

### **III. RESULTADOS**

De forma a facilitar a interpretação dos resultados, os dados serão apresentados em três subcapítulos que correspondem a cada um dos objectivos. Assim, os resultados foram organizados e apresentados da seguinte forma:

III.1. Estudo epidemiológico da malária nos humanos e nos mosquitos, distribuição da prevalência e factores socioeconómicos associados.

III.2. Pesquisa de polimorfismos genéticos de *P. falciparum* e sua prevalência.

III.3. Pesquisa de polimorfismos genéticos de *P. vivax* e sua prevalência.

#### **III.1. Estudo epidemiológico da malária nos humanos e nos mosquitos, distribuição da prevalência e factores socioeconómicos associados.**

O trabalho de campo realizado entre 15 de Dezembro de 2004 e 9 de Março de 2005, permitiu a recolha de 650 amostras, distribuídas pelos 6 distritos a seguir discriminados, sendo 434 por busca passiva e 216 por busca activa. Na busca activa, para além da colheita de sangue dos indivíduos de todos os habitantes da casa foram capturados 258 mosquitos em 71 casas (famílias) nos 6 distritos. Dos 258 mosquitos, foram dissecados 41,1% (106/258) para posterior análise da detecção e identificação do parasita, enquanto os restantes foram mortos antes do dia oito (D8) da dissecção (Tabela 7).

## Resultados

**Tabela 7.** Distribuição das amostras sanguíneas colhidas por BP e BA e mosquitos capturados nos 6 distritos.

Distritos	Amostras		Casa (N)	Número de Mosquitos		
	N	BP		Capturados	Dissecados	
Díli	175	121	54	17	54	30
Liquiça	73	51	22	9	32	11
Suai	120	71	49	15	51	19
Same	99	69	30	10	43	17
Viqueque	66	45	21	9	40	18
Lospalos	117	77	40	11	38	11
<b>Total</b>	<b>650</b>	<b>434</b>	<b>216</b>	<b>71</b>	<b>258</b>	<b>106</b>

BP: busca passiva; BA: busca activa; N/(N): número de indivíduos/casas.

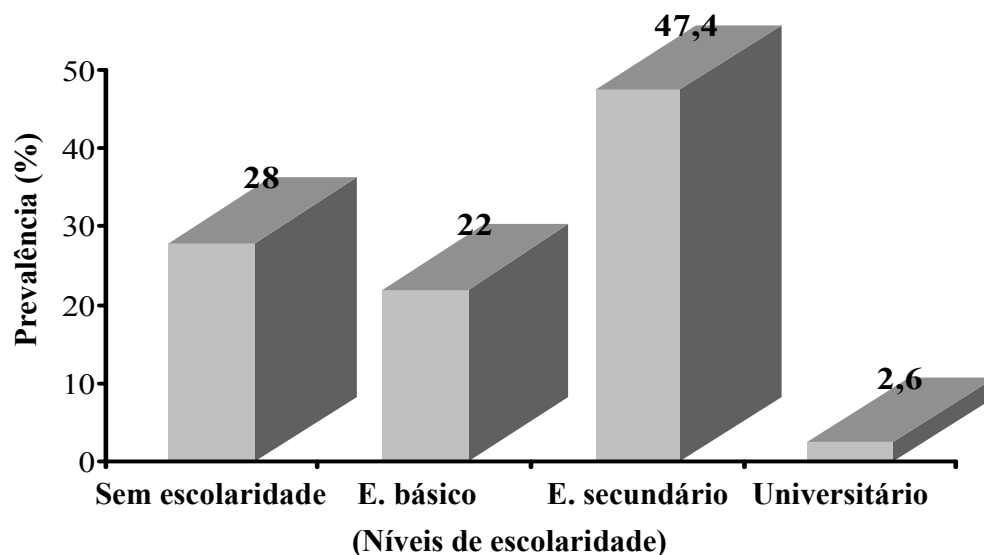
### III.1.1. Características da População Estudada

Os resultados do inquérito relativos aos 650 indivíduos incluídos (Tabela 8), mostram que a proporção de indivíduos com menos de 15 anos é de 44,3% (288/650) e superior a 15 anos, de 55,7% (362/650). A população em idade activa dos 15 aos 44 anos apresentou uma proporção de 44,8% (291/650); os indivíduos com idade superior a 45 anos representaram 10,9 % (71/650) do total dos inquiridos. A idade média foi de 21 anos (desvio padrão (DP) = 17,04), com valores entre os 8 meses e 88 anos. A distribuição dos inquiridos por sexo e por grupo etário entre os 6 distritos foi bastante semelhante ( $X^2=3,98$ ,  $p=0,55$ ,  $gl=5$  e  $X^2=9,15$ ,  $p=0,1$ ,  $gl=5$ , respectivamente), sendo 51% (332/650) do sexo masculino e 49% (318/650) do sexo feminino. A utilização de redes mosquiteiras varia significativamente entre os 6 distritos ( $X^2=27,88$ ,  $p=0,001$ ,  $gl=5$ ) com a maior cobertura nos distritos de Díli (54,3%), Liquiça (59%), Same (54,5%) e 60,6% no distrito de Viqueque. Suai e Lospalos são os distritos com menor percentagem de uso de rede mosquiteiras (30% e 44,4%, respectivamente). Em termos gerais observa-se que a não

## Resultados

utilização de rede mosquiteira foi de 50,8% (330/650) a reportar o seu uso em 6 distritos, comparando com apenas 49,2% (320/650) sem uso de rede mosquiteira. Este resultado é um dado importante no contexto da malária, para avaliar o programa do controlo da malária que já foi implementado pelas autoridades nacionais.

Ao nível da educação, verifica-se que nos indivíduos com mais de 6 anos, a maior percentagem tem grau de ensino secundário 47,5% (235/495), seguido de 28% sem escolaridade (138/495), ensino básico 22% (109/495) e universitário 2,6% (13/495) (Figura 11). Quanto à distribuição dos inquiridos por nível de escolaridade em cada distrito, verifica-se que Díli é o distrito com maior percentagem de participantes com grau de escolaridade universitário 6,5% (9/139) e ensino básico 29,5% (41/139), enquanto que no ensino secundário maior percentagem dos participantes foi no distrito de Liquiça (60%; 33/57). Nos grupos dos indivíduos sem escolaridade os valores variam entre 23-31% nos 6 distritos (Tabela 8).

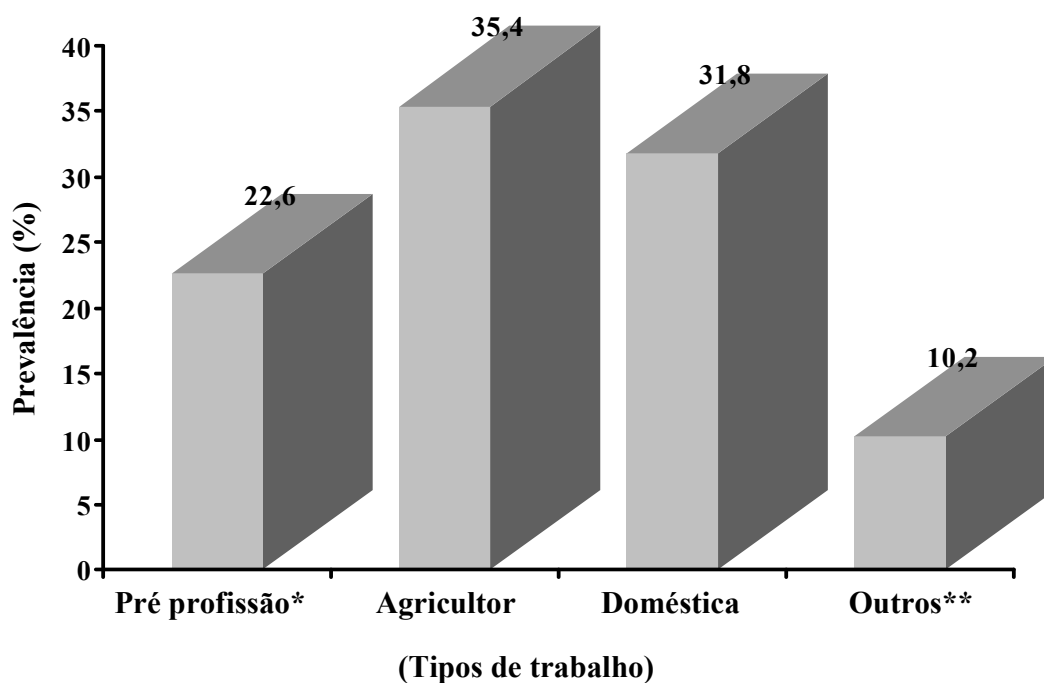


**Figura 11.** Distribuição dos inquiridos por níveis de escolaridade.

## Resultados

---

Nos inquiridos acima de 15 anos (Figura 12), verificamos que o tipo de trabalho (ocupação) mais representativo é trabalho agrícola e doméstico, totalizando 35,4 % e 31,8%, respectivamente, em relação a outros tipos de ocupação.



**Figura 12.** Distribuição dos inquiridos por tipo de trabalho. \* Indivíduos com idade igual ou superior a 15 anos em fase de procura ou que ainda não encontraram emprego; \*\* Outros tipos de trabalho (ocupação): professores, comerciantes, profissionais de saúde, função pública etc.

Os resultados gerais deste inquérito estão representados na Tabela III.2.

## Resultados

**Tabela 8.** Distribuição das amostras por sexo, grupos etário, tipo de trabalho, nível de educação e uso de/sem rede mosquiteira.

	Distritos						Total
	Dili	Liquiça	Suai	Same	Viqueque	Lospalos	
<b>Sexo</b>							
Feminino	79 (45.1)	37 (50.7)	56 (46.7)	51 (51.5)	30 (45.5)	65 (55.6)	<b>318 (48.9)</b>
Masculino	96 (54.9)	36 (49.3)	64 (53.3)	48 (48.5)	36 (54.5)	52 (44.4)	<b>332 (51.2)</b>
<b>Grupo etário (anos)</b>							
[<14]	75 (42.9)	23 (31.5)	61 (50.8)	48 (48.5)	33 (50)	48 (41)	<b>288 (44.3)</b>
[≥ 15]	100 (57.1)	50 (68.5)	59 (49.2)	51 (51.5)	33 (50)	69 (59)	<b>362 (55.7)</b>
<b>Uso de rede mosquiteira</b>							
Sem rede	80 (45.7)	30 (41.1)	84 (70)	45 (45.5)	26 (39.4)	65 (55.6)	<b>330 (50.8)</b>
Com rede	95 (54.3)	43 (58.9)	36 (30)	54 (54.5)	40 (60.6)	52 (44.4)	<b>320 (49.2)</b>
<b>Tipo de trabalho (≥ 15 anos)</b>							
Agricultor	41 (41)	16 (30.8)	24 (40.7)	14 (27.5)	14 (42.4)	19 (27.9)	<b>128 (35.4)</b>
Doméstica	28 (28)	17 (32.7)	21 (35.6)	15 (29.4)	9 (27.3)	25 (36.8)	<b>115 (31.8)</b>
Pré-profissão*	19 (19)	15 (28.8)	12 (20.3)	14 (27.5)	7 (21.2)	17 (25)	<b>82 (22.7)</b>
Outras**	12 (12)	4 (7.7)	2 (3.4)	8 (15.7)	3 (9.1)	8 (11.8)	<b>37 (10.2)</b>
<b>Nível de educação (≥ 6 anos)</b>							
Sem escolaridade	32 (23)	13 (23.6)	29 (29)	22 (30.1)	14 (45)	28 (30.8)	<b>138 (27.9)</b>
Ensino básico	41 (29.5)	8 (14.5)	21 (22.8)	12 (16.4)	9 (31.1)	18 (19.8)	<b>109 (22.0)</b>
Ensino secundário	57 (41)	33 (60)	42 (45.7)	38 (52.1)	21 (20)	44 (48.4)	<b>235 (47.5)</b>
Universitário	9 (6.5)	1 (1.8)	0 (0.0)	1 (1.4)	1 (2.2)	1 (1.1)	<b>13 (2.6)</b>

\* Indivíduos com idade igual ou superior a 15 anos em fase de procura ou que ainda não encontraram emprego; \*\* Outros tipos de trabalho (ocupação): professores, comerciantes, profissionais de saúde, função pública etc.

### **III.1.2. Características da habitação**

Em relação às características das habitações nos 6 distritos, o estudo envolveu 71 casas com 216 habitantes durante a busca activa (Tabela 9), tendo-se observado a existência de vários tipos de casa, diferindo no seu aspecto e materiais de construção. Assim, as habitações podem ser agrupadas em três tipos: 1) Tipo de construção Alvenaria (Casas pintadas), com paredes de tijolo e com ou sem rebocadas e estucadas, tecto com telha de zinco, chão com ou sem cimentado, com ou sem forro, com janelas e portas e várias divisões; 2) Tipo de construção “meia parede”, de chão cimentada ou não, paredes construídas por metade de tijolos com/sem rebocadas e metade por palapa ou de bambu espalmada, tecto com telha de zinco/capim e com janelas e portas e várias divisões; 3) Tipos de construção “Outros”, como por exemplo: casas de chão não cimentado (feito por terra batida), com paredes de bambu espalmadas/palapa e cobertura de folhas de palmeiras atadas com gamuti e tecto de capim, com uma porta e uma ou mais janelas e uma ou mais divisões.

Observou-se neste estudo, que a proporção de casas pintadas (alvenaria) foi bastante elevada [43,7% (31/71)] quando comparada com outros tipos de casas. Sendo assim, em alguns casos, metade das paredes foram cobertas por zinco, devido à destruição após o referendo em 1999. Além disso, verificou-se ainda que 87% (62/71) das casas pintadas (alvenaria) tinham abertura entre parede e telhado ou janelas abertas sem nenhuma protecção de redes, possibilitando a entrada dos mosquitos nas habitações. Geralmente, existe ainda um pequeno quintal nas traseiras onde os habitantes criam animais. A existência de animais (galinhas, porcos, cabras, vacas, búfalos, etc.) junto das habitações (menos de 10m), também foi uma situação identificada como apresentando uma frequência muito elevada 85,5% (60/71). Relativamente aos habitantes, a maioria dos inquiridos (indivíduos) vivem/habitam nas casas pintadas (alvenaria) com abertura entre paredes e telhado/janelas e com a presença dos animais em relação às outras alternativas (Tabela 9). O agregado familiar dos inquiridos tinha a dimensão, em média, de 7 pessoas por casa.

**Tabela 9.** Representação percentual das características de habitação.

Habitação	(n° casas) n total = 71	(%)	(n° habitantes) n total = 216	(%)
<b>Tipo de casas</b>				
Pintada/alvenaria	31	43,7	107	49,5
Meia parede	22	31	61	28,2
Outras	18	25,3	48	22,2
<b>Abertura entre parede e telhado</b>				
Com abertura	62	87,3	184	85,2
Sem abertura	9	12,7	32	14,8
<b>Presença de animais</b>				
Com presença	60	85,5	192	88,9
Sem presença	11	15,5	24	11,1

n° : número de casas/habitantes; n: número total das casas/habitantes

### III.1.3. Detecção e Identificação do Parasita nos humanos

As prevalências de infecções simples e infecções mistas (*P. falciparum* + *P. vivax*) no total da população estudada (N=650), determinadas por MO e PCR, estão indicadas na Tabela 10. Todas as amostras detectadas por MO foram posteriormente confirmadas pela técnica PCR (Figura 13); através desta última detectaram-se mais algumas amostras positivas não detectadas anteriormente por MO, quer com *P. falciparum*, quer com *P. vivax*. Nenhum isolado com infecções mistas foi detectado por MO. A comparação da taxa de positividade por ambas as técnicas apresenta uma diferença significativa ( $X^2= 15,02$ ;  $p=0,001$ ,  $gl=1$ ), dado que, tal como esperado, a técnica de PCR se revelou mais sensível, detectando um maior número de infecções que a MO.

## Resultados

**Tabela 10.** Prevalência de infecção detectada por MO e PCR.

Método de detecção	Infectado por						Total Nº indiv. (%)
	<i>Pf</i>		<i>Pv</i>		<i>Pf + Pv</i>		
	Nº indiv.	Prev.(%)	Nº indiv.	Prev.(%)	Nº indiv.	Prev.(%)	
MO	49	7,5	24	3,7	0	0,0	73 (11,2)
PCR	74	11,4	43	6,6	6	1	123 (19)

MO: Microscopia Óptica; PCR: Polymerase chain reaction; Nº indiv.: número de indivíduos; prev.: prevalência de infecção; *Pf*: *P. falciparum*; *Pv*: *P. vivax*.



**Figura 13.** Gel de agarose 2% com resultados típicos de PCR para identificação de *P. falciparum* e *P. vivax* nos humanos (M: marcador de peso molecular; *MassRuler™ DNA Ladder, Low Range* (Fermentas™); NT: non template (branco);  $K^+$  e  $K^{+*}$ : Controlo positivo de *P. falciparum* e *P. vivax*, respectivamente; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15: exemplos de isolados de campo; 3, 4, 5 e 6: Isolados positivos de *P. falciparum* com tamanho de 205 pbs; 8, 9, 10, 11, 12, e 14: Isolados positivos de *P. vivax* com tamanho de 120 pbs; o isolado 1 e 15 representa infecção mista; 2, 7 e 14: Isolados negativos. NB: As amostras foram identificadas separadamente *P. falciparum* e *P. vivax*. As infecções mistas apresentadas na Figura 13. foram efectuadas através da mistura do produto amplificado da 2ª reacção de *P. falciparum* e *P. vivax* na aplicação do gel.

### III.1.4. Prevalência de infecção por busca passiva e activa na população humana

São apresentados e analisados os dados referentes às infecções por busca passiva e activa, sendo as infecções simples e mistas por grupo etário apresentadas na Tabela 11. As idades variam entre 8 meses e 88 anos na busca passiva e entre 1 ano e 71 anos na busca activa. Em seguida, apresenta-se a prevalência de infecção das duas buscas detectadas por técnica de PCR.

Na busca passiva, a prevalência total de infecção foi de 25,8% (112/434) da totalidade das amostras analisadas destacando-se 58% (65/112) por *P. falciparum*, 36,6% (41/112) por *P. vivax* e 5,4% (6/112) por infecções mistas com ambas as espécies. Os sintomas mais frequentes identificados nos indivíduos infectados, referidos no momento da consulta foram febre, calafrios e dor de cabeça 56,3% (63/112). A temperatura média 38,2°C.

Quanto à busca activa, a prevalência total foi de 5,1% (11/216) da totalidade das amostras analisadas a seguir discriminadas, sendo 81,9% (9/11) por *P. falciparum*, 18,1% (2/11) por *P. vivax*, não tendo sido detectadas infecções mistas.

As prevalências totais de infecção determinadas a partir das amostras colhidas por busca passiva e busca activa foram comparadas através de um teste  $X^2$  de Pearson, tendo-se verificado diferenças significativas ( $X^2$ : 40,3;  $p=0,001$ ;  $gl=1$ ). A infecção simples por *P. falciparum* revelou-se como a mais prevalente nas duas buscas, tendo ocorrido infecção mista numa prevalência muito baixa apenas na busca passiva.

As prevalências de cada espécie de *Plasmodium* entre as duas buscas foram comparadas, tendo se verificado a existência de diferenças significativas (*P. falciparum*:  $X^2=19,9$ ,  $p=0,001$ ,  $gl=1$ ; *P. vivax*:  $X^2=20,3$ ,  $p=0,001$ ,  $gl=1$ ).

## Resultados

**Tabela 11.** Prevalência de infecção por busca e por grupo etário.

Método de colheita	Infecção	Grupo etário (anos)		Total
		< 14	≥ 15	
<b>Busca Passiva</b>	<i>P. falciparum</i>	32	33	65
	<i>P. vivax</i>	24	17	41
	Inf. Mista ( <i>Pf</i> + <i>Pv</i> )	4	2	6
	no. de indivíduos	215	219	434
	<b>Total infectados</b>	<b>60</b>	<b>52</b>	<b>112</b>
	<b>Prevalência (%)</b>	<b>28</b>	<b>23,7</b>	<b>25,8</b>
	Não infectados	155	167	322
<b>Busca Activa</b>	<i>P. falciparum</i>	6	3	9
	<i>P. vivax</i>	2	0	2
	Inf. Mista ( <i>Pf</i> + <i>Pv</i> )	0	0	0
	no. de indivíduos	73	143	216
	<b>Total infectados</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>11</b>
	<b>Prevalência (%)</b>	<b>11</b>	<b>2,1</b>	<b>5,1</b>
	Não infectados	65	140	205

no. indiv.: número de indivíduos; no. infec.: número infectados.

Ao analisar a prevalência de infecção separando a população/indivíduos aproximadamente em dois grupos etários relativos à mediana (< 14 anos e ≥ 15 anos), permitiu verificar que a prevalência da infecção foi superior nas crianças em ambas as buscas. Se compararmos os dois grupos etários (<14 anos e ≥ 15 anos), utilizando o teste de  $X^2$  de Pearson verifica-se que não existe associação entre a idade dos pesquisados e a presença de infecção nos indivíduos por busca passiva ( $X^2= 0,982$ ;  $p=0,322$ ;  $gl=1$ ), pelo contrário, a idade dos pesquisados e a presença de infecção nos indivíduos amostrados por busca activa, encontram-se significativamente associadas ( $X^2= 7,851$ ;  $p=0,008$ ;  $gl=1$ ). Os grupos etários <14 anos de idade são os mais vulneráveis quer na busca passiva, quer na busca activa. (Tabela 11).

## *Resultados*

---

Quanto à distribuição das infecções em ambos sexos, estas predominaram no masculino 22,29 % (74/332) e apenas 15,41 % (49/318) no sexo feminino.

### **III.1.5. Factores de risco de infecção por malária**

Para identificação de factores associados a maior risco de infecção da malária foram comparadas a prevalência de infecção nas amostras analisadas. Assim, procedeu-se a comparação da prevalência das variáveis apresentadas na Tabela 12.

## Resultados

**Tabela 12.** Prevalência de infecção por distritos, zonas de residência, tipos de trabalho, nível de escolaridade e uso/não uso de rede mosquiteira.

	no.	Infec.		Não infec. n°	OR (IC 95%)	X <sup>2</sup> ( p )
		n°	Prev.(%)			
<b>Distritos</b>						
Díli	175	31	(17,7)	144	2,03 (0,86-2,31)	2,62 (0,11)
Suai	120	21	(17,5)	99	2 (0,81 -4,97)	2,29 (0,13)
Same	99	28	(28,3)	71	3,72 (1,52 – 9,09)	9,06 <b>(0,003)</b>
Viqueque	66	11	(16,7)	55	2 (0,69 – 5,19)	1,54 (0,22)
Lospalos	117	25	(21,4)	92	2,56 (1,05 – 6,28)	4,45 <b>(0,04)</b>
Liquiça	73	7	(9,6)	66	1	
<b>Zona de residência</b>						
Sul (Suai, Same e Viqueque)	285	60	(21,1)	225	2 (0,94 – 2,31)	2,9 (0,09)
Leste (Lospalos)	117	25	(21,5)	92	2 (0,86 – 2,6)	2,03 (0,15)
Norte (Díli, Liquiça)	248	38	(15,3)	210	1	
<b>Tipo de trabalho (≥ 15 anos)</b>						
Agricultor	128	32	(25)	96	3,8 (1,1 – 13,1)	4,9 <b>(0,03)</b>
Doméstica	115	4	(3,5)	111	0,41 (0,1 – 1,9)	1,4 (0,36)
Pré-profissão <sup>a</sup>	82	16	(19,5)	66	2,7 (0,7 – 10,1)	2,5 (1,12)
Outras <sup>am</sup>	37	3	(8,1)	34	1	
<b>Nível de educação (≥ 6 anos)</b>						
Universitário	13	1	(7,7)	12	0,32 (0,38 – 2,52)	1,32 <b>(0,46)*</b>
Ensino secundário	235	47	(20)	188	0,94 (0,53 – 1,64)	0,06 (0,81)
Outros (Sem escolaridade)	138	23	(17)	115	0,75 (0,39 – 1,42)	0,79 (0,37)
Ensino básico	109	23	(21,1)	86	1	
<b>Uso de rede mosquiteiras</b>						
Sem rede	330	83	(25,2)	247	2,35 (1,55-3,56)	16,95 <b>(0,001)</b>
Com rede	320	40	(12,5)	280	1	

\* o valor p baseado em Fisher's Exact Test.

## *Resultados*

---

O risco de contrair a infecção da malária foi maior nos indivíduos que vivem no distrito de Same (28/99, 28,3%; OR=3,72 IC95% 1,52-9,09; p=0,003) e Lospalos (25/117, 21%; OR=2,56 IC95% 1,05-6,28; p=0,004) relativamente àqueles que vivem no distrito de Liquiça (7/73, 9,6%). No entanto, em termos gerais não conseguimos observar diferença estatisticamente significativa entre a prevalência de infecção de acordo com as zonas de residência (Tabela 12).

O risco de um indivíduo que não usa rede mosquiteira ter malária foi superior (83/330, 25,2%; OR=2,35 IC95% 1,55-3,56; p=0,001) ao dos indivíduos que usam rede mosquiteira (40/320, 12,5%). Adicionalmente, os trabalhadores agrícolas correm maior risco de adquirir a infecção (32/128, 25%; OR=3,8 IC95% 1,1-13,1; p=0,03) do que outros tipos de trabalhador (3/37, 8,1%).

As diferenças ao nível de educação também foram avaliadas mas não se encontrou qualquer associação com o risco de infecção por malária (Tabela 12).

Ao analisarmos a prevalência das amostras positivas em relação ao tipo de habitação (Figura 14), verifica-se que os indivíduos que vivem nas casas com abertura entre parede – telhado e a existência de animais junto das habitações têm maior tendência para adquirir infecção em comparação com habitações sem abertura e sem criação de animais. A distribuição da prevalência de infecção por tipo de casas foi menor nos indivíduos que vivem nas casas pintadas (alvenaria) 8,3% (4/48) do que aqueles que vivem noutros tipos de casas 3,7% (4/107).

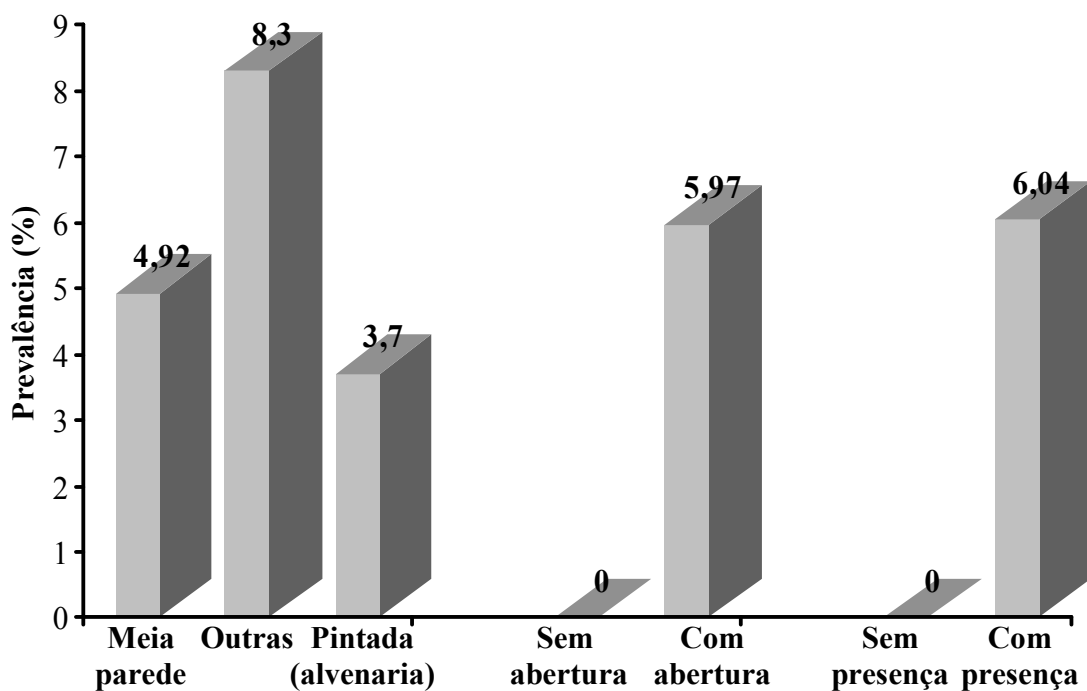
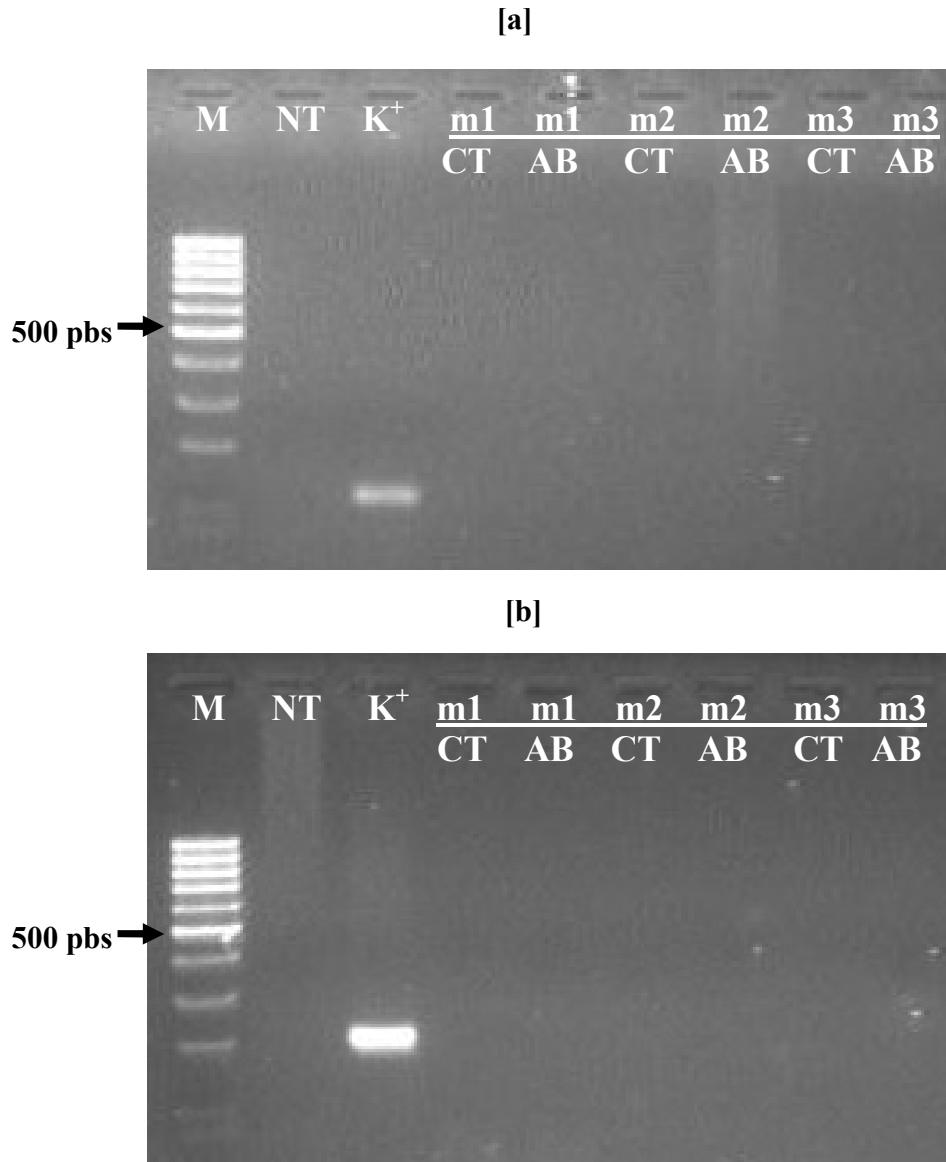


Figura 14. Relação entre prevalência de infecção, tipo de casas, com/sem abertura e criação dos animais.

### III.1.6. Detecção e Identificação do Parasita nos Mosquitos

No presente estudo foram analisados 106 mosquitos capturados no interior das casas, e separados em cabeça-tórax e abdómen. A cabeça-tórax e abdómen foram analisadas separadamente através da técnica de PCR (Figura 15), não tendo sido encontrado nenhum mosquito infectado por *Plasmodium*.

## Resultados



**Figura 15.** Gel de agarose 2% com resultados de PCR para identificação de *P. falciparum* e *P. vivax* nos mosquitos (M: marcador de peso molecular; *MassRuler<sup>TM</sup> DNA Ladder, Low Range* (Fermentas<sup>TM</sup>); NT: non template (branco); K<sup>+</sup>: Controlo positivo de *P. falciparum* e *P. vivax*; m1, m2, m3: isolados de mosquitos. CT: cabeça-torax; AB: abdômem).

[a]. Identificação de *P. vivax*: 120 pbs;

[b]. Identificação de *P. falciparum*: 205 pbs

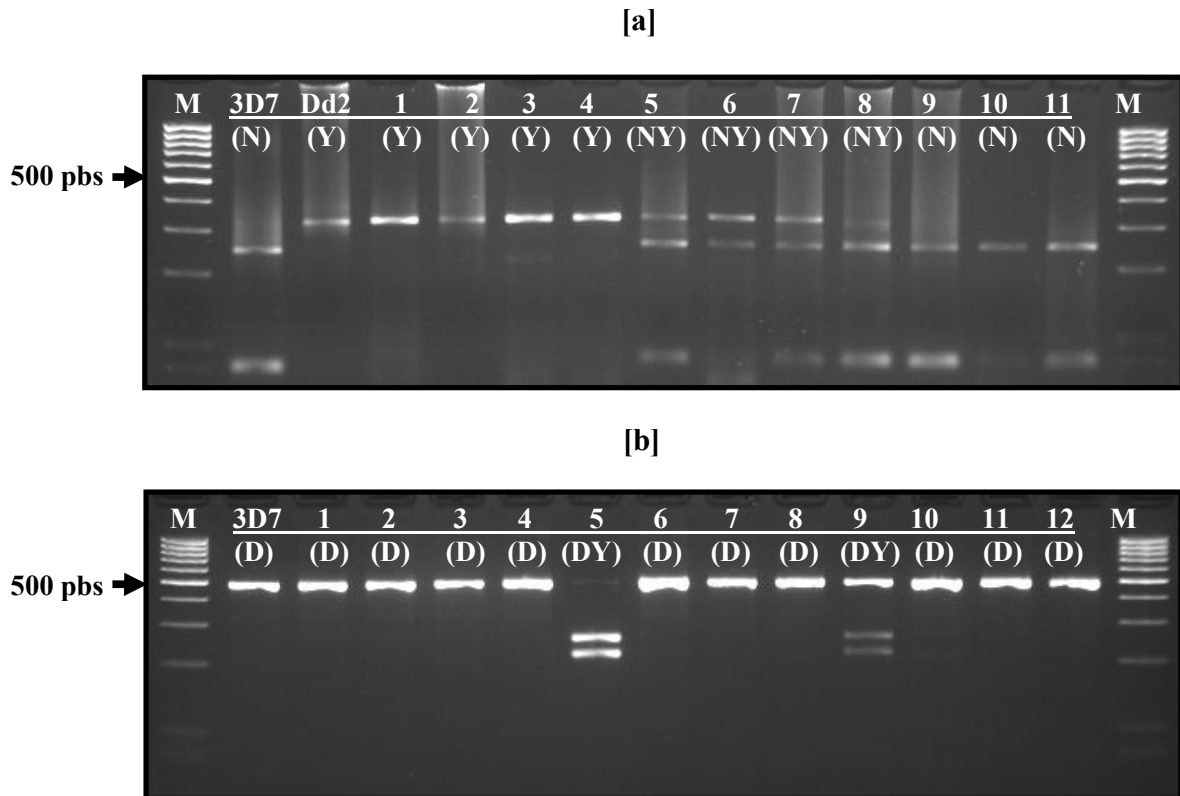
### III.2. Pesquisa de polimorfismos genéticos de *P. falciparum* e sua prevalência.

A pesquisa dos polimorfismos nos genes *pfmdr1*, *pfcr1*, *pfdhfr*, *pfdhps* e *y-GCS* foi efectuada em 74 amostras em que se detectou a espécie *P. falciparum* em infecções simples previamente seleccionadas. Devido a alguns problemas experimentais e técnicos, nem sempre se obtiveram resultados para todas as amostras. Assim, foram analisadas com sucesso a totalidade das amostras de cada polimorfismo apresentado na Tabela em anexo 6).

#### III.2.1. Gene *Pfmdr1*

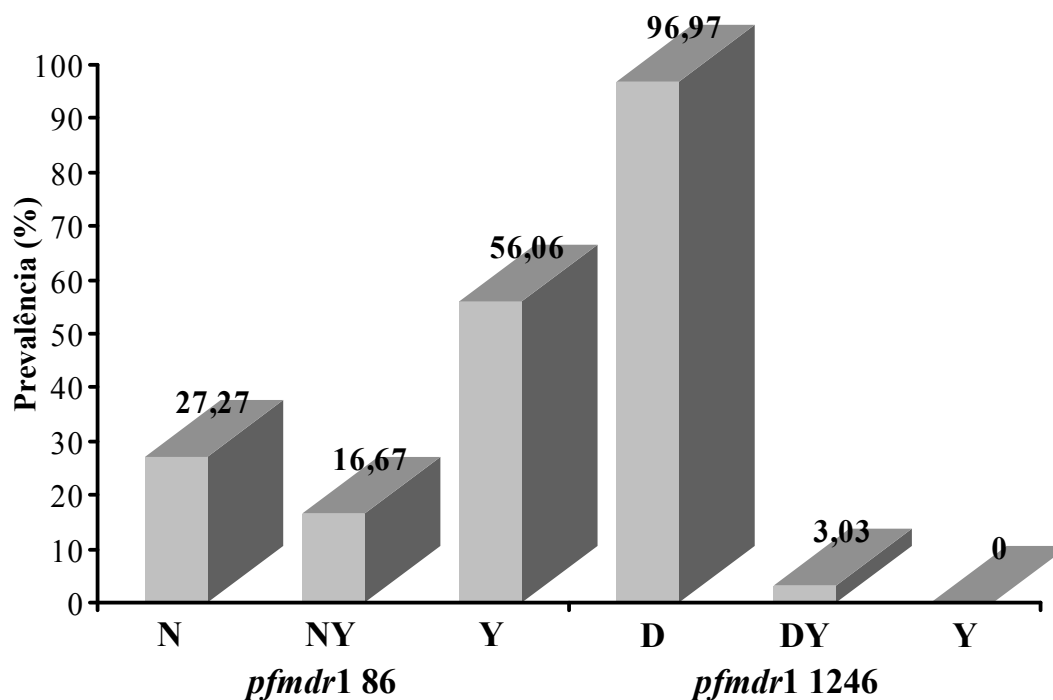
A identificação dos polimorfismos N86Y e D1246Y foi realizada por PCR-RFLP, previamente descrito (Lopes *et al.*, 2002b), tendo-se optimizado a técnica para as amostras em estudo. Após a amplificação por PCR as amostras foram incubadas com respectiva enzima de restrição e os produtos resultantes foram visualizados em gel de agarose a 3%. Verificou-se que todos os ensaios produziram os resultados esperados após a ligeira optimização (Figura 16).

## Resultados



**Figura 16.** Géis de agarose 3% com resultados típicos de PCR-RFLP para identificação de polimorfismos no gene *pfmdr1* (M: marcador de peso molecular; *MassRuler™ DNA Ladder, Low Range* (Fermentas™); 3D7, Dd2: Controlos de genotipo conhecido; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12: isolados de *P. falciparum*. **[a]**. Identificação do polimorfismo N86Y. Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 86N: 249+72; alelo mutado 86Y: 321. **[b]**. Identificação do polimorfismo D1246Y. Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 1246D: 508; alelo mutado 1246Y: 268+240.

A determinação de polimorfismos, no codão 86 e 1246 do gene *pfmdr1*, foi realizado com sucesso em 66 dos 74 isolados incluídos no estudo. No codão 86, verificou-se uma predominância dos alelos mutantes 86Y em relação ao alelo alternativo *pfmdr1* 86N, tendo-se no entanto verificado a presença no mesmo isolado ambos os alelos (infecções mistas). No caso do resíduo 1246, os resultados revelaram a predominância do haplótipo característico do continente Asiático e Africano, 1246D. No entanto, observou-se a existência de portadores de infecções mistas (Figura 17 e Tabela em anexo 7).



**Figura 17.** Prevalência dos polimorfismos no gene *pfmdr1* (mistura de alelos: NY e DY; alelos selvagens: 86N e 1246D; alelos mutantes: 86Y e 1246Y).

### III.2.2. Gene *Pfcr1*

Para avaliação das frequências alélicas relativa à mutação K76T recorreu-se a uma técnica de PCR-RFLP anteriormente descrita (Lopes *et al.*, 2002b), procedendo-se às optimizações para as amostras incluídas no âmbito deste estudo. Após a amplificação por PCR, as amostras foram incubadas com a respectiva enzima de restrição e os produtos resultantes foram visualizados em gel de agarose a 3%. Verificou-se que todos os ensaios produziram os resultados esperados após a ligeira optimização (Figura 18).

Relativamente à detecção do polimorfismo *pfcr1* N75E recorreu-se à técnica de *multiplex PCR* desenvolvida anteriormente por Isabel Ferreira (UEI Malária, IHMT e CMDT), em que na posição 75 nenhum dos alelos cria um local de hidrólise enzimática e neste resíduo pode estar contido a asparagina (N) ou o ácido glutâmico (E), codificados por

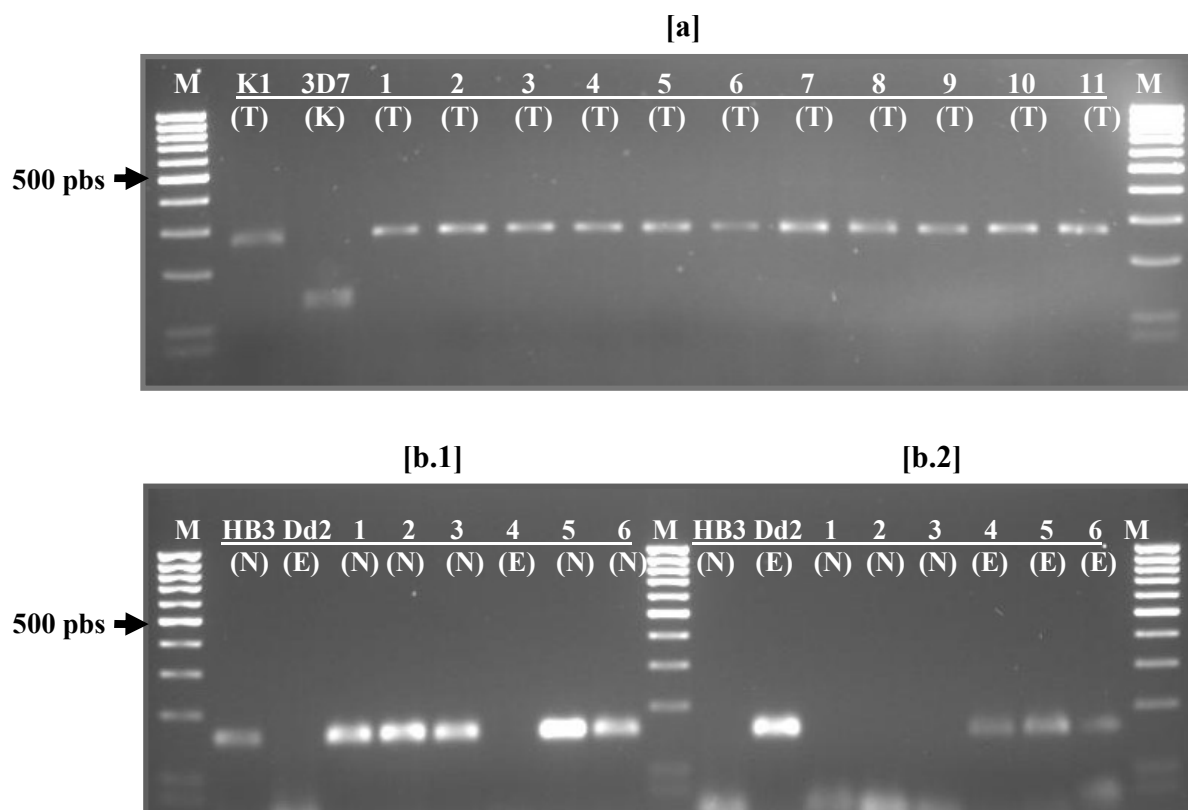
## *Resultados*

---

AAT e GAA, respectivamente. A aplicação da técnica para a identificação do polimorfismo N75E foi primeiramente confirmada e validada com os clones de *P. falciparum* Hb3 e Dd2 que possuem nessa posição uma asparagina (N) e um ácido glutâmico (E), respectivamente, tendo revelado especificidade óptima, e posteriormente tendo sido utilizados como controlos nas reacções de análise dos isolados colhidos (Figura 18.b1 e b2). Em seguida, cada amostra foi sujeita a duas amplificações por PCR: uma para detectar especificamente o alelo 75N e a outra para o alelo 75E.

Infecções clonais geram um só produto amplificado numa das duas reacções, enquanto infecções mistas irão gerar amplificações em ambos os PCRs (Figura 18. b1 e b2).

## Resultados

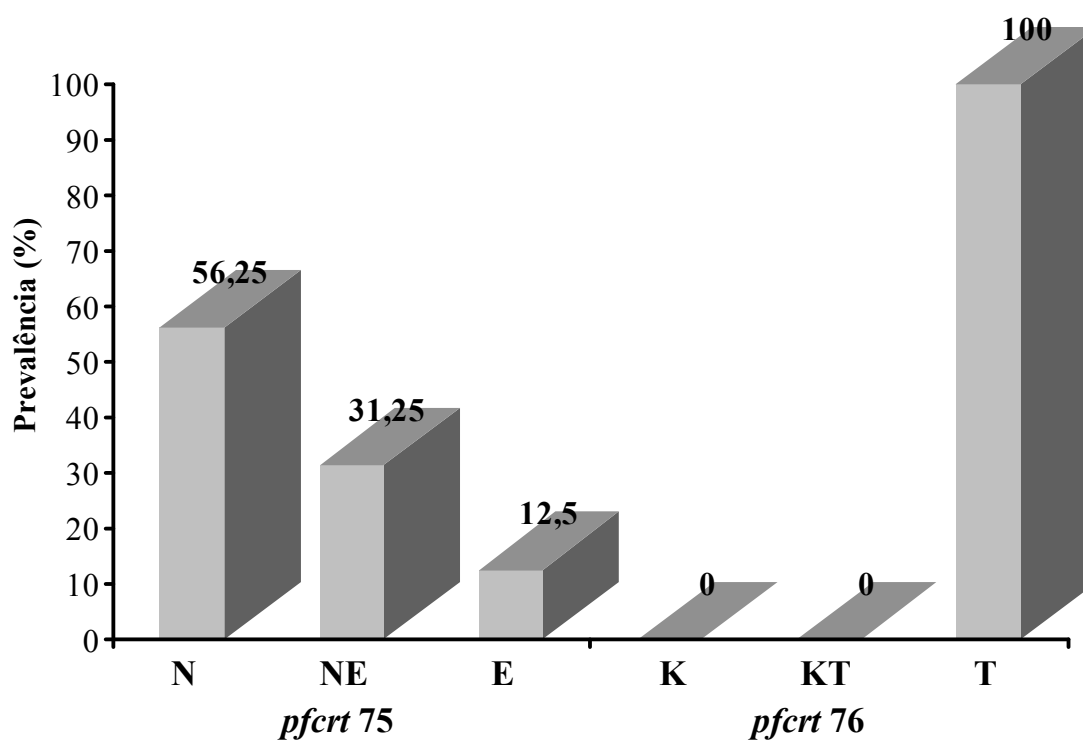


**Figura 18.** Géis de agarose 3% com resultados típicos de PCR-RFLP para identificação de polimorfismos no gene *pfert* (M: marcador de peso molecular; *MassRuler™ DNA Ladder, Low Range* (Fermentas™); K1, 3D7, HB3, Dd2: Controlos de genótipo conhecido; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11: isolados de *P. falciparum*).

**[a].** Identificação do polimorfismo K76T. Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 76K: 137+124+10; alelo mutado 76T: 261+10.

**[b.1] e [b.2]:** Identificação do polimorfismo N75E. **[b.1].** Resultados de *mutation specific* PCR para 75N, com primers específicos para amplificação de alelo N; **[b.2].** Resultados de *mutation specific* PCR para 75E, com primers específicos para amplificação de alelo E.

Com as técnicas acima referidas, foram pesquisadas as mutações N75E e K76T do gene *pfert* com sucesso em 48 e 59 isolados, respectivamente. O alelo mutante 76T demonstrou total predominância, tendo-se verificado uma completa ausência de parasitas portadores de genótipos selvagens 76K. No caso do resíduo 75, o alelo selvagem 75N e portadores de infecções mistas 75NE, demonstraram ser mais predominantes do que o alelo mutante 75E (Figura 19 e Tabela em anexo 7).

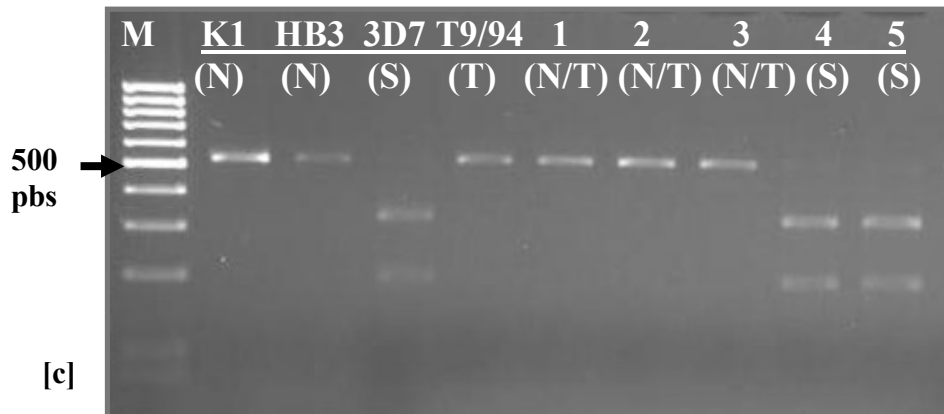
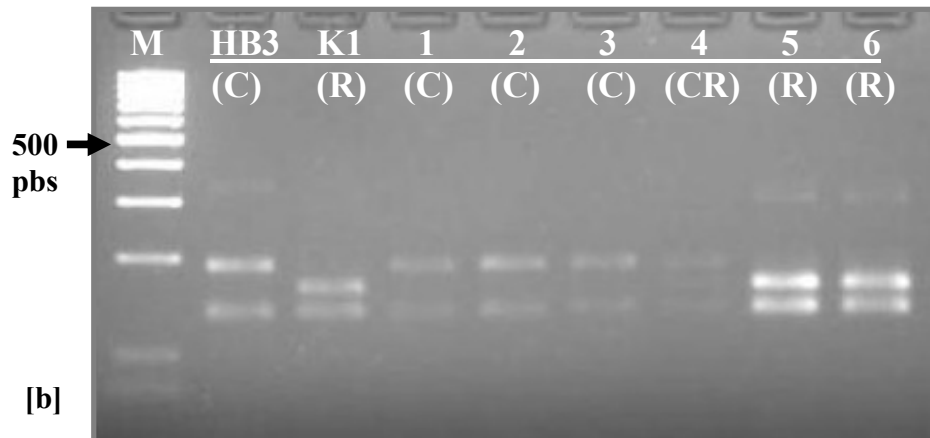
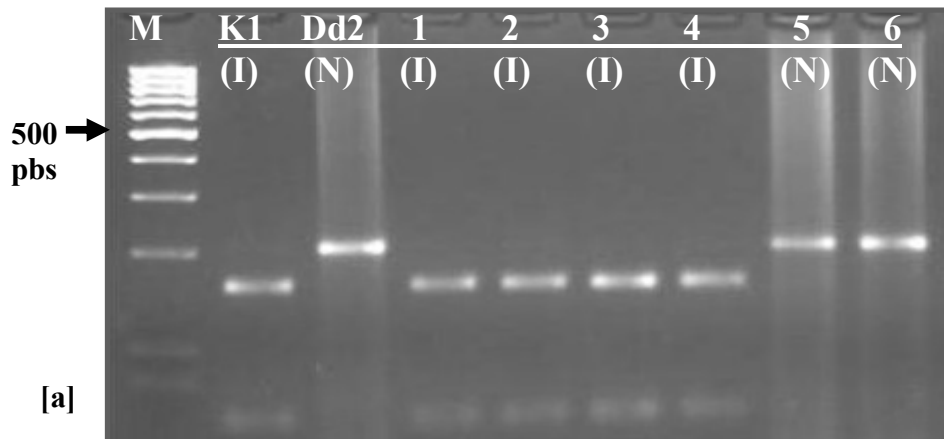


**Figura 19.** Prevalência dos polimorfismos no gene *pfert* (mistura de alelos: NE e KT; alelos selvagens: 75N e 76K; alelos mutantes: 75E e 76T).

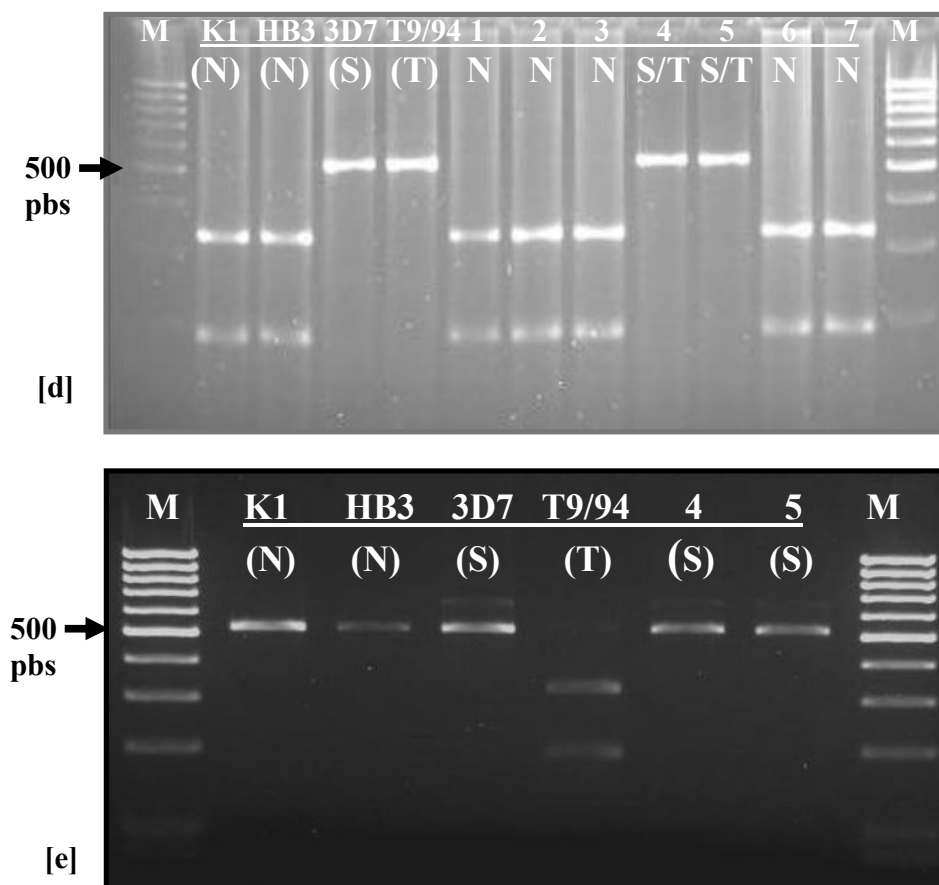
### III.2.3. Gene *Pfdhfr*

A pesquisa dos polimorfismos N51I, C59R e S108N/T foi realizada por PCR-RFLP, previamente descritos (Duraisingh *et al.*, 1998), tendo-se otimizado a técnica para as amostras em estudo. Após a amplificação por PCR, as amostras foram incubadas com a respectiva enzima de restrição e os produtos resultantes foram visualizados em gel de agarose a 3%. Verificou-se que todos os ensaios produziram os resultados esperados após ligeira otimização (Figura 20 a-d). Os resultados obtidos permitiram verificar que a mutação S108T não está presente em nenhuma das amostras deste estudo. No entanto, a mutação alternativa S108N foi encontrada na maior parte das amostras, enquanto que 2/74 isolados possuíam “alelo selvagem” (S) (Figura 20. [e]).

*Resultados*



## Resultados



**Figura 20.** Géis de agarose 3% com resultados típicos de PCR-RFLP para identificação de polimorfismos no gene *pfdhfr* (M: marcador de peso molecular; *MassRuler™ DNA Ladder, Low Range* (Fermentas™); K1, Dd2, HB3, 3D7, T9/94: Controlos de genótipo conhecido; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: isolados de *P. falciparum*).

**[a].** Identificação do polimorfismo N51I. Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 51N: 206; alelo mutado 51I: 153+53.

**[b].** Identificação do polimorfismo C59R. Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 59C: 189+137; alelo mutado 59R: 162+137+27.

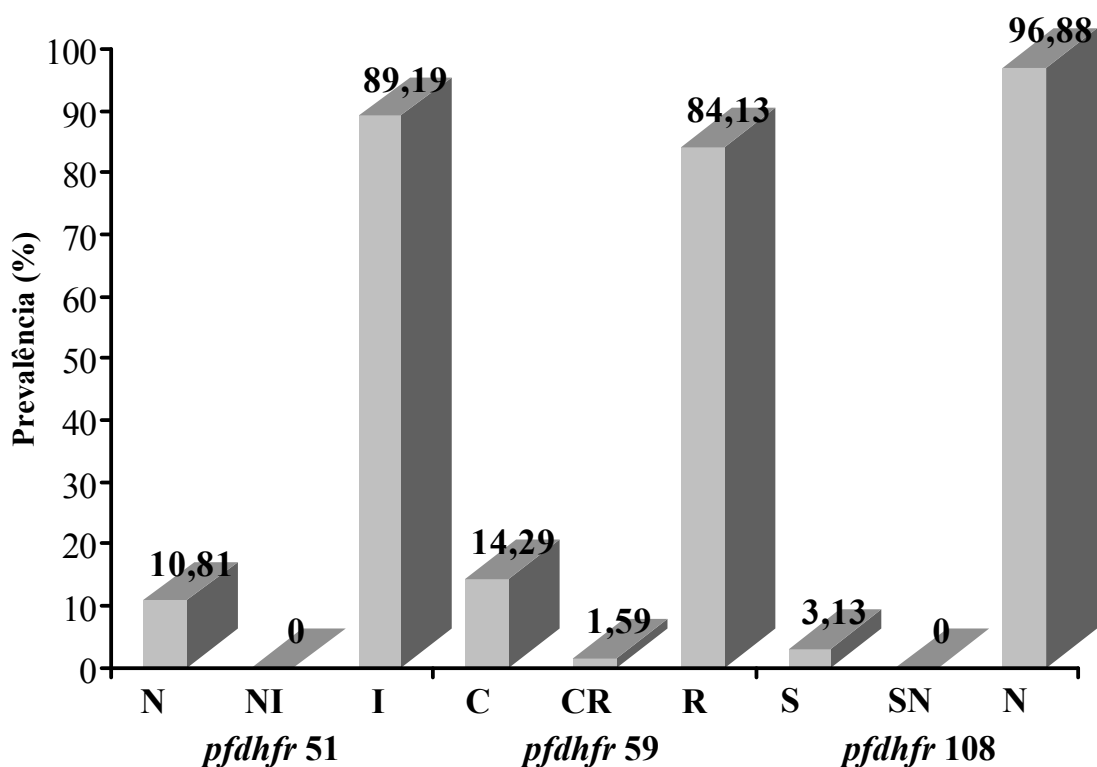
**[c].** Identificação do polimorfismo S108N/T. Fragmentos esperados após a restrição com enzima *AluI* (pbs): alelo selvagem 108S: 326+196; alelo mutado 108N/T: 522.

