P	TQ-----	SGQSGQSG	---	AEGTTETTTGTAAGTTGTPEQAAAAAGPQAETT	G	TPGQ	221
A5YQ	H	Y	VSVGET	P	Q	PQPQPQ	P	TQ-----	SGQSGQSG	---	AEGTTETTTGTAAGTTGTPEQAAAAAGPQAETT	G	TPGQ	221
A5YR	H	Y	VSVGET	P	R	PQPQPQ	P	TQ-----	SGQSGQSG	---	AEGTTETTTGTAAGTTGTPEQAAAAAGPQAETT	G	TPGQ	221
A6	H	N	VSVGET	P	Q	PQPQPQ	T	TQ-----	SGQSGQSG	QSG	AEGTTETTTGTAAGTTGTPEQAAAAAGPQAETT	G	TPGQ	224
A7	H	N	VSVGET	P	Q	PQPQPQ	T	TQTQTQ	SGQSGQSG	---	AEGTTETTTGTAAGTTGTPEQAAAAAGPQAETT	G	TPGQ	225

*Dashes represent deletions. #From FJ824669. H=human; M=mosquito; P=non-human primate. Residue conserved among human and simian samples

in the Americas is boxed; singletons are in bold.

Table 3. Similarity percentage between the amino acids sequences from allelic types of the imperfect repeats region (Block 8) of merozoite surface protein 1 (MSP1) found in *P. malariae*/*P. brasilianum* isolates.*

	A1	A7	A5NQ	A5YR	A5YQ	A3	A2	A4	MM1	A6
A1	173	96%	98%	97%	97%	100%	93%	98%	100%	98%
A7	173	179	97%	96%	96%	96%	89%	94%	96%	97%
A5NQ	172	174	175	98%	99%	98%	91%	96%	98%	99%
A5YR	170	172	173	175	99%	97%	90%	95%	97%	98%
A5YQ	171	173	174	174	175	97%	90%	96%	97%	98%
A3	173	173	172	170	171	173	93%	98%	100%	98%
A2	161	161	160	158	159	161	161	93%	93%	92%
A4	170	170	169	167	168	170	160	171	98%	97%
MM1	173	173	172	170	171	173	161	170	173	98%
A6	173	175	174	172	173	173	161	170	173	175

* The analysis was performed without the region of deletion found in A1.

ANEXOS

Anexo A – Parecer 749, emitido pela Comissão de Ética.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 17 de outubro de 2006.

PARECER 749/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em 69ª Reunião realizada em 11.10.06, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Identificação de genes expressos em Plasmodium malariae através da análise de ESTs (expressed sequence tags)*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**.

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilma. Sra.
KARIN KIRCHGATIER
Departamento de Parasitologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

Anexo B – Declaração 065/2008, emitida pela Comissão de Ética.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 - telefax: (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEP SH.065/2008

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Parecer 749/CEP de 11-outubro-2006, declaro que o título do Projeto foi alterado para "*Análise da diversidade genética de isolados brasileiros de Plasmodium malariae através da utilização de microsátélites e minisátélites*" sob responsabilidade de KARIN KIRCHGATTER, não apresentando restrições quanto às modificações do protocolo, que as mesmas não afetam os aspectos éticos da pesquisa.

São Paulo, 04 de setembro de 2008.

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP