ROSA DEL CARMEN MILUSKA VARGAS RODRIGUEZ

**Resistência à cloroquina em *Plasmodium vivax*: avaliação
fenotípica e molecular na Amazônia Ocidental Brasileira**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2012

ROSA DEL CARMEN MILUSKA VARGAS RODRIGUEZ

**Resistência à cloroquina em *Plasmodium vivax*: avaliação
fenotípica e molecular na Amazônia Ocidental Brasileira**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Parasitologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação
Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira.

Versão corrigida. A versão original eletrônica
encontra-se disponível tanto na Biblioteca do
ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Vargas-Rodriguez, Rosa Del Carmen Miluska.

Resistência à cloroquina em *Plasmodium vivax*: avaliação fenotípica e molecular na Amazônia Ocidental Brasileira / Rosa Del Carmen Miluska Vargas Rodriguez. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Epidemiologia Molecular da Malária.

Versão do título para o inglês: Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*: molecular and phenotypic evaluation in the Brazilian Western Amazon.

1. *Plasmodium vivax* 2. Cloroquina 3. Mefloquina
4. Resistência às drogas antimaláricas 5. Ensaio de maturação de esquizonte 6. Gene pvmdr-1 I. Ferreira, Prof. Dr. Marcelo Urbano II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0114/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rosa Del Carmen Miluska Vargas Rodriguez.

Título da Dissertação: Resistência à cloroquina em *Plasmodium vivax*: avaliação fenotípica e molecular na Amazônia Ocidental Brasileira.

Orientador(a): Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira.

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

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) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 23 de abril de 2010.

PARECER 936/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, na sessão de 25.03.2010 APROVOU o projeto intitulado: "*Resistência in vitro de Plasmodium vivax a Cloroquina em Acrelândia - Brasil*" sob responsabilidade de execução dos autores Prof. Dr. **Marcelo Urbano Ferreira** e a aluna ROSA DEL CARMEN MILUSKA VARGAS RODRIGUEZ.

Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **25.03.2011**

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO MARINHO ANDRADE ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

À Deus, por seu infinito Amor, ao me obsequiar
cada dia a vida, a saúde e as pessoas que
amo.

Aos meus queridos pais Martha Luz e Felipe
Segundo, por seu amor, apoio incondicional e
pelo exemplo de dedicação e fé.

Aos meus queridos irmãos Martha Natalí e Juan
Felipe, por seu amor, compreensão e sábios
conselhos.

À minha família, por ter me acompanhado e
motivado sempre apesar da distância.

Às minhas queridas amigas:

Márcia, por sua maravilhosa amizade, carinho e apoio, ainda nos momentos mais difíceis.

Michelle, por sua bela amizade, adorável companhia e valiosos conselhos.

Melissa, por seu grande carinho, amizade, conselhos e apoio incondicional, sempre.

À todos vocês, dedico-lhes com muito amor o presente trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador o Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira, por ter me brindado com a oportunidade de realizar um sonho tão acalentado por mim, que foi desenvolver o meu mestrado no Brasil, aceitando me orientar, compartilhando seus valiosos conhecimentos e me apoiando sempre. O seu exemplo de trabalho e dedicação o levarei sempre comigo. Muito obrigada por tudo.

Ao Prof. Dr. Alejandro Miguel Katzin e à sua equipe de trabalho, pela generosidade ao me permitir desenvolver partes importantes do meu mestrado em seu laboratório, ter cedido gentilmente reagentes, materiais, equipamentos e pelas orientações e oportunidades de aprendizado que resultaram do convívio com vocês.

À Bióloga Maria José Menezes, pela amizade, afetuosa companhia e inestimável auxílio na preparação de materiais, nos experimentos e na coleta das amostras de sangue.

À Valnice de Jesus Peres, pela amizade, amabilidade e valiosas orientações na cultura dos parasitos. À senhora, sou muito agradecida por seus fundamentais conselhos que facilitaram muito o presente trabalho.

À Bioquímica-Farmacêutica Emilia Akemi Shiraishi Kimura, por todas as orientações e sugestões que me proporcionou.

Ao Biólogo Márcio Massao Yamamoto, pela amizade, especial suporte na preparação do material empregado e recomendações na cultura dos parasitos.

À Bacterióloga e Laboratorista Clínica Omaira Vera Lizcano, pela amizade, afetuosa companhia e ensinamentos durante a minha primeira viagem a Acrelândia.

Às autoridades de saúde de Acrelândia e Plácido de Castro por terem possibilitado que a nossa equipe trabalhasse com os microscopistas no diagnóstico e recrutamento dos pacientes infectados com malária vivax.

Aos meus prezados amigos microscopistas de Acrelândia, Plácido de Castro e Assentamento Rural Remansinho: Zilda Da Silva Santiago, Cleide Ferreira Nunes, Lucineia Aparecida Falcão de Almeida, Maria Seli Feijó Gomes, Lucio C. Saracini, José De Oliveira Lima e Raimundo Araújo, pela amizade, convivência fraterna e apoio incondicional no diagnóstico e coleta das amostras de sangue. Grande parte deste trabalho é devido a vocês e por isso lhes agradeço muito.

Aos médicos, enfermeiras, auxiliares e funcionários da Unidade Mista de Saúde de Acrelândia, pela afetuosa acolhida, assistência e colaboração sempre.

À Bióloga Amanda Begosso Gozze, pela amizade, afável companhia e valioso apoio na coleta das amostras de sangue durante nossa estadia no Acre.

À Bióloga Bianca Cechetto Carlos, pela amizade, compreensão, apoio constante na cultura dos parasitos e importantes ensinamentos.

Ao Biomédico Alexandre Yukio Saito, pela amizade, orientações e por compartilhar tão gentilmente seus conhecimentos e tempo comigo.

Aos Professores, Silvia Reni Bortolin Uliana, Mariano Gustavo Zalis e Paulo Cesar Cotrim, pelas correções e sugestões apresentadas no exame de qualificação.

Às minhas queridas amigas: Michelle, Vanessa, Raquel, Nathália, Priscila e Carol, pela amizade, carinho, maravilhosa companhia, colaboração e ensinamentos. Muito obrigada por tudo!

Aos pesquisadores, estudantes e amigos: Marly, Simone, Mônica, Márcia, Luciana, Bárbara, Krystel, Bruna, Lúcia, Neide, Ariel, Pablo, Dennis e Victor, pelo ameno convívio, assistência e colaboração durante o tempo que estivemos em Acrelândia.

À Maria e ao Francisco, pela afetuosa acolhida e agradável companhia em Acrelândia. Aos senhores, sou muito agradecida por seu apoio e disponibilidade que facilitaram muito o trabalho de campo.

Ao Departamento de Parasitologia do prestigioso Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), pela acolhida fraterna, ensinamentos e, principalmente, por ter me permitido desenvolver a minha tese de mestrado nas suas instalações.

Ao louvável Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG), que administrado conjuntamente pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e o Ministério das Relações Exteriores (MRE), possibilitou que eu realizasse meu mestrado no Brasil, outorgando-me assistência e auxílio financeiro. Assim também meu especial agradecimento à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela essencial assistência econômica fornecida a este trabalho.

Ao Governo do Brasil, por promover este convênio (PEC-PG) assim como outros que possibilitam que estudantes originários de países em vias de desenvolvimento realizem cursos de Pós-Graduação de alta qualidade em universidades do país.

À Ângela Maria Casemiro de Jesus, Wilma Garcia de Souza e Silvia Ferreira Camargo, pela prestatividade e gentileza nos esclarecimentos das informações relacionadas ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Parasitologia (ICB/USP).

À Rosangela Nunes Colombo, Lazara Correa Dorta Oliveira e Patrícia Ferreira, pela disponibilidade e amabilidade nos esclarecimentos das informações referentes ao Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG) da Pró-Reitoria de Pós-Graduação da USP.

Meu especial agradecimento a todos os pacientes que aceitaram participar do estudo e que gentilmente forneceram o material biológico aqui avaliado.

À população brasileira pela cordial acolhida, amabilidade e carinho que recebi durante os dois anos de estudo.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização do presente trabalho.

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse Amor, seria
como o metal que soa ou como o sino que tine.

E ainda que tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a
ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e
não tivesse Amor, nada seria.

O Amor é paciente e é benigno.
O Amor desculpa tudo, crê tudo, espera tudo, suporta tudo.
O Amor nunca falha.”

1 Coríntios 13,1-8.

RESUMO

Vargas-Rodriguez RCM. Resistência à cloroquina em *Plasmodium vivax*: avaliação fenotípica e molecular na Amazônia Ocidental Brasileira. [dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

A caracterização fenotípica e molecular é hoje uma importante ferramenta para o conhecimento de padrões de susceptibilidade às drogas antimaláricas em populações de parasitos circulantes em uma determinada região. No presente trabalho, avaliamos fenotípica e molecularmente isolados recém-coletados e criopreservados de *P. vivax* da Amazônia Ocidental Brasileira. A avaliação fenotípica de sensibilidade à cloroquina (CQ) foi realizada por meio do ensaio de maturação de esquizonte adaptado para *P. vivax*. A avaliação molecular efetuou-se utilizando duas técnicas de tipagem que permitiram investigar: (a) cinco polimorfismos de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphism* - SNP) não-sinônimos do gene *pvm-dr-1* (A266G, A1498G, A2722C, A2927T e T3226C) e (b) variações no número de cópias do mencionado gene. Em decorrência, o fenótipo de susceptibilidade à CQ nos 36 isolados de *P. vivax* aqui analisados não foi estabelecido, devido ao escasso desenvolvimento *ex-vivo* dos parasitos, sempre inferior aos 40% de esquizontes maduros, até mesmo realizando diversas modificações nas condições de cultura. Assim mesmo, entre os 80 isolados de *P. vivax* testados neste estudo, não foram observados mutações na posição Y976F, potencialmente associada à resistência à CQ. Além disso, a mutação F1076L, que frequentemente acompanha à mutação Y976F, foi observada em somente 10% dos isolados. De fato, a mutação Y976F parece ser rara na Amazônia Ocidental Brasileira visto que dos 228 isolados analisados neste estudo e em trabalho prévio, somente quatro (1,8%) apresentavam essa mutação. Finalmente, dois (0,9%) dos 215 isolados avaliados apresentaram duas cópias do gene *pvm-dr-1*, sugerindo que a duplicação gênica, potencial mecanismo de resistência à mefloquina, ainda não está disseminada nas populações de parasitos desta região.

Palavras-chave: *Plasmodium vivax*. Cloroquina. Mefloquina. Resistência às drogas antimaláricas. Ensaio de maturação de esquizonte. Gene *pvm-dr-1*. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). Duplicação gênica.

ABSTRACT

Vargas-Rodriguez RCM. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*: molecular and phenotypic evaluation in the Brazilian Western Amazon. [Masters thesis (Parasithology)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Molecular and phenotypic characterization constitutes nowadays a fundamental tool to understand the patterns of susceptibility to antimalarial drugs in circulating populations of parasites in a given region. In this study, we performed a molecular and phenotypic evaluation of cryopreserved and recently collected isolates of *P. vivax* from Brazilian Western Amazon. The phenotypic evaluation of chloroquine (CQ) sensitivity was performed using the schizont maturation assay adapted to *P. vivax*. The molecular evaluation was made using molecular typing techniques to investigate: (a) five non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *pvm-dr-1* gene (A266G, A1498G, A2722C, T3226C and A2927T) and (b) the variation of the copy number of this gene. As a result, the CQ susceptibility phenotype in 36 isolates of *P. vivax* analyzed was not established, due to the scarce *ex-vivo* development of the parasites, less than 40% of mature schizonts, despite of the several changes made in the culture conditions. Also, among the 80 isolates of *P. vivax* tested, no mutations were observed at position Y976F, potentially associated with the CQ resistance. Moreover, the F1076L mutation, which often accompanies the Y976F mutation, was observed only in 10% of the isolates. In fact, the Y976F mutation seems rare in the Brazilian Western Amazon since only four (1,8%) of the 228 isolates analyzed in this study and in a previous research, had this mutation. Finally, two isolates (0,9%), from a total of 215 had two copies of the *pvm-dr-1* gene, suggesting that the gene duplication, a potential mechanism of mefloquine resistance, is not spread in the parasites populations of this region.

Keywords: *Plasmodium vivax*. Chloroquine. Mefloquine. Antimalarial drug resistance. Schizont maturation assay. *pvm-dr-1* gene. Single nucleotide polymorphisms (SNPs). Gene duplication.

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Acre
AM	Amazonas
ATP	Adenosina trifosfato
CO₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E	Esquizonte
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
g	Grama
g	Gravidade
G	Gametócito
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina N-2-etanosulfônico
L	Litro
LB	Meio ou ágar Luria Bertani
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M	Média
NaCl	Cloreto de sódio
N₂	Nitrogênio
nM	Nanomolar
OMS	Organização mundial da saúde
O₂	Oxigênio
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>pvaldolase</i>	Gene da aldolase em <i>P. vivax</i>
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
18S rRNA	Gene da porção 18S do ácido ribonucléico ribossômico
rpm	Revoluções por minuto

seg	Segundo
TJ	Trofozoito jovem
TM	Trofozoito médio
TMA	Trofozoito maduro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 O controle da malária vivax como problema de saúde pública	20
1.2 A resistência aos antimaláricos	20
1.3 Mecanismos moleculares de ação da cloroquina	22
1.4 <i>Pvcrt-o</i>, <i>Pvmdr1</i> e resistência à cloroquina em <i>Plasmodium vivax</i>.....	23
2 OBJETIVOS.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Área de estudo	31
3.2 População	33
3.2.1 <i>Estudo fenotípico</i>	33
3.2.2 <i>Estudo molecular</i>	33
3.2.3 <i>Aspectos éticos da pesquisa</i>	34
3.2.4 <i>Processamento das amostras sanguíneas</i>	34
3.3 Preparo das microplacas com cloroquina e mefloquina	35
3.4 Preparo das colunas de celulose CF-11	36
3.5 Remoção de leucócitos das amostras sanguíneas.....	36
3.6 Criopreservação	37
3.7 Ensaios fenotípicos com amostras recém-coletadas de <i>P. vivax</i>.....	37
3.8 Ensaios fenotípicos com amostras criopreservadas de <i>P. vivax</i>.....	38
3.9 Diagnóstico molecular	40
3.10 Tipagem molecular.....	41
3.10.1 <i>Polimorfismos no gene pvmdr-1</i>.....	41
3.10.2 <i>Número de cópias do gene pvmdr-1</i>.....	42
4 RESULTADOS.....	48
4.1 Controle de qualidade das microplacas pré-sensibilizadas com cloroquina e mefloquina	49
4.2 Ensaios de maturação de esquizonte de amostras recém-coletadas de <i>P. vivax</i> realizados em 2010.....	51

4.3 Ensaio de maturação de esquizonte de amostras criopreservadas de <i>P. vivax</i>	52
4.4 Ensaio de maturação de esquizonte de amostras recém-coletadas de <i>P. vivax</i> realizados em 2011	52
4.5 Cultura <i>ex-vivo</i> de curto prazo baseada em Udomsangpetch et al. (2008)	59
4.6 Cultura <i>ex-vivo</i> de curto prazo baseada em Chotivanich et al. (2001).....	66
4.7 Tipagem molecular	70
4.7.1 Polimorfismos no gene <i>pvmdr-1</i>	70
4.7.2 Número de cópias do gene <i>pvmdr-1</i>	71
5 DISCUSSÃO	72
6 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS.....	89
ANEXOS	96
ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes menores de 18 anos.....	97
ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes adultos	100

1 INTRODUÇÃO

1.1 O controle da malária vivax como problema de saúde pública

Estima-se que *Plasmodium vivax* cause entre 130 e 390 milhões de casos anuais de malária em todo o mundo (Hay et al., 2004), com 2,6 bilhões de indivíduos sob risco de infecção (Guerra et al., 2006). É o plasmódio humano de distribuição geográfica mais ampla e o segundo mais prevalente em todo o mundo. No Brasil, registram-se cerca de 300.000 casos anuais de infecção sintomática por *P. vivax*, sendo este plasmódio responsável por 85% dos 300.000 casos de malária humana diagnosticados no país em 2009 (Oliveira-Ferreira et al., 2010).

O controle de *P. vivax* é potencialmente mais difícil do que o das demais espécies, principalmente *P. falciparum*, por motivos como (a) o surgimento precoce de gametócitos no sangue periférico, que tornam possível a transmissão antes mesmo dos sintomas ocorrerem e o tratamento ser iniciado e (b) as dificuldades de prevenir recaídas, decorrentes da reativação de formas dormentes hepáticas conhecidas como hipnozoítos (Sattabongkot et al., 2003). Além disso, são comuns as infecções assintomáticas em populações endêmicas (Alves et al., 2002), reduzindo o impacto das medidas de controle baseadas exclusivamente no diagnóstico precoce e tratamento de infecções sintomáticas. Embora *P. vivax* seja historicamente relacionado a baixos níveis de mortalidade e morbidade, um número crescente de infecções graves e potencialmente fatais, muitas vezes com parasitos resistentes à cloroquina, vêm sendo registrado em todo o mundo (Price et al., 2009).

1.2 A resistência aos antimaláricos

O objetivo primário da quimioterapia é a erradicação dos estágios assexuados sanguíneos do parasito; são objetivos secundários eliminar os estágios hepáticos latentes (hipnozoítos), presentes nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, e interromper a transmissão vetorial, mediante a erradicação dos gametócitos circulantes. Por atuarem em diferentes fases do ciclo do parasito, os antimaláricos são classificados como esquizonticidas, hipnozoitocidas, gametocitocidas ou esporonticidas. Os esquizonticidas podem ter ação tecidual (esquizonticidas teciduais) ou sanguínea (esquizonticidas

sanguíneos). Destas, o Ministério da Saúde do Brasil fornece, para uso rotineiro, os seguintes medicamentos: cloroquina [CQ], primaquina, mefloquina, quinina, doxiciclina e artesunato, bem como as combinações arteméter-lumefantrina e artesunato-mefloquina.

Um parasito é considerado *resistente* quando é capaz de sobreviver e de multiplicar-se, em sua fase sanguínea assexuada, apesar da administração e absorção adequadas de um regime quimioterapêutico (Baird, 2009). São registrados atualmente casos de resistência de *P. falciparum* a todos os antimaláricos em uso clínico (Talisuna et al., 2004), inclusive aos derivados da artemisinina (Dondorp et al., 2009). *Plasmodium vivax* é naturalmente resistente aos antifolatos, mas esses compostos nunca foram largamente empregados contra essa espécie. Muito mais preocupante, entretanto, é a recente disseminação de resistência de *P. vivax* à CQ, o esquizotônico sanguíneo utilizado como droga de primeira linha no tratamento da malária vivax desde 1946 (Baird, 2009). A CQ, sintetizada inicialmente na década de 1930, é barata e bem tolerada; sua meia-vida longa oferece proteção contra recaídas logo após o tratamento. Entretanto, desde 1957 vem-se observando resistência de *P. falciparum* à CQ, que hoje ocorre globalmente. A resistência de *P. vivax* à CQ só veio a ser observada a partir de 1989, inicialmente em estudos clínicos em Papua Nova Guiné, mas logo se estendendo ao Sudeste e Sul da Ásia e, mais recentemente, à América do Sul (Baird, 2004). Como não existem protocolos para a manutenção de *P. vivax* em cultivo contínuo *in vitro*, os dados existentes sobre resistência restringem-se a ensaios clínicos e a estudos *ex-vivo*, em que os parasitos são mantidos em cultivo por curto período de tempo, sem reinvasão de hemácias. Na América do Sul, casos de baixa resposta terapêutica à CQ foram inicialmente observados na Colômbia em 1989 (Arias e Corredor, 1989) e, nas décadas seguintes, na Guiana (Phillips et al., 1996) e no Peru (Ruebush et al., 2003). No Brasil, há um único estudo publicado sobre padrões de resistência à CQ, baseado em 109 pacientes tratados em Manaus; destes, 10% apresentaram recidiva parasitária até 28 dias após o tratamento (de Santana Filho et al., 2007).