**[d].** Identificação do polimorfismo S108N/T. Fragmentos esperados após a restrição com enzima *BseNI* (pbs): alelo selvagem 108S: 552; alelo mutado 108N: 332+190.

**[e].** Identificação do polimorfismo S108N/T. Fragmentos esperados após a restrição com enzima *MvaI* (pbs): alelo selvagem 108S: 552; alelo mutado 108N: 326+196.

No gene *pfdhfr*, foram analisados com sucesso 74, 63 e 64 isolados respectivamente, relativamente aos polimorfismos 51, 59 e 108. Os resultados observados apresentam uma prevalência significativamente superior dos alelos mutantes 51I, 59R e 108N do que os seus

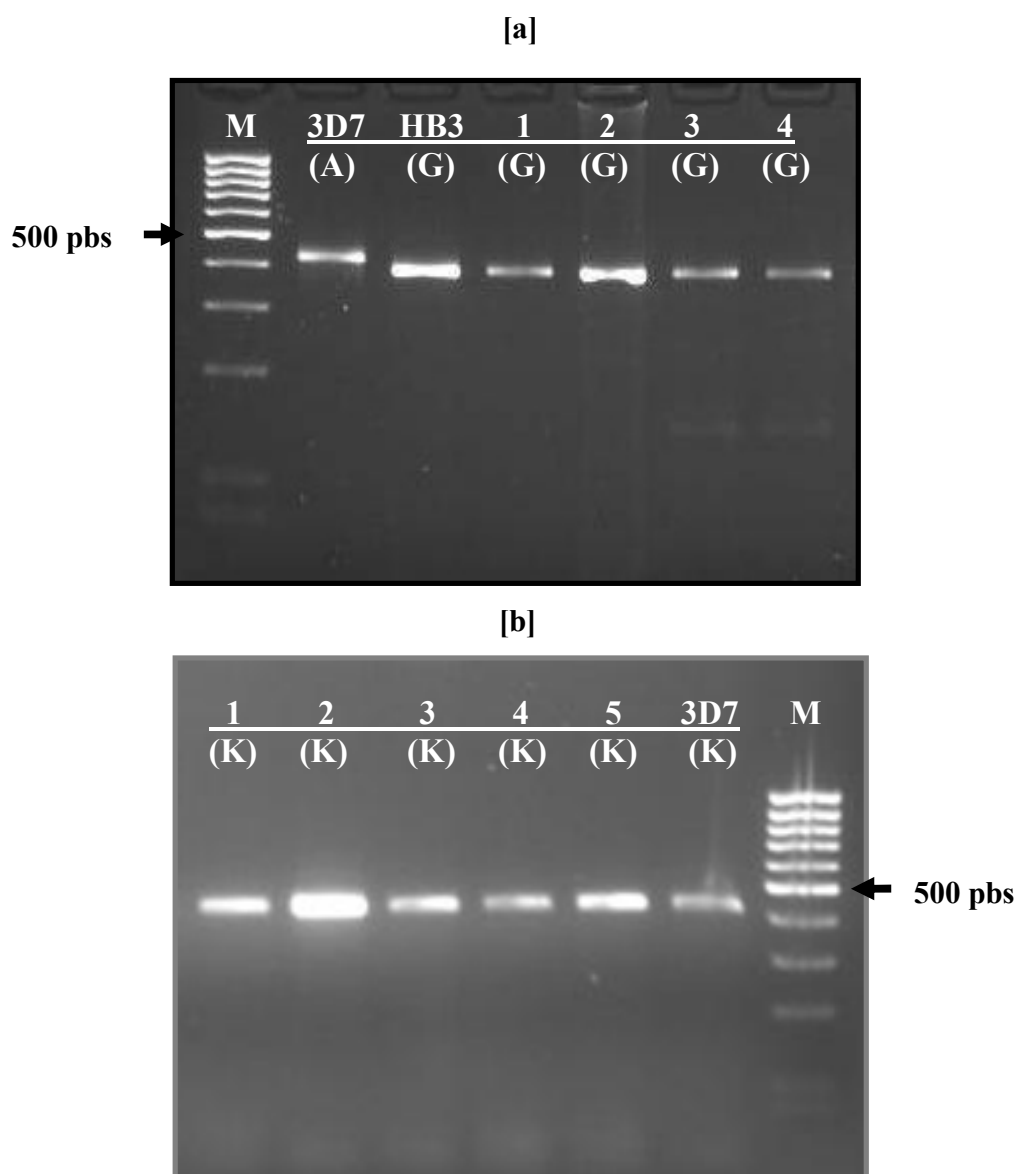
alternativos selvagens, verificando-se apenas um isolado na população parasitada com infecções mistas (I+R) no codão 59 (Figura 21 e Tabela em anexo7).



**Figura 21.** Prevalência dos polimorfismos no gene *pfdhfr* (mistura de alelos: NI, CR e SN; alelos selvagens: 51N, 59C e 108S; alelos mutantes: 51I, 59R e 108N).

#### III.2.4. Gene *Pfdhps*

Na avaliação do gene *Pfdhps*, os produtos resultantes do DNA amplificado por PCR foram submetidos a hidrólise com a respectiva enzima de restrição por RFLP, usando protocolos previamente descritos (Duraisingh *et al.*, 1998). Os produtos resultantes foram visualizados em gel de agarose a 3%. Verificou-se que todos os ensaios produziram os resultados esperados após ligeira optimização (Figura 22).



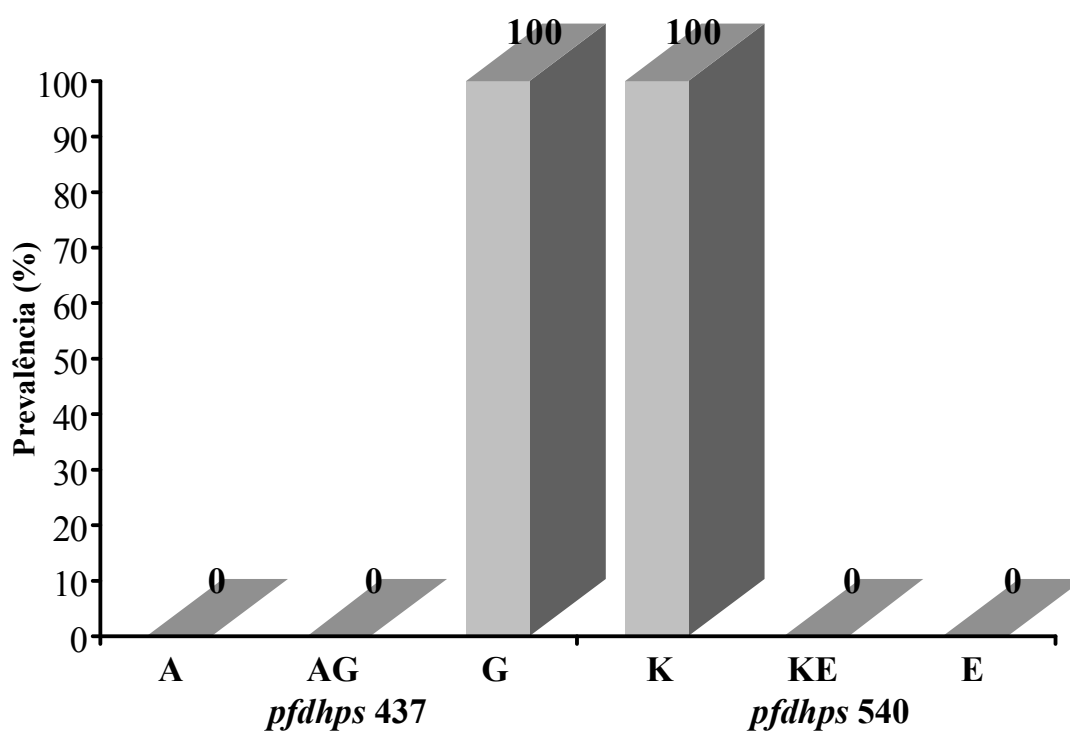
**Figura 22.** Géis de agarose 3% com resultados típicos de PCR-RFLP para identificação de polimorfismos no gene *pfdhps* (M: marcador de peso molecular; *MassRuler<sup>TM</sup> DNA Ladder, Low Range* (Fermentas<sup>TM</sup>); 3D7, HB3: Controlos de genótipo conhecido; 1, 2, 3, 4, 5: isolados de *P. falciparum*).

[a]. Identificação do polimorfismo A437G. Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 437A: 401+36; alelo mutado 437G: 437.

[b]. Identificação do polimorfismo K540E. Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 540K: 437; alelo mutado 540E: 345+92.

## Resultados

No gene *pfdhps* foram pesquisadas as mutações A437G e K540E com sucesso em 67 amostras de todos os isolados incluídos no estudo. A análise do polimorfismo *pfdhps* 437 revelou uma predominância elevada do alelo mutante 437G, em relação ao alelo selvagem 437A. Em contraste, no codão 540 verificou-se uma ausência completa do alelo mutante 540E. Em relação aos portadores de infecções mistas, estas não foram detectadas em nenhum dos isolados analisados (Figura 23 e Tabela em anexo 7).



**Figura 23.** Prevalência dos polimorfismos no gene *pfdhps* (mistura de alelos: AG e KE; alelos selvagens: 437A e 540K; alelos mutantes: 437G e 540E).

### III.2.5. Mutações Múltiplas no gene *pf dhfr* e *pf dhps*

Em relação à presença de múltiplas mutações no mesmo isolado (Figura 24 e Tabela em anexo 8), verificou-se uma frequência elevada dos isolados com duplas e triplas mutações no mesmo gene *dhfr*. Verificou-se ainda que um grande número de isolados era portador de 4 mutações distribuídas pelos genes *dhfr* e *dhps*. Nenhuma das amostras continha quintuplas mutações.

De todas as amostras estudadas nenhuma amostra exibiu a mutação 108N isoladamente (Tabela em anexo 6), apresentando-se esta sempre associada a outras (108N/51I, 108N/59R ou 108N/51I/59R).

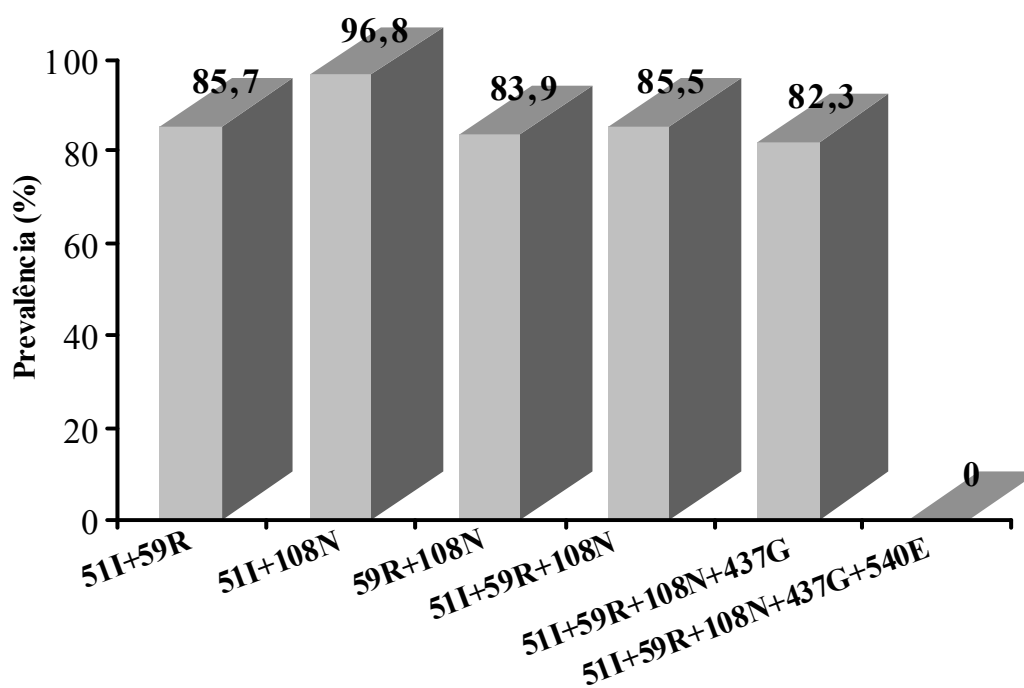


Figura 24. Mutações múltiplas entre codões nos gene *Pfdhfr* e *Pfdhps*.

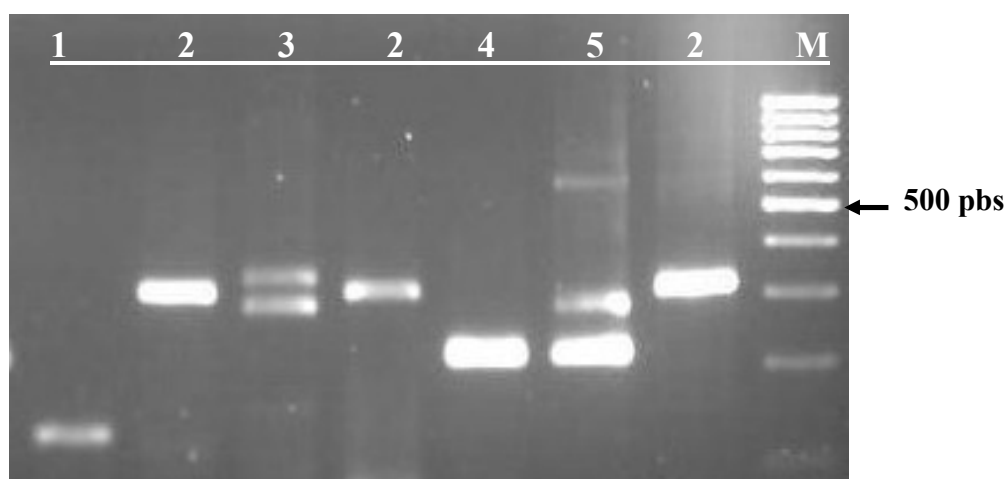
### III.2.6. Gene $\gamma$ -GCS ( $\gamma$ -glutamil-cisteinil sintetase)

No gene *Pfy-GCS* foi realizada a pesquisa de um polimorfismo de tamanho, anteriormente descrito entre estirpes diferentes de *P. falciparum* (Luersen *et al.*, 1999). A

## Resultados

proteína codificada por este gene, a  $\gamma$ -GCS, apresenta uma inserção na posição 514, que pode variar no seu número de aminoácidos. Essas inserções são sequências repetidas da sequência YQSNLQQQ (Luersen *et al.*, 1999). Esta análise foi incluída neste estudo após se ter verificado a existência deste polimorfismo de tamanho nos isolados de RDSTP (República Democrática de São Tomé e Príncipe) (Isabel Ferreira, comunicação pessoal). Nestes isolados, após a sequenciação da porção do gene onde a mesma se insere, confirmou-se que este polimorfismo de tamanho se deve a inserções de sequências repetitivas ricas em glutamina.

Para alargar o conhecimento sobre a representação intra-populacional desse polimorfismo foi realizada a sua pesquisa recorrendo a análise de tamanho dos produtos de PCR em gel de agarose, utilizando *primers* flanqueadores da sequência polimórfica em 74 amostras, tendo-se analisado com sucesso em 61 amostras de todos os isolados incluídos no estudo. Após a visualização dos produtos amplificados, verificou-se existir um elevado grau de polimorfismo de tamanho ao nível intra-populacional (Figura 25). Foram encontrados 5 alelos com diferentes tamanhos. Os diferentes tamanhos foram organizados de 1 a 5 por ordem crescente do tamanho. Os resultados relativos à caracterização de cada um dos isolados estão apresentados na (Tabela em anexo 6).



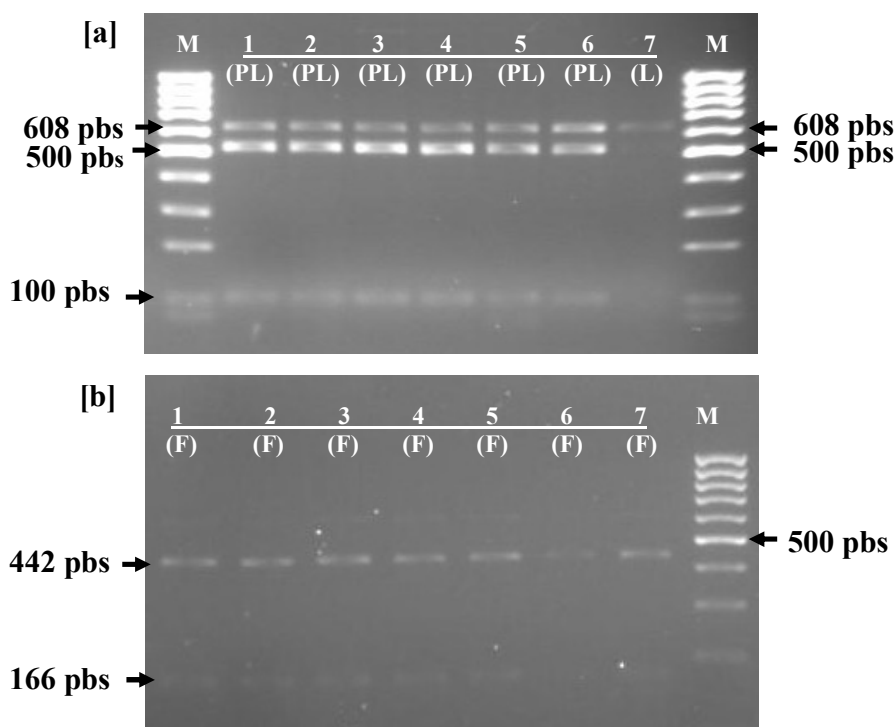
**Figura 25.** Gel agarose 3% com resultados da pesquisa do polimorfismo de tamanho do gene Y-GCS ( $\gamma$ -glutamyl-cisteinil sintetase). (M -marcador de peso molecular: MassRuler™ DNA Ladder, Low Range (Fermentas™); 1, 2, 3, 4 e 5: Isolados de *P. falciparum* com alelos de diferentes tamanhos; o isolado 3 e 5 representa uma mistura de dois alelos de diferente tamanho).

### III.3. Pesquisa de polimorfismos genéticos de *P. vivax* e sua prevalência.

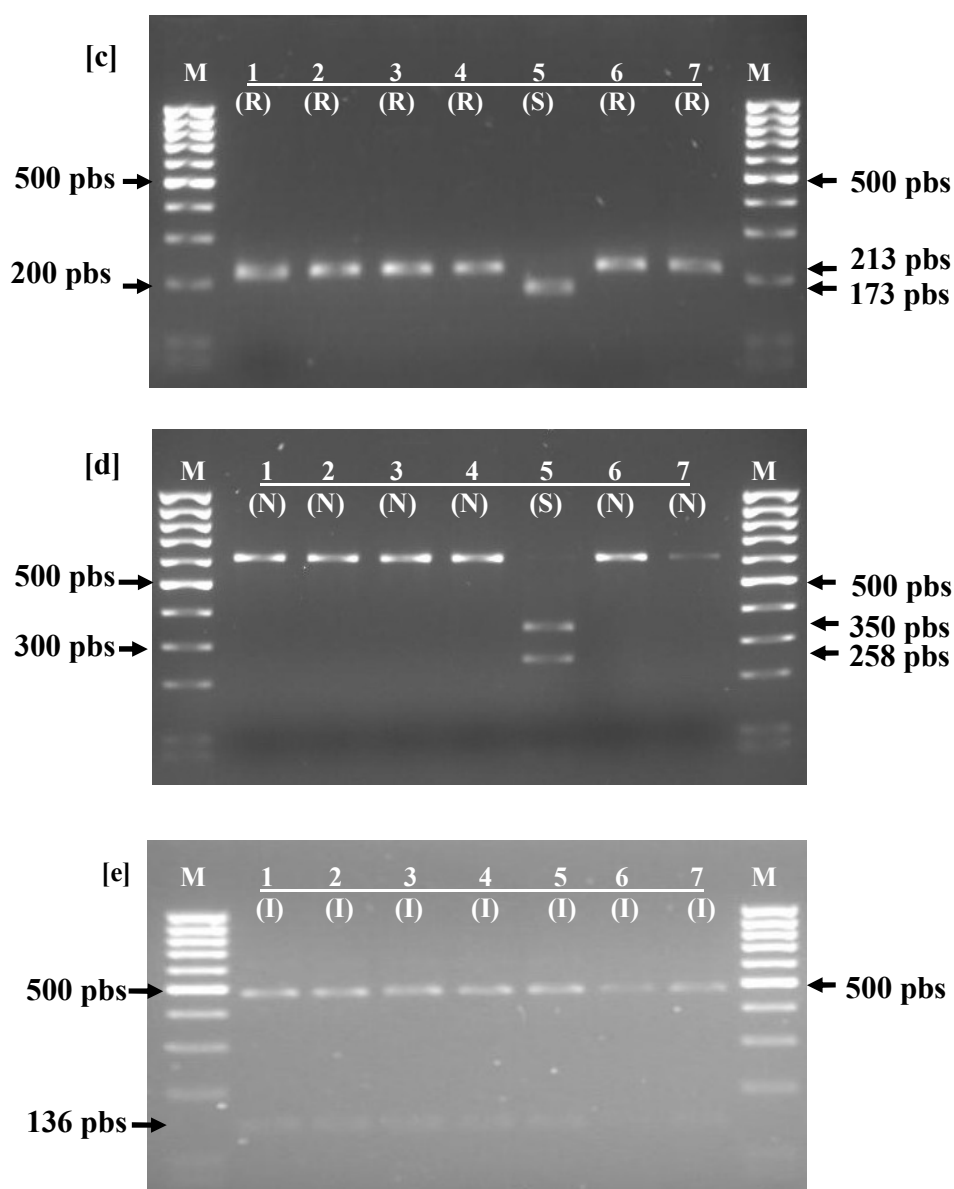
A pesquisa dos polimorfismos nos genes *pvdhfr* e *pfdhps* foi efectuada nas 49 amostras infectadas por *Plasmodium vivax*, incluindo 6 amostras com infecções mistas (*P. falciparum* + *P. vivax*) previamente seleccionadas. De todas as amostras analisadas, não se conseguiu obter produtos de PCR em todos os casos, devido a alguns problemas experimentais e técnicos. As amostras amplificadas com sucesso, foram analisadas e obtiveram-se resultados para todas as amostras (Tabela em anexo 9).