1.3 Mecanismos moleculares de ação da cloroquina

Em *P. falciparum*, a CQ acumula-se no vacúolo digestivo do parasito, formando complexos com ferriprotoporfirina IX, um subproduto da digestão de hemoglobina, e interferindo na formação do pigmento malárico (produto não-tóxico para o parasito). Os isolados de *P. falciparum* resistentes à CQ são capazes de impedir o acúmulo de CQ no interior do vacúolo digestivo, sobrevivendo a altos níveis desse composto (Krogstad et al., 1987). Em *P. vivax*, entretanto, o mecanismo de ação da CQ permanece desconhecido. Os trofozoítos médios e maduros de *P. vivax*, que acumulam bem menos pigmento malárico nas hemácias infectadas do que os estágios correspondentes de *P. falciparum*, são intrinsecamente resistentes à CQ, que parece inibir somente o desenvolvimento de trofozoítos mais jovens (Russell et al., 2008).

Para elucidar as bases genéticas da resistência à CQ em *P. falciparum*, no final dos anos 1980 foi realizado um cruzamento genético entre dois isolados do parasito, HB3 (sensível à CQ) e Dd2 (resistente à CQ), com caracterização fenotípica e genética da progênie (Wellems et al., 1990). Essa estratégia permitiu a identificação de um gene com 13 éxons, que apresentava 10 substituições de nucleotídeos que pareciam associadas com resistência à CQ em isolados provenientes da Ásia, África, Papua Nova Guiné e América do Sul. Neste gene, denominado *pfcr*t (*Plasmodium falciparum* *Chloroquine Resistance Transporter*), uma única substituição, K76T, mostrou-se subsequentemente preditora de resistência à CQ, tanto *in vitro* e *in vivo* (Djimde et al., 2001). O produto desse gene, uma proteína de 424 aminoácidos com 10 domínios transmembrana, presente na membrana do vacúolo digestivo do parasito, parece inibir a dimerização e posterior cristalização da ferroprotoporfirina IX. A mutação em *pfcr*t que confere resistência à CQ reduz a concentração desse composto no vacúolo digestivo do parasito.

Na década de 1990, observou-se que os mecanismos de resistência à CQ em *P. falciparum* apresentavam similaridades com o fenótipo de *multirresistência a drogas* (MDR) observado em células tumorais de mamíferos, que lhes permite desenvolver tolerância a um amplo espectro de compostos anticancerígenos estruturalmente não-relacionados (Endicott e Ling, 1989). O fenótipo MDR de células tumorais é mediado

pelo efluxo dos compostos citotóxicos ao meio intracelular. Em células tumorais, o fenótipo MDR associa-se com a superexpressão de *glicoproteína-P*, um transportador de membrana dependente de energia pertencente à superfamília de transportadores ABC (do inglês *ATP-binding cassette*). O homólogo de glicoproteína-P em *P. falciparum*, codificado pelo gene *pfmdr1*, logo se mostrou associado à resistência a vários antimaláricos. O primeiro estudo foi realizado com células de mamífero que expressavam alelos de PfMDR1 previamente associados ao fenótipo sensível e resistente à CQ *in vivo* e *in vitro*. Nesse sistema, demonstrou-se que mutantes de PfMDR1, associados ao fenótipo resistente à CQ, produziam mudanças no pH dos lisossomos e redução do acúmulo da CQ, indicando que mutações no gene *pfmdr1* podiam alterar a função da proteína (Van Es et al., 1994a,b). Pouco depois, mostrou-se que PfMDR1 complementava a função do transportador de membrana endógeno (também de tipo ABC) e que polimorfismos nessa molécula modulavam a resistência à CQ em *P. falciparum* (Volkman et al., 1995). Além disso, observou-se que o aumento do número de cópias expressas de PfMDR1 em *P. falciparum* determina a resistência à mefloquina, tanto *in vitro* e *in vivo* (Price et al., 2004).

1.4 *Pvcrt-o*, *Pvmdr1* e resistência à cloroquina em *Plasmodium vivax*

Os medicamentos existentes para o tratamento da malária por *P. vivax* foram desenvolvidos para o tratamento da malária por *P. falciparum*, com base no pressuposto de que os mecanismos de ação e de resistência eram semelhantes em ambas as espécies. Surpreendentemente, quase 20 anos depois de descobrir-se resistência à CQ em *P. vivax*, os mecanismos de ação desse antimalárico permanecem desconhecidos e as técnicas para a determinação da resistência à CQ *in vitro*, padronizadas recentemente, ainda são de uso restrito a poucos laboratórios de pesquisa.

Em 2001, foi descrito o ortólogo de *pfcr1* em *P. vivax*, denominado *pvcrt-o* (Nomura et al., 2001). A proteína codificada por este gene, com 10 domínios transmembrana, é membro da superfamília de transportadores de drogas e metabólitos (Bray et al., 2005). Até hoje, entretanto, não se demonstrou o papel dessa proteína no

transporte da CQ ou na resistência à CQ em *P. vivax*, ainda que a similaridade estrutural entre *pfcr1* e *pvcr1-o* sugira que a função destes genes tenha sido conservada. As evidências de papel de PvCRT-O na resistência à CQ são indiretas: 1. A superexpressão de *pvcr1-o* em linhagens transfectadas de *P. falciparum* reduz a sensibilidade à CQ, sendo este efeito reversível pela adição de verapamil. 2. A expressão da linhagem mutada (K76T) de PvCRT-O no organismo modelo *Dictyostellium discoideum* reduz a incorporação da CQ nos endossomos ácidos desse organismo, sendo este efeito também reversível pelo verapamil (Sa et al., 2006). Entretanto, diferentemente de PfCRT, não foi possível associar, até o momento, a existência de mutações em PvCRT-O com a presença de resistência à CQ em *P. vivax* (Nomura et al., 2001; Orjuela-Sánchez et al., 2009b). A recente análise de 144 isolados de *P. vivax* colhidos no Acre e Rondônia (municípios de Acrelândia, Plácido de Castro e Porto Velho) (Orjuela-Sánchez et al., 2010) não confirmou a existência, nessa região, de cinco mutações não-sinônimas (L47S, K76T, S250P, F276V e L384F) previamente descritas em *pvcr1-o* (Nomura et al., 2001; Orjuela-Sánchez et al., 2009b).

Em 2005, dois laboratórios descreveram o ortólogo de *pfmdr1* em *P. vivax* (Brega et al., 2005; Sa et al., 2005). O gene *pvmdr1*, como *pfmdr1*, tem um único éxon que codifica uma proteína de 465 aminoácidos com dois domínios transmembrana hidrofóbicos que atravessam a membrana múltiplas vezes (Figura 1). Cada um desses domínios tem seis segmentos transmembrana que formam α -hélices hipotéticas, com um total de 12 segmentos por molécula de PvMDR1. Os outros dois domínios são hidrofóbicos, com um domínio de ligação a nucleotídeo (NBD, do inglês *Nucleotide Binding Domain*) que acopla a energia da hidrólise da ATP ao processo de transporte. Essas características estruturais permitem classificar PvMDR1 como membro da superfamília de proteínas transportadores ABC.

Figura 1 - Localização das substituições de aminoácidos descritas por Brega et al. (2005) e Orjuela-Sánchez et al. (2009b) na estrutura, predita por modelagem, da proteína PvMDR-1 de *P. vivax*.

Fonte: Orjuela-Sánchez et al. (2009b).

A análise de 10 isolados de diferentes regiões do mundo, realizada por Sá et al. (2005), mostrou que as sequências de *pvmdr1* agrupavam-se de acordo com a origem geográfica dos isolados, mas sem associação entre polimorfismos e resistência à CQ. Brega et al. (2005), entretanto, observaram a presença de uma substituição não-sinônima (Y976F) exclusivamente em amostras da Tailândia e Indonésia, áreas com registro de resistência à CQ em *P. vivax*. Um dado interessante é que Y976F, nos relatos iniciais, era necessariamente acompanhada pela mutação F1076L, embora essa segunda mutação (isoladamente) esteja também presente em isolados de regiões em que a resistência à CQ permanece desconhecida. Com base na descrição original de duplos mutantes (Y976F e F1076L) em áreas com *P. vivax* resistente à CQ, Suwanarusk et al. (2007) investigaram a sensibilidade *in vitro* à CQ e os polimorfismos de *pvmdr1* de isolados de *P. vivax* de Papua, Indonésia, área com altos níveis de resistência à CQ, e da Tailândia, área onde o tratamento com CQ é geralmente eficaz. Mostraram que os níveis de IC₅₀ (concentração da droga capaz de inibir em 50% a maturação dos parasitos) de CQ foram significativamente maiores em parasitos com a mutação Y976F. Além disso, os parasitos da Tailândia com múltiplas cópias de *pvmdr1* (a amplificação de *pvmdr1* não foi observada na Indonésia) têm maior IC₅₀ para

mefloquina (Imwong et al., 2008; Suwanarusk et al., 2008). Estes resultados demonstram, pela primeira vez, que CQ e mefloquina parecem exercer diferentes pressões sobre *pvm-dr1*, como previamente descrito em *pfmdr1* em *P. falciparum*.