#### III.3.1. Gene *Pvdhfr*

A detecção dos polimorfismos do gene *pvdhfr*, foi realizada por PCR-RFLP, previamente descrito (Imwong *et al.*, 2001), tendo-se optimizado a técnica para as amostras em estudo. Após a amplificação por PCR as amostras foram incubadas com a respectiva enzima de restrição e os produtos resultantes foram visualizados em gel de agarose a 3%. Verificou-se que todos os ensaios produziram os resultados esperados após a ligeira optimização (Figura 26).



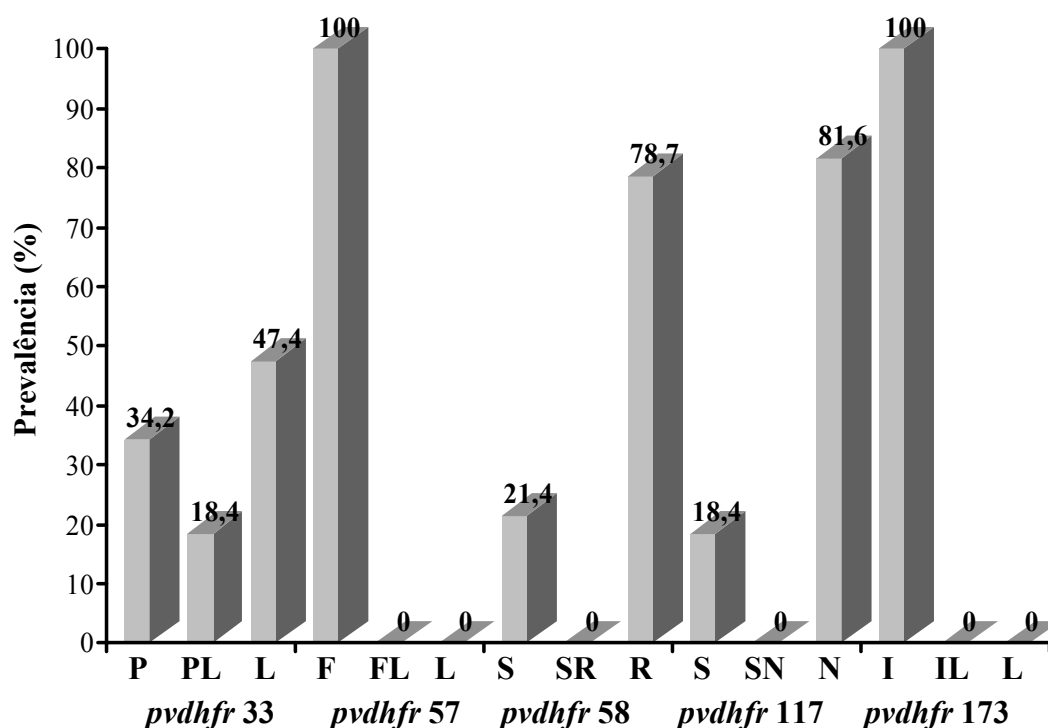
## Resultados



**Figura 26.** Géis de agarose a 3% com resultados típicos de PCR-RFLP para identificação de polimorfismos no gene *pvdhfr* (M: marcador de peso molecular; *MassRuler™ DNA Ladder, Low Range* (Fermentas™); 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: isolados de *P. vivax*; **[a]**. Identificação do polimorfismo P33L. Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 33P: 508+100; alelo mutado 33L: 608; **[b]**. Identificação do polimorfismo F57L. Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 57F: 442+166; alelo mutado 57L: 608; **[c]**. Identificação do polimorfismo S58R. Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 58S: 173+40+20; alelo mutado 58R: 213+25; **[d]**. Identificação do polimorfismo S117N. Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 117S: 350+258; alelo mutado 117N: 608; **[e]**. Identificação do polimorfismo I173L. Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 173I: 472+136; alelo mutado 173L: 380+136+92.

## Resultados

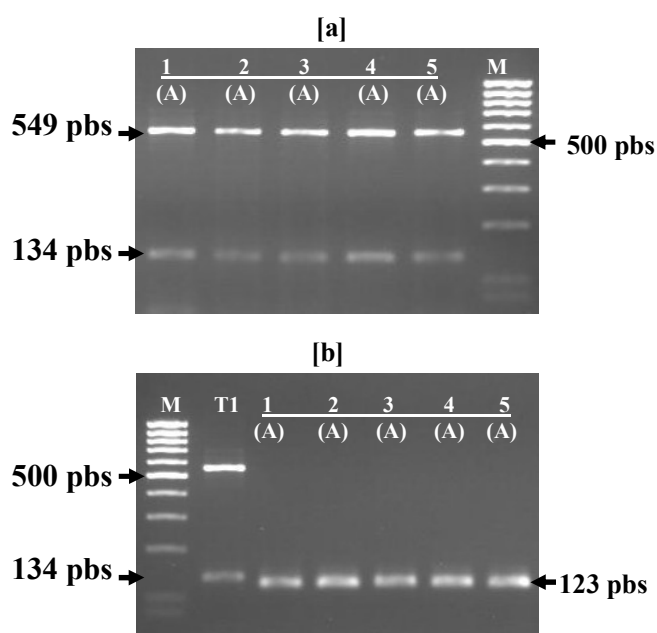
A pesquisa das mutações P33L, F57L, S117N, I173L foi realizada com sucesso em 38 isolados, enquanto que a pesquisa da mutação S58R foi efectuada com sucesso em 43 da totalidade dos isolados analisados do gene *pvdhps*. Os resultados revelaram uma predominância dos alelos mutantes 117N e 58R, tendo-se no entanto verificado a existência de alelos selvagens em circulação. No caso dos polimorfismos 57 e 173, verificou-se uma ausência dos alelos mutados, circulando na população analisada exclusivamente os alelos selvagens 57F e 173I. Em contraste, no polimorfismo 33 os resultados mostraram uma distribuição ligeiramente predominante do alelo mutante em relação ao seu alternativo selvagem (Figura 27 e Tabela em anexo 10).



**Figura 27.** Resultados da análise dos polimorfismos de gene *pvdhfr*, bem como as frequências alélicas relativos aos codões em estudo.

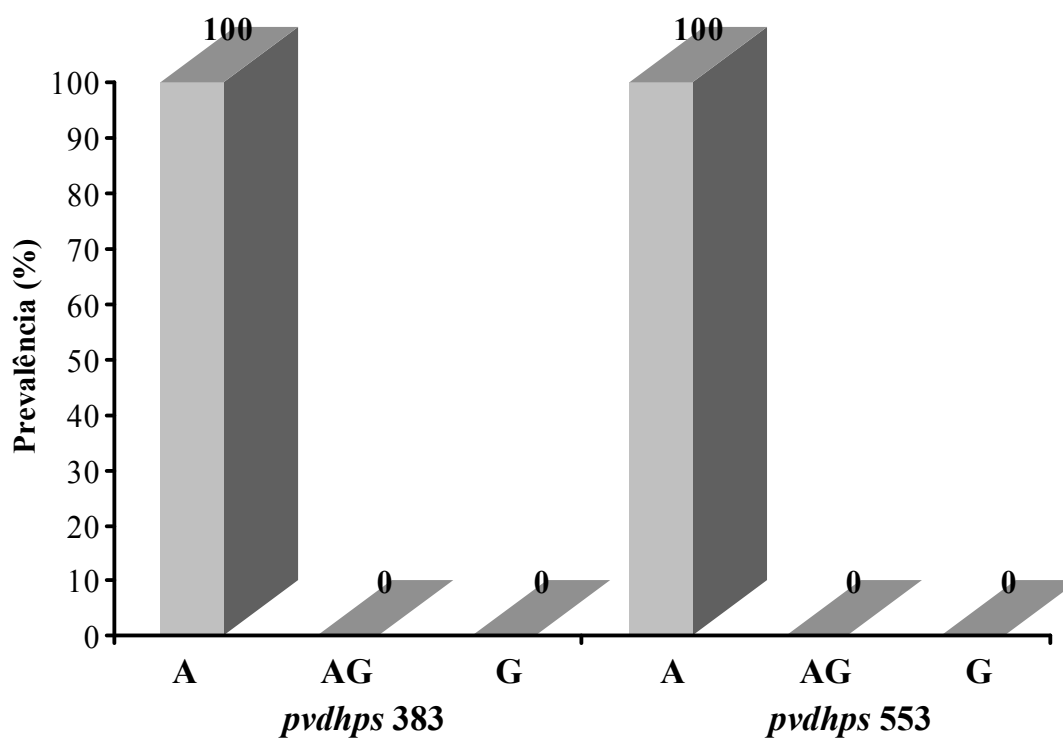
### III.3.2. Gene *Pvdhps*

A pesquisa dos polimorfismos A383G e A553G do gene *pvdhps*, foi realizada por PCR-RFLP, previamente descrito (Imwong *et al.*, 2005), tendo-se otimizado a técnica para as amostras em estudo. Após a amplificação por PCR as amostras foram incubadas com a respectiva enzima de restrição e os produtos resultantes foram visualizados em gel de agarose a 3%. No codão 553, após digestão, observaram-se fragmentos com tamanho bastante próximo entre o alelo selvagem e o alelo mutante, respectivamente de 123 pbs e 134 pbs. Para tal, utilizou-se como controlo positivo (mutante) um dos produtos digeridos do codão 383 com tamanho de 134 bps, permitindo que a distinção do alelo selvagem e mutante fosse observada no gel de agarose. Verificou-se que todos os ensaios produziram os resultados esperados (Figura 28), demonstrando que a metodologia poderia ser aplicada posteriormente.



**Figura 28.** Géis de agarose 3% com resultados típicos de PCR-RFLP para identificação de polimorfismos no gene *pvdhps* (M: marcador de peso molecular; *MassRuler™ DNA Ladder, Low Range* (Fermentas™); T1: Um dos produtos digeridos com alelo selvagem 383A: 549+134+20 pbs. O tamanho 134 pbs foi utilizado como controlo de génotipos mutante; 1, 2, 3, 4, 5: isolados de *P. vivax*; [a]. Identificação do polimorfismo A383G. Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 383A: 549+134+20; alelo mutado 383G: 498+134+51+20. [b]. Identificação do polimorfismo A553G. Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 553A: 123+20+16+11; alelo mutado 553G: 134+20+16.

No gene *pvdhps* codão 383 e 553, a análise foi realizada com sucesso em 31 e 46 isolados respectivamente, tendo se demonstrado uma completa ausência de parasitas portadores de génotipos mutantes em circulação na região (Figura 29 e Tabela em anexo 10).



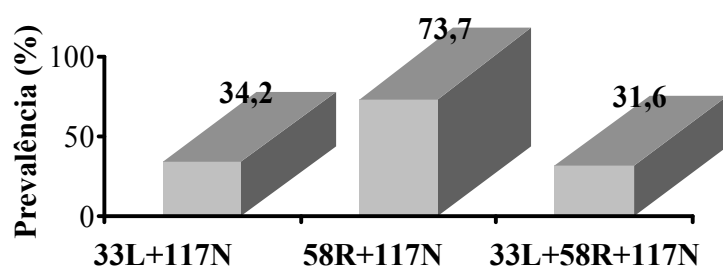
**Figura 29.** Resultados da análise dos polimorfismos de gene *pvdhps*, bem como as frequências alélicas relativos aos códons em estudo.

### III.3.3. Mutações Múltiplas no gene *pvdhfr* e *pvdhps*

Quanto às múltiplas mutações, os resultados revelaram uma frequência elevada de isolados com duplas e triplas mutações no mesmo gene *dhfr* (Figura 30 e Tabela em anexo 11). De todas as amostras estudadas nenhuma amostra exibiu a mutação 117N isoladamente (Tabela em anexo 9), apresentando-se sempre associada a mais uma (117N/58R, 117N/33L). Nenhuma das amostras continha mutações quádruplas distribuídas pelos genes *pvdhfr* e *pvdhps*.

## Resultados

---



**Figura 30.** Mutações múltiplas entre codões estudados no gene *Pvdhfr*.