A prevalência global de polimorfismos em *pvm-dr1* é desconhecida e não se sabe se esses polimorfismos predizem resistência à CQ em estudos populacionais (Price et al., 2009). Barnadas et al. (2008), por exemplo, encontraram parasitos resistentes à CQ no Madagascar sem a mutação Y976F; o mesmo foi descrito por Orjuela-Sánchez em três pacientes com evidência clínica de resistência à CQ provenientes de Manaus (Orjuela-Sánchez et al., 2009b). Gama et al. (2009) encontraram duplos mutantes (Y976F e F1076L) em 14% dos 28 isolados de *P. vivax* analisados, provenientes de Paragominas (Pará); todos os demais isolados tinham somente a mutação F1076L. Por outro lado, o haplótipo selvagem (YF), ausente entre as amostras de Gama et al. (2009), predominou (91%) entre 156 isolados do Acre e Rondônia analisados por Orjuela-Sánchez et al. (2010). Os duplos mutantes (Y976F e F1076L) corresponderam a somente 6% da amostra analisada. Observou-se substancial diferenciação entre populações provenientes de estados vizinhos, com base em polimorfismos em *PvMDR1*. A resposta ao tratamento com CQ não foi formalmente avaliada nesses pacientes brasileiros, mas raros indivíduos tratados com CQ e primaquina no Acre apresentam recidivas parasitárias precoces, compatíveis com recrudescências e possível resistência à CQ (Orjuela-Sánchez et al., 2009a).

Assim como descrito em *P. falciparum* (Price et al., 2004), o número de cópias de *pvm-dr-1* parece modular a susceptibilidade de *P. vivax* à CQ. Dados de ensaios *ex-vivo* com isolados asiáticos (particularmente da Tailândia) sugerem que a amplificação do número de cópias de *pvm-dr-1* está correlacionada ao aumento da susceptibilidade à CQ e à diminuição da susceptibilidade a diversos antimaláricos, como a mefloquina, o artesunato e a amodiaquina (Suwanarusk et al., 2008). Portanto, CQ e mefloquina teoricamente exerceriam pressão seletiva de direção oposta (uma favorecendo e outra desfavorecendo os isolados com duplicação de *pvm-dr-1*). Há uma característica em que o Brasil e os países do Sudeste Asiático se assemelham: tanto a CQ (para a malária vivax) como a mefloquina (para malária falciparum) foram e são ainda antimaláricos amplamente utilizados. Deste modo, é plausível sugerir que os isolados brasileiros de

P. vivax estejam expostos à mefloquina, uma droga de meia-vida longa amplamente utilizada (isoladamente ou, mais recentemente, em associação com artesunato) no tratamento de infecções por *P. falciparum* e por infecções mistas por *P. falciparum* e *P. vivax*. Não existem dados, entretanto, sobre a presença de duplicação do gene *pvm-dr-1* em isolados de *P. vivax* do Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Determinar a resistência à cloroquina em *P. vivax* mediante a avaliação fenotípica e molecular na Amazônia Ocidental Brasileira.

2.2 Específicos

- a) Efetuar o ensaio de maturação do esquizonte das amostras recém-coletadas e criopreservadas de *P. vivax* frente à cloroquina e determinar as concentrações inibitórias 50 (IC₅₀);
- b) realizar a tipagem molecular de cinco polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) não-sinônimos no gene *pvmdr-1* de *P. vivax* (A266G, A1498G, A2722C, A2927T e T3226C) e determinar se as mutações potencialmente associadas à resistência à cloroquina se encontram presentes;
- c) determinar o número de cópias do gene *pvmdr-1* de *P. vivax* em amostras da Amazônia Ocidental Brasileira.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

A área de estudo localiza-se na Amazônia Ocidental Brasileira, especificamente nos municípios de Acrelândia, Plácido de Castro e em uma área rural conhecida como Ramal do Granada (todos no extremo leste do estado do Acre) e no assentamento agrícola conhecido como Remansinho (no sul do estado do Amazonas), em fronteira com o estado de Rondônia, o Peru e a Bolívia (Figura 2). O município de Acrelândia situa-se a 120 km de Rio Branco (capital do estado do Acre). A cidade de Plácido de Castro, o Ramal do Granada e o assentamento agrícola Remansinho localizam-se a 35, 40 e 120 km, respectivamente, da cidade de Acrelândia. Estas áreas caracterizam-se por possuir um clima equatorial úmido, com maior precipitação pluvial entre os meses de dezembro e março, e por apresentar uma transmissão hipoendêmica da malária, sendo *P. vivax* responsável por 80-90% de todas as infecções diagnosticadas. A área de estudo foi escolhida devido às suas características epidemiológicas. A região está localizada a aproximadamente 1000 km da cidade de Manaus (capital do Estado de Amazonas), onde a malária por *P. vivax* resistente à CQ foi recentemente caracterizada.

Figura 2 - Locais de origem das amostras sanguíneas. Municípios de Acrelândia, Plácido de Castro e Ramal do Granada (estado do Acre) e assentamento agrícola Remansinho (estado do Amazonas).

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012) (em fase de submissão)¹.

¹ Vargas-Rodriguez RCM. Single-Nucleotide Polymorphism and Copy Number Variation at the *multidrug resistance-1 (mdr-1)* Locus of *Plasmodium vivax*: Local and Global Patterns. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.

3.2 População

3.2.1 Estudo fenotípico

A população do estudo fenotípico foi constituída por 36 indivíduos residentes nos municípios de Acrelândia (n = 10) e Plácido de Castro (n = 21) e no assentamento agrícola Remansinho (n = 5), de ambos os sexos e com idades compreendidas entre 6 a 58 anos, que foram diagnosticados com malária por *P. vivax* entre maio e julho de 2010 e julho e agosto de 2011. Para serem utilizadas neste estudo, as 36 amostras sanguíneas dos indivíduos cumpriram com três requisitos: apresentaram pelo menos dois parasitos por campo microscópico de grande aumento ao exame da gota espessa, apresentaram entre 1.000 a 50.000 parasitos em estágio de trofozoito jovem/ μ L de sangue, determinados por microscopia e provinham de indivíduos que não haviam recebido tratamento antimalárico nos últimos 30 dias. Após a exposição dos objetivos da pesquisa e com o consentimento informado, por escrito, dos doadores ou seus responsáveis, foram coletados entre 5 e 20 mL de sangue em tubos a vácuo contendo heparina sódica.

3.2.2 Estudo molecular

A população do estudo molecular foi constituída por dois grupos:

Grupo I. Para o estudo dos polimorfismos no gene *pvmdr-1* utilizaram-se 228 amostras sanguíneas positivas para *P. vivax*, obtidas de indivíduos residentes nos municípios de Acrelândia (n = 13) e Plácido de Castro (n = 21) e no assentamento agrícola Remansinho (n = 46), coletadas no presente estudo assim como em estudos anteriores entre 2008 e 2010. Os dados de polimorfismos no gene *pvmdr-1* destas amostras foram combinados com aqueles obtidos por Orjuela-Sánchez et al. (2010) em amostras sanguíneas provenientes do município de Plácido de Castro (n = 37) e do Ramal do Granada (n = 111), coletadas entre 2004 e 2007.

Grupo II. Para o estudo do número de cópias do gene *pvmdr-1* utilizaram-se 217 amostras sanguíneas positivas para *P. vivax*, obtidas de indivíduos residentes nos municípios de Acrelândia (n = 10) e Plácido de Castro (n = 54), no assentamento agrícola Remansinho (n = 54) e no Ramal do Granada (n = 99), coletadas no presente estudo assim como em estudos prévios entre 2004 e 2011.

3.2.3 Aspectos éticos da pesquisa

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (936/CEP, 2010) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). A coleta das amostras sanguíneas foi realizada unicamente após a exposição dos objetivos da pesquisa em forma clara e em termos simples e com o consentimento livre e esclarecido por escrito dos doadores e responsáveis (ANEXO A e B). Para o estudo fenotípico, utilizaram-se apenas amostras sanguíneas coletadas no presente estudo. Para o estudo molecular, empregaram-se amostras sanguíneas coletadas neste estudo como também amostras sanguíneas obtidas em estudos anteriores e estocadas no Departamento de Parasitologia (ICB/USP). Para todos os casos, garantiu-se o anonimato dos doadores e preservaram-se os aspectos éticos de conservação e utilização de material biológico estocado.

3.2.4 Processamento das amostras sanguíneas

O diagnóstico e quantificação da parasitemia por microscopia foram realizados em lâminas de gotas espessas e esfregaços corados com Giemsa (Merck, Darmstadt, Alemanha). Das 36 amostras sanguíneas coletadas no presente estudo, 25 delas foram transportadas desde o local da coleta até o laboratório em Acrelândia em recipiente para refrigeração em três a 10 horas. Uma única amostra foi transportada a 37 °C em duas horas e as 10 amostras restantes não requereram transporte porque foram coletadas em Acrelândia. As 32 amostras coletadas em 2010 foram centrifugadas a 180 x g por 5 minutos em temperatura ambiente antes da caracterização fenotípica e

molecular. As quatro amostras colhidas em 2011 foram incubadas a 37 °C até a separação do soro, antes da caracterização fenotípica e molecular.

3.3 Preparo das microplacas com cloroquina e mefloquina

Cloroquina – Microplacas de 96 poços de fundo plano (Costar, Nova York, NY, EUA) foram sensibilizadas, em triplicata, com 25 µL de onze diluições seriadas razão 2 (25,6 µM, 12,8 µM, 6,4 µM, 3,2 µM, 1,6 µM, 0,8 µM, 0,4 µM, 0,2 µM, 0,1 µM, 0,05 µM e 0,025 µM) ou 25 µL de onze diluições seriadas razão 3 (256 µM, 85,3 µM, 28,4 µM, 9,5 µM, 3,2 µM, 1,1 µM, 0,4 µM, 0,1 µM, 0,04 µM, 0,01 µM e 0,004 µM) de Difosfato de cloroquina (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Em seguida foram secas por até 8 horas no fluxo laminar, armazenadas a 4 °C e a qualidade foi testada frente ao clone 3D7 de *P. falciparum*.

Mefloquina – Microplacas de 96 poços de fundo plano (Costar, Nova York, NY, EUA) foram sensibilizadas, em triplicata, com 25 µL de onze diluições seriadas razão 3 (25,6 µM, 8,5 µM, 2,8 µM, 0,9 µM, 0,3 µM, 0,1 µM, 0,04 µM, 0,01 µM, 0,004 µM, 0,001 µM e 0,0004 µM) de Cloridrato de mefloquina (Sigma, St. Louis, MO, EUA), sendo que os passos de secagem, estocagem e o controle de qualidade foram realizados como mencionado para a CQ.

Controle de qualidade - Para garantir que as microplacas previamente sensibilizadas com CQ e mefloquina continham as concentrações corretas das mesmas, realizamos testes de qualidade em cada novo lote preparado. Para tal objetivo, utilizamos o ensaio de maturação de esquizonte padronizado para *P. falciparum* pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e o clone 3D7 de *P. falciparum*. Deste modo, 0,4 mL de hemácias parasitadas com *P. falciparum* foram ressuspensos em 19,6 mL de RPMI 1640 (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) (item 3.11) suplementado com 10% de soro humano AB⁺, com pH de 7,46 e hematócrito final de 2%. A seguir, 0,2 mL da suspensão foram adicionados a todos os poços da microplaca, porém as concentrações desejadas das drogas foram as seguintes: 3200 nM, 1600 nM, 800 nM, 400 nM, 200 nM, 100 nM, 50

nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM e 3,125 nM (para as diluições seriadas razão 2 da CQ), 32000 nM, 10667 nM, 3556 nM, 1185 nM, 395 nM, 132 nM, 44 nM, 15 nM, 5 nM, 2 nM e 1 nM (para as diluições seriadas razão 3 da CQ) e 3200 nM, 1067 nM, 356 nM, 119 nM, 40 nM, 13 nM, 4 nM, 1 nM, 0,5 nM, 0,2 nM e 0,1 nM (para as diluições seriadas razão 3 da mefloquina). A cultura foi incubada a 37 °C por 42 horas em ambiente com 90% de N₂, 5% de CO₂ e 5% de O₂. Após o período de incubação e com a obtenção de 40% de esquizontes maduros (com quatro ou mais núcleos bem definidos), em ambos os casos, estimou-se a quantidade de esquizontes em 200 estágios assexuais e calcularam-se as IC₅₀ empregando o Programa OriginPro 8.1.

3.4 Preparo das colunas de celulose CF-11

O preparo foi realizado empregando seringas descartáveis e estéreis de 10 mL de volume, celulose CF-11 em pó (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e lã de vidro (Supelco, Bellefonte, PA, EUA). Para a montagem das colunas, a abertura inferior de cada seringa foi obstruída com uma pequena quantidade de lã de vidro, a celulose CF-11 foi acrescentada até a marca de 5 mL e o conjunto foi autoclavado e seco durante 24 horas a 50 °C.

3.5 Remoção de leucócitos das amostras sanguíneas

Inicialmente, a coluna de celulose CF-11 foi umedecida com 5 mL de solução salina tamponada com fosfatos (PBS) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) estéril, com pH 7,4 ou com 5 mL de solução fisiológica (NaCl a 0,9%) (SANOBIOOL-Maneesh Pharma, India) estéril suplementada com glicose 5%. A seguir, a eluição de 2 mL de hemácias parasitadas com *P. vivax* foi realizada com 15-25 mL de PBS ou solução fisiológica. O eluato foi centrifugado a 180 x g por 5 minutos em temperatura ambiente e as hemácias parasitadas, livre de leucócitos, foram reservadas para a caracterização fenotípica e molecular.

3.6 Criopreservação

Para a criopreservação, uma alíquota do concentrado de hemácias parasitadas com *P. vivax* livre de leucócitos, foi misturada delicadamente com glycerolyte estéril (item 3.11) com pH 7,2, na proporção 0,33 vezes o volume de glycerolyte por volume do concentrado de hemácias, gota a gota, e deixada em repouso por cinco minutos. Em seguida, adicionou-se, gota a gota, 1,33 vezes o volume de glycerolyte por volume do concentrado de hemácias. As alíquotas foram mantidas a -70 °C por 24 horas e a seguir transferidas para o nitrogênio líquido.

3.7 Ensaios fenotípicos com amostras recém-coletadas de *P. vivax*

Ensaios de maturação de esquizonte realizados em 2010 – Com base no ensaio de maturação de esquizonte padronizado para *P. falciparum* pela OMS e posteriormente adaptado para *P. vivax* (Russell et al. 2008), realizamos a caracterização fenotípica de sensibilidade à CQ dos 32 isolados de *P. vivax* recém-coletados em 2010. Deste modo, 0,4 mL de hemácias parasitadas livre de leucócitos foram ressuspensos em 19,6 mL de meio McCoy's 5A modificado (Sigma, St. Louis, MO, EUA) (item 3.11) suplementado com 20% de soro humano AB⁺, com pH de 7,46 e hematócrito final de 2%. A seguir, 0,2 mL da suspensão foram adicionados a todos os poços da microplaca. A cultura foi incubada segundo a técnica *candle-jar* (Trager e Jensen, 1976) a 36-37,5 °C por 42 horas ou até obter 40% de esquizontes maduros (com quatro ou mais núcleos bem definidos). O desenvolvimento do parasito foi monitorado com a leitura de lâminas de gotas espessas realizadas às 0, 24, 32, 36, 40 e 42 horas da incubação. Ao final da incubação prepararam-se lâminas de gotas espessas com o conteúdo de cada poço, estimou-se a quantidade de esquizontes em 200 estágios assexuais e calculou-se a porcentagem de inibição da maturação de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{inibição} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{esquizontes maduros no poço - teste}}{\text{N}^{\circ} \text{esquizontes maduros no poço - controle}} \times 100$$

Ensaio de maturação de esquizonte realizados em 2011 – A suspensão das hemácias em meio completo foi preparada como mencionado anteriormente, exceto a adição de 50% de soro humano AB⁺ em lugar de 20%. A suspensão foi disposta na microplaca da mesma forma e incubada a 36-37,5 °C por 48-68 horas ou até obter 40% de esquizontes maduros, em ambiente com 90% de N₂, 5% de CO₂ e 5% de O₂. O desenvolvimento do parasito foi monitorado entre as 0 e 68 horas da incubação. A porcentagem de inibição da maturação foi calculada como mencionado acima.

3.8 Ensaios fenotípicos com amostras criopreservadas de *P. vivax*

Descongelamento – Para o descongelamento, as amostras sanguíneas foram aquecidas por um minuto em temperatura ambiente e por um minuto a 37 °C. A seguir, foram adicionadas 0,2 vezes de NaCl 12% por volume de sangue, gota a gota, esperando-se por cinco minutos. Posteriormente, 10 vezes de NaCl 1,6 % por volume de sangue foram acrescentados rapidamente, misturou-se suavemente e em seguida adicionou-se 10 vezes de NaCl/dextrose 0,9% por volume de sangue, rapidamente, agitando suavemente. Finalmente centrifugou-se a suspensão a 180 x g por 5 minutos e o pellet foi utilizado no ensaio de maturação.

Ensaio de maturação do esquizonte – Para a cultura, a parasitemia de cada amostra foi calculada e as hemácias foram resuspendidas em 15 mL de meio McCoy'S 5A modificado (item 3.11) suplementado com 50% de soro humano AB⁺. A suspensão foi incubada a 37,5 °C por quatro horas em ambiente com 90% de N₂, 5% de CO₂ e 5% de O₂. Posteriormente, 0,2 mL desta suspensão foram adicionados a todos os poços da microplaca e incubou-se por 42 horas.

Cultura ex-vivo de curto prazo baseada em Udomsangpetch et al. (2008) – O meio McCoy'S 5A modificado foi preparado como indicado no item 3.11, contudo, acrescentamos também outros componentes com base no estudo de Udomsangpetch et al. (2008): hipoxantina 367 µM, ácido ascórbico 28 µM e cloreto de magnésio 1820 µM. Com a finalidade de determinar qual destes três componentes propiciava a

adequada esquizogonia do parasito, foram preparados quatro combinações do meio que são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 - Combinações do meio McCoy'S 5A modificado com hipoxantina, ácido ascórbico e cloreto de magnésio, baseado em Udomsangpetch et al. (2008).

Combinações	Composição
1	Meio McCoy'S 5A modificado e hipoxantina
2	Meio McCoy'S 5A modificado, hipoxantina e ácido ascórbico
3	Meio McCoy'S 5A modificado, hipoxantina e cloreto de magnésio
4	Meio McCoy'S 5A modificado, hipoxantina, ácido ascórbico e cloreto de magnésio

Fonte: Adaptado de Udomsangpetch et al. (2008).

Para a cultura, 0,08 mL de hemácias descongeladas foram ressuspensos em 4 mL de cada combinação do meio suplementado com 50% de soro humano AB⁺ e pH 7,46, para um hematócrito final de 2%. A suspensão foi incubada a 37 °C por cinco dias em ambiente com 90% de N₂, 5% de CO₂ e 5% de O₂. O desenvolvimento do parasito foi monitorado a cada 24 horas e ao finalizar o ensaio prepararam-se lâminas de gotas espessas e esfregaços para determinação da parasitemia por microscopia.

Cultura ex-vivo de curto prazo baseada em Chotivanich et al. (2001) – O meio RPMI 1640 (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) foi preparado como indicado no item 3.11, entretanto, também adicionamos outros componentes conforme sugerido por Chotivanich et al. (2001): sulfato de magnésio 133 µM, fosfato de potássio monobásico 191 µM, cloreto de cálcio dihidratado 204 µM, ácido ascórbico 34 µM e tiamina 9 µM. Para a cultura, 0,2 mL de hemácias descongeladas foram ressuspensos em 4,8 mL do meio suplementado com 50% de soro humano AB⁺ e pH 7,4 para um hematócrito final de 2%. A suspensão foi incubada a 37 °C por 10 dias em ambiente com 90% de N₂, 5% de CO₂ e 5% de O₂. O desenvolvimento do parasito foi monitorado a cada 24 horas e ao finalizar o ensaio prepararam-se lâminas de gotas espessas e esfregaços para determinação da parasitemia por microscopia.

3.9 Diagnóstico molecular

Para confirmar a monoinfecção por *P. vivax* e determinar a parasitemia inicial com maior precisão do que com a microscopia realizou-se o diagnóstico molecular por reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo (qPCR) tendo como alvo o gene da porção 18S *rRNA* de *P. vivax*. Para tal objetivo, o DNA genômico dos 36 isolados de *P. vivax* coletados no presente estudo foi extraído empregando 200 µL de sangue total ou 200 µL de hemácias infectadas com *P. vivax* livre de leucócitos, o kit comercial QIAamp DNA blood mini kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) em plataforma automatizada de extração QIAcube (Qiagen, Hilden, Alemanha).

O Quadro 2 apresenta as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*, na literatura de língua inglesa) utilizadas na amplificação por qPCR do gene da porção 18S *rRNA* de *P. vivax*.

Quadro 2 - *Primers* empregados na amplificação do gene da porção 18S *rRNA* de *P. vivax*.

PRIMER	SEQUÊNCIA
<i>Plasmodium</i>	5'-ACG ATC AGA TAC CGT CGT AAT CTT)-3'
<i>P. vivax</i>	5'-CAA TCT AAG AAT AAA CTC CGA AGA GAA A)-3'
<i>P. falciparum</i>	5'-CAA TCT AAA AGT CAC CTC GAA AGA TG-3'

Fonte: Adaptado de Kimura et al. (1997).

A Figura 3 apresenta o protocolo utilizado na amplificação por qPCR do gene da porção 18S *rRNA* de *P. vivax*.

Figura 3 - Protocolo empregado na amplificação do gene da porção *18S rRNA* de *P. vivax*.

Mistura de reação (concentração final)	Programa	
<i>Primer anterior</i> (0,5 µM)	95 °C – 10 min – 1 x	
<i>Primer reverso</i> (0,5 µM)	95 °C – 15 s 60 °C – 1 min (aquisição de fluorescência)	40 x
Máxima SYBR Green qPCR 2x (10 µL)		
Amostra de DNA: 2 µL		

Fonte: Adaptado de Kimura et al. (1997).

A amplificação foi imediatamente seguida pelo programa de curva de Melting, o qual consistiu de 15 segundos a 95 °C, 15 segundos a 60 °C e um ciclo de aumento gradual da temperatura de 0,2 °C/s até 95 °C, com aquisição de fluorescência. Com a curva padrão constituída por diluições seriadas razão 10 do gene da porção *18S rRNA* clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, EUA), quantificou-se a parasitemia em número de parasitos/µL de sangue.

3.10 Tipagem molecular

3.10.1 Polimorfismos no gene *pvmdr-1*

A tipagem molecular de cinco SNPs não-sinônimos do gene *pvmdr-1* (A266G, A1498G, A2722C, A2927T e T3226C), que correspondem às mudanças de aminoácidos N89S, N500D, M908L, Y976F e F1076L em *P. vivax*, foi realizada em 80 amostras coletadas nos municípios de Acrelândia e Plácido de Castro e no assentamento agrícola Remansinho entre 2008 e 2010, com a finalidade de determinar a prevalência de haplótipos do gene *pvmdr-1* circulantes nas populações de parasitos das áreas mencionadas. Esta genotipagem foi efetuada pela empresa K-Biosciences (Cambridge, Reino Unido) com o ensaio amplifluor como descrito por Nazarenko et al.

(1997) e Newton et al. (1989) e utilizando as sequências de *primers* descritos por Orjuela-Sánchez et al. (2010).

3.10.2 Número de cópias do gene *pvmdr-1*

A avaliação do número de cópias do gene *pvmdr-1* foi realizada em 217 amostras coletadas nos municípios de Acrelândia e Plácido de Castro, no assentamento agrícola Remansinho e no Ramal do Granada entre 2004 e 2011. Para tal objetivo, realizou-se a amplificação por PCR do gene de interesse (*pvmdr-1*) e de um gene de referência (*pvaldolase*) com uma única cópia no genoma de *P. vivax*, para posterior clonagem e quantificação relativa do número de cópias pelo método do limiar comparativo.

O Quadro 3 apresenta as sequências de *primers* utilizadas na amplificação por PCR do gene de interesse e de referência de *P. vivax*.

Quadro 3 - *Primers* empregados na amplificação dos genes *pvmdr-1* e *pvaldolase* de *P. vivax*.

GENE	PRIMER	SEQUÊNCIA
<i>pvmdr-1</i>	Anterior: PvmdrF	5'-CTG ATA CAA GTG AGG AAG AAC TAC G-3'
	Reverso: PvmdrR	5'-GTC CAC CTG ACA ACT TAG ATG C-3'
<i>pvaldolase</i>	Anterior: PvaldoF	5'-GAC AGT GCC ACC ATC CTT ACC-3'
	Reverso: PvaldoR	5'-CCT TCT CAA CAT TCT CCT TCT TTC C-3'

Fonte: Adaptado de Suwanarusk et al. (2007).

A Figura 4 apresenta o protocolo utilizado na amplificação por PCR do gene de interesse e de referência de *P. vivax*.

Figura 4 - Protocolo empregado na amplificação dos genes *pvmdr-1* e *pvaldolase* de *P. vivax*.

Mistura da reação (concentração final)	Programa	
<i>Primer anterior</i> (0,3 µM)	95 °C – 15 min – 1 x	
<i>Primer reverso</i> (0,3 µM)	95 °C – 30 s	40 x
GoTaq 2x (12,5 µL)	60 °C – 1 min	
Amostra de DNA: 2 µL	72 °C – 30 s	

Fonte: Adaptado de Suwanarusk et al. (2007).

A eletroforese foi realizada com os produtos de PCR e as bandas correspondentes aos fragmentos amplificados foram recortados do gel, purificados e ligados ao vetor pGEM-T easy (Promega, Madison, WI, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

Transformação de bactérias competentes – Para as transformações, 1 µL do produto resultante das ligações (genes *pvmdr-1/pvaldolase* + plasmídeo pGEM-T easy) foi adicionado a 25 µL de bactérias competentes *Escherichia coli* (linhagem Sure), incubou-se em gelo por 30 minutos, realizou-se choque térmico a 42 °C por 45 segundos, incubou-se em gelo novamente e as bactérias foram recuperadas em 125 µL de meio LB a 37 °C por 20 minutos.

Crescimento e seleção das colônias – As bactérias transformadas foram semeadas em placas de Petri com meio LB-ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina, 0,1mM de IPTG (isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosida) e 20 µg/mL de Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-D-galactosídeo) e incubadas a 37 °C por 12 horas. Após a incubação, selecionou-se as colônias resistentes ao antibiótico (colônias brancas) e a seguir, os plasmídeos com

inserto foram obtidos seguindo o protocolo de triagem em pequena e grande escala descrito por Sambrook et al. (1989).

Sequenciamento – Para confirmar se os segmentos de DNA clonados correspondiam aos genes *pvm-dr-1* e *pvaldolase*, realizou-se a reação de sequenciamento, utilizando os *primers* empregados na amplificação destes genes (Quadro 3), como também os *primers* de sequenciamento M13 (Promega, Madison, WI, EUA) apresentados no Quadro 4.

Quadro 4 - *Primers* empregados na amplificação de inserto no vetor pGEM-T easy.

PRIMER	SEQUÊNCIA
<i>Anterior:</i> M13F (24 mer)	5'-CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC-3'
<i>Reverso:</i> M13R (22 mer)	5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'

Fonte: Adaptado de Suwanarusk et al. (2007).

A Figura 5 apresenta o protocolo utilizado na reação de sequenciamento.

Figura 5 - Protocolo empregado na reação de sequenciamento.

Mistura da reação (concentração final)	Programa	
<i>Primer</i> (0,5 µM) Big dye terminator (0,75 µL) Tampão Save money (3,25 µL) Amostra de DNA: 0,5 µL	96 °C – 1 min – 1 x	
	96 °C – 15 s	30 x
	50 °C – 15 s	
	60 °C – 4 min	
	4 °C	

Fonte: Adaptado de Suwanarusk et al. (2007).

O produto da reação de sequenciamento foi precipitado adicionando-se 90 µL de isopropanol 66% em cada amostra, que foi agitada e incubada à temperatura ambiente por 15 minutos. Centrifugou-se por 60 minutos a 2464 x g e por 30 segundos a 45 x g. Adicionou-se 150 µL de isopropanol 75%, agitou-se novamente e a centrifugação foi repetida como mencionado anteriormente. O produto da reação de sequenciamento foi seco em temperatura ambiente por 10 minutos e o sequenciamento foi realizado em sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster city, CA, EUA).

Quantificação relativa - A quantificação do gene *pvmdr-1* foi realizada por PCR em tempo real utilizando como referência o gene de cópia única *pvaldolase* de *P. vivax*. No Quadro 3 foram apresentadas as sequências de *primers* utilizadas na amplificação do gene de interesse e de referência de *P. vivax*, com base no protocolo descrito a seguir:

Figura 6 - Protocolo empregado na amplificação dos genes *pvmdr-1* e *pvaldolase* de *P. vivax*.

Mistura da reação: (volume final: 15 µL)	Programa	
Primer anterior (0,3 µM)	95 °C – 10 min – 1 x	
Primer reverso (0,3 µM)	95 °C – 15 s	40 x
Máxima SYBR Green qPCR 2x (7,5 µL)	60 °C – 1 min (aquisição de fluorescência).	
Amostra de DNA: 2 µL		

Fonte: Adaptado de Suwanarusk et al. (2007).

A amplificação foi imediatamente seguida pelo programa de curva de dissociação (*melting*, na literatura de língua inglesa), que consistiu de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C e um ciclo de aumento gradual da temperatura de 0,3 °C/s até 95 °C, com aquisição de fluorescência nesta etapa. Calculamos o número de cópias do gene de interesse pelo método do limiar comparativo, empregando as seguintes fórmulas:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{pvmdr-1} - Ct_{aldolase})_{amostra} - (Ct_{pvmdr-1} - Ct_{aldolase})_{calibrador}$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Ct foi o limiar (número do ciclo de amplificação) a partir do qual foi observado sinal de amplificação para cada gene. Considerou-se como duplicação gênica o valor de $\Delta\Delta Ct$ superior a 1,6. Os ensaios foram repetidos quando o valor de $\Delta\Delta Ct$ encontrou-se entre 1,3 e 1,6; quando o Ct foi superior a 35 e quando a desvio-padrão do Ct foi superior a 0,2.

3.11 Meios e soluções

Meio McCoy's 5A

McCoy'S 5A, suplementado com HEPES 25 mM, NaHCO_3 24 mM, glicose 10 mM e gentamicina 40 mg/L.

Meio RPMI 1640

RPMI 1640, suplementado com HEPES 25 mM, NaHCO_3 21 mM, hipoxantina 367 μM , glicose 11 mM e gentamicina 40 mg/L.

Glycerolyte

570,8 g/L de glicerina, 31,2 g/L de lactato de sódio, 0,372 g/L de KCl.

4 RESULTADOS

4.1 Controle de qualidade das microplacas pré-sensibilizadas com cloroquina e mefloquina

Os testes de controle de qualidade das microplacas pré-sensibilizadas com CQ e mefloquina, resultou em IC_{50} para a CQ de $32 \pm 9,46$ nM, dado que coincide com os resultados obtidos por de Monbrison et al. (2003) em similares condições, e de $28 \pm 5,11$ nM para a mefloquina.

Figura 7 - Trofozoitos jovens (A e C) e esquizontes maduros (B e D) do clone 3D7 de *P. falciparum* nos testes de qualidade das microplacas pré-sensibilizadas com CQ e mefloquina respectivamente, segundo o ensaio de maturação de esquizonte.

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012).

4.2 Ensaio de maturação de esquizonte de amostras recém-coletadas de *P. vivax* realizados em 2010

Dos 32 isolados de *P. vivax* coletados em 2010, 28% (nove isolados) apresentaram a quantidade de trofozoitos jovens/ μ L de sangue (1.000-50.000), recomendada para realizar o ensaio. Os 23 isolados restantes (72%) não cumpriram com este pré-requisito e apresentaram todos os estágios de desenvolvimento do parasito quando observados em microscopia por gota espessa.

A caracterização fenotípica frente à CQ foi realizada com todos os isolados, porém ao final do experimento nenhum apresentou a porcentagem (40%) de esquizontes necessária para considerar o ensaio válido. Mesmo sendo a esquizogonia inferior a 40%, transcorrido o período de incubação, três isolados apresentaram uma boa quantidade de esquizontes, com máximo de 32% após 32 horas de cultivo. Entretanto, outros apresentaram pouca quantidade dos mesmos e em mais de um isolado não se observou nenhum esquizonte até mesmo depois de finalizado o ensaio (42 horas). Cabe destacar que todos os isolados apresentaram uma diminuição considerável da parasitemia, sendo em alguns casos impossível encontrar 100 parasitos em estágio assexual para calcular as porcentagens.

Além da falta de maturação, observamos que todos os isolados apresentaram uma determinada quantidade de parasitos com morfologia alterada (citoplasma reduzido ou com orifícios e núcleo fragmentado), quando comparado ao aspecto inicial dos mesmos antes da incubação. Além disso, uma grande quantidade de gametócitos (que não estavam presentes no início do ensaio) foi observada ao longo do cultivo, e em alguns casos tornou-se o estágio predominante do teste. Portanto, ao analisar estes resultados e com a informação obtida de um estudo prévio (Russell et al., 2008), consideramos que diversos fatores limitaram o sucesso do ensaio, impossibilitando o cálculo das IC₅₀.

4.3 Ensaios de maturação de esquizonte de isolados criopreservados de *P. vivax*

O ensaio fenotípico com isolados criopreservados foi realizado em nosso laboratório de São Paulo para testar a eficácia do aumento da concentração do soro humano AB⁺ (de 20% para 50%), que seria utilizada nos ensaios de 2011 com amostras recém-coletadas para cultura *ex-vivo*.

Cinco isolados descongelados de *P. vivax* foram utilizados neste ensaio com concentração final de soro humano AB⁺ de 50% no meio de cultura. Esta concentração foi testada para avaliar se o parasito requeria para seu adequado desenvolvimento, uma maior quantidade dos nutrientes presentes no soro, como recomendado por Chotivanich et al. (2001). Entretanto, apesar desta modificação, em nenhum dos cinco isolados testados os parasitos foram capazes de desenvolver-se adequadamente, todos se mantiveram entre os estágios de trofozoito jovem e médio, sem atingir o estágio alvo do teste (esquizontes), mesmo prolongando a incubação por mais de 42 horas. Apesar disto decidimos utilizar 50% de soro humano AB⁺ na segunda tentativa de cultura com amostras recém-coletadas, por se tratarem de parasitos que não sofreram o processo de congelamento e descongelamento.

4.4 Ensaios de maturação de esquizonte de amostras recém-coletadas de *P. vivax* realizados em 2011

Após os resultados obtidos em 2010, realizamos em 2011 diversos aprimoramentos tanto na infraestrutura do laboratório de campo, em Acrelândia, como nas condições de cultura dos parasitos. Estes aprimoramentos compreenderam o suprimento contínuo de energia elétrica do laboratório, a utilização de uma mistura gasosa comercial de concentração definida para a cultura dos parasitos, o transporte das amostras (desde a coleta até o laboratório) em tempo inferior a duas horas e, finalmente, o incremento da concentração final de soro humano AB⁺ (50%) no meio de cultura. Deste modo, testamos quatro amostras recém-coletadas de *P. vivax*. Estas apresentaram entre 4.230 e 18.840 trofozoitos jovens/ μ L de sangue, como o recomendado para realizar o ensaio (1.000-50.000). Contudo, não conseguimos a

esquizogonia desejada (40%) em nenhum dos isolados, nem mesmo prolongando o período de incubação em alguns casos (68 horas). Entretanto, foram observadas diferenças na morfologia dos parasitos, em comparação com os cultivados em 2010.

Os novos quatro isolados cultivados de 0 a 20 horas aproximadamente, pareceram estar morfológicamente mais saudáveis (citoplasmas e núcleos íntegros e com aspecto totalmente normal) quando analisados em microscopia por gota espessa. Observou-se também que uma boa quantidade dos parasitos desenvolveu-se até trofozoitos médios, porém, uma vez atingido este estágio, o desenvolvimento cessava precocemente, sendo que somente uma pequena quantidade se desenvolvia em trofozoitos maduros e esquizontes (Tabelas 2, 4, 6 e 8), além de muitos parasitos apresentarem morfologia alterada nessa etapa.

A maior porcentagem de esquizontes (5%) foi atingida em 46 horas de incubação com o isolado 35EBSF; os isolados 32IAS e 34ENS apresentaram apenas 1% de esquizontes (em 36 e 28 horas de incubação, respectivamente) e nenhum esquizonte foi observado no isolado 33RPS.

Apesar de os parasitos apresentarem o estágio ideal de desenvolvimento (trofozoito jovem) para o início do ensaio e das modificações realizadas no protocolo, novamente não obtivemos sucesso.

Nas Tabelas 1, 3, 5 e 7 apresentamos as porcentagens dos estágios eritrocitários dos isolados 32IAS, 33RPS, 34ENS e 35EBSF de *P. vivax* no início dos ensaios. Nas Tabelas 2, 4, 6 e 8 são apresentadas as porcentagens dos estágios de desenvolvimento do parasito em cada teste. Na Figura 8 apresentamos o isolado 35EBSF de *P. vivax* às 68 horas de incubação.

Tabela 1 - Porcentagens dos estágios eritrocitários do isolado 32IAS de *P. vivax* na coleta e na hora zero de incubação.

	Estágios eritrocitários	
	Coleta	Hora zero
Trofozoito jovem	67	62
Trofozoito médio	19	22
Trofozoito maduro	14	15
Esquizonte	0	0
Gametócito	0	1
Total	100	100

❖ **Trofozoitos jovens/μL de sangue:** 18.840

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012).

Tabela 2 - Porcentagens dos estágios eritrocitários do isolado 32IAS de *P. vivax* como controle de crescimento, em meio McCoy'S 5A modificado com 50% de soro humano AB⁺, segundo o ensaio de maturação de esquizonte.

Tempo	Estágios eritrocitários					
	20 horas	24 horas	32 horas	36 horas	44 horas	48 horas
TJ	54	38	15	11	7	13
TM	28	42	62	60	72	73
TMA	16	17	16	20	8	4
E	0	0	0	1	0	0
G	2	3	7	8	13	10
Total	100	100	100	100	100	100

TJ: trofozoito jovem, **TM:** trofozoito médio, **TMA:** trofozoito maduro, **E:** esquizonte e **G:** gametócito.

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012).

Tabela 3 - Porcentagens dos estágios eritrocitários do isolado 33RPS de *P. vivax* na coleta e na hora zero de incubação.

	Estágios eritrocitários	
	Coleta	Hora zero
Trofozoito jovem	72	68
Trofozoito médio	19	24
Trofozoito maduro	8	7
Esquizonte	1	0
Gametócito	0	1
Total	100	100

❖ **Trofozoitos jovens/μL de sangue:** 15.180

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012).

Tabela 4 - Porcentagens dos estágios eritrocitários do isolado 33RPS de *P. vivax* como controle de crescimento, em meio McCoy'S 5A modificado com 50% de soro humano AB⁺, segundo o ensaio de maturação de esquizonte.

Estágios eritrocitários/100 parasitos							
Tempo	20 horas	24 horas	28 horas	32 horas	40 horas	48 horas	67 horas
TJ	28	35	6	11	34	11	23
TM	64	58	84	83	59	79	68
TMA	6	5	2	3	1	1	0
E	0	0	0	0	0	0	0
G	2	2	8	3	6	9	9
Total	100	100	100	100	100	100	100

TJ: trofozoito jovem, **TM:** trofozoito médio, **TMA:** trofozoito maduro, **E:** esquizonte e **G:** gametócito.

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012).

Tabela 5 - Porcentagens dos estágios eritrocitários do isolado 34ENS de *P. vivax* na coleta e na hora zero de incubação.

	Estágios eritrocitários	
	Coleta	Hora zero
Trofozoito jovem	49	50
Trofozoito médio	47	49
Trofozoito maduro	0	0
Esquizonte	0	0
Gametócito	4	1
Total	100	100

❖ **Trofozoitos jovens/μL de sangue:** 17.970

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012).

Tabela 6 - Porcentagens dos estágios eritrocitários do isolado 34ENS de *P. vivax* como controle de crescimento, em meio McCoy'S 5A modificado com 50% de soro humano AB⁺, segundo o ensaio de maturação de esquizonte.

Estágios eritrocitários				
Tempo	13 horas	28 horas	40 horas	48 horas
TJ	43	7	12	5 (10%)
TM	55	85	79	40 (80%)
TMA	1	3	2	0
E	0	1	0	0
G	1	4	7	5 (10%)
Total	100	100	100	50

TJ: trofozoito jovem, **TM:** trofozoito médio, **TMA:** trofozoito maduro, **E:** esquizonte e **G:** gametócito.

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012).

Tabela 7 - Porcentagens dos estágios eritrocitários do isolado 35EBSF de *P. vivax* na coleta e na hora zero de incubação.

	Estágios eritrocitários	
	Coleta	Hora zero
Trofozoito jovem	69	73
Trofozoito médio	25	21
Trofozoito maduro	4	5
Esquizonte	0	0
Gametócito	2	1
Total	100	100

❖ **Trofozoitos jovens/μL de sangue:** 4.230

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012).

Tabela 8 - Porcentagens dos estágios eritrocitários do isolado de *P. vivax* como controle de crescimento, em meio McCoy'S 5A modificado com 50% de soro humano AB⁺, segundo o ensaio de maturação de esquizonte.

Tempo	Estágios eritrocitários					
	18 horas	22 horas	36 horas	46 horas	60 horas	68 horas
TJ	9	9	16	7	3	5
TM	71	76	63	74	77	74
TMA	10	8	13	4	2	7
E	3	4	4	5	1	4
G	7	3	4	10	17	10
Total	100	100	100	100	100	100

TJ: trofozoito jovem, **TM:** trofozoito médio, **TMA:** trofozoito maduro, **E:** esquizonte e **G:** gametócito.

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012).

Figura 8 - Estágios eritrocitários assexuados do isolado 35EBSF de *P. vivax* em meio McCoy'S 5A modificado com 50% de soro humano AB⁺, em 68 horas de incubação, segundo o ensaio de maturação de esquizonte. As figuras A e B apresentam trofozoitos jovens. As figuras C e D apresentam um trofozoito médio e um trofozoito maduro respectivamente. As figuras E e F apresentam um esquizonte imaturo e um esquizonte maduro respectivamente.

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012).

As modificações mencionadas anteriormente não surtiram efeitos desejados em relação ao desenvolvimento dos parasitos. Após os segundos ensaios com amostras recém-coletadas, realizamos uma última tentativa para o cultivo *ex-vivo* de *P. vivax* no laboratório de São Paulo. Deste modo, adicionamos ao meio de cultura outros componentes que apoiam o crescimento do parasito, com base em dois estudos prévios (Chotivanich et al., 2001; Udomsangpetch et al., 2008).

4.5 Cultura *ex-vivo* de curto prazo baseada em Udomsangpetch et al. (2008)

As quatro combinações de meio McCoy'S 5A modificado, suplementado com 50% de soro humano AB⁺, que delineamos baseados em Udomsangpetch et al. (2008) e que testamos com o isolado 32IAS de *P. vivax*, previamente descongelado, não resultou na esquizogonia desejada (40%). A máxima porcentagem de esquizontes com aspecto normal (10%) foi atingida com a combinação 3 no quarto dia de incubação (Tabela 13 e Figura 9). Com a combinação 4 no terceiro dia de cultivo atingimos apenas 2% de esquizontes. Nenhum esquizonte foi observado com as combinações 1 e 2. Uma boa quantidade de trofozoitos médios e alguns trofozoitos maduros com aparência saudável foi observada em todas as combinações. Parasitos com morfologia alterada também foram visualizados ao aumentar o período de incubação. Ao finalizar o teste, observamos uma diminuição considerável da parasitemia com as combinações 2, 3 e 4; entretanto, com a combinação 1, uma boa quantidade de parasitos sobreviveu. (Tabela 14).

Na Tabela 9, apresentamos as porcentagens dos estágios eritrocitários do isolado 32IAS de *P. vivax* no início do ensaio. Nas Tabelas 10 a 14 são apresentadas as porcentagens dos estágios de desenvolvimento do parasito com cada combinação do meio de cultura. Na Figura 9, apresentamos o isolado 32IAS de *P. vivax*, com a combinação 3 do meio no quarto dia de incubação.

Tabela 9 - Porcentagens dos estágios eritrocitários do isolado 32IAS de *P. vivax* na coleta e na hora zero de incubação.

	Estágios eritrocitários	
	Coleta	Hora zero
Trofozoito jovem	67	60
Trofozoito médio	19	31
Trofozoito maduro	14	7
Esquizonte	0	0
Gametócito	0	2
Total	100	100

❖ **Parasitemia inicial:** 0,8%

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012).

Tabela 10 - Parasitemias do isolado 32IAS de *P. vivax* em meio McCoy'S 5A modificado com hipoxantina, ácido ascórbico e cloreto de magnésio, no primeiro dia de incubação, baseado em Udomsangpetch et al. (2008).

Combinação	Composição	Parasitemia (%)
1	Meio McCoy'S 5A modificado e hipoxantina	0,1
2	Meio McCoy'S 5A modificado, hipoxantina e ácido ascórbico	0,1
3	Meio McCoy'S 5A modificado, hipoxantina e cloreto de magnésio	0,1
4	Meio McCoy'S 5A modificado, hipoxantina, ácido ascórbico e cloreto de magnésio	0,1

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012).

Tabela 11 - Estágios eritrocitários do isolado 32IAS de *P. vivax* em meio McCoy'S 5A modificado com hipoxantina, ácido ascórbico e cloreto de magnésio, no segundo dia de incubação, baseado em Udomsangpetch et al. (2008).

Combinações do meio de cultura				
Estágio	Combinação 1	Combinação 2	Combinação 3	Combinação 4
TJ	0	0	0	1 (2%)
TM	46 (92%)	46 (92%)	39 (78%)	42 (84%)
TMA	1 (2%)	0	7 (14%)	0
E	0	0	0	0
G	3 (6%)	4 (8%)	4 (8%)	7 (14%)
Total	50	50	50	50

TJ: trofozoito jovem, **TM:** trofozoito médio, **TMA:** trofozoito maduro, **E:** esquizonte e **G:** gametócito.

Combinação 1: Meio McCoy'S 5A modificado e hipoxantina.

Combinação 2: Meio McCoy'S 5A modificado, hipoxantina e ácido ascórbico.

Combinação 3: Meio McCoy'S 5A modificado, hipoxantina e cloreto de magnésio.

Combinação 4: Meio McCoy'S 5A modificado, hipoxantina, ácido ascórbico e cloreto de magnésio.

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012).

Tabela 12 - Estágios eritrocitários do isolado 32IAS de *P. vivax* em meio McCoy'S 5A modificado com hipoxantina, ácido ascórbico e cloreto de magnésio, no terceiro dia de incubação, baseado em Udomsangpetch et al. (2008).

Combinações do meio de cultura				
Estágio	Combinação 1	Combinação 2	Combinação 3	Combinação 4
TJ	4 (8%)	3 (6%)	3 (6%)	2 (4%)
TM	44 (88%)	45 (90%)	41 (82%)	37 (74%)
TMA	0	0	2 (4%)	0
E	0	0	1 (2%)	1 (2%)
G	2 (4%)	2 (4%)	3 (6%)	10 (20%)
Total	50	50	50	50

TJ: trofozoito jovem, **TM:** trofozoito médio, **TMA:** trofozoito maduro, **E:** esquizonte e **G:** gametócito.

Combinação 1: Meio McCoy'S 5A modificado e hipoxantina.

Combinação 2: Meio McCoy'S 5A modificado, hipoxantina e ácido ascórbico.

Combinação 3: Meio McCoy'S 5A modificado, hipoxantina e cloreto de magnésio.

Combinação 4: Meio McCoy'S 5A modificado, hipoxantina, ácido ascórbico e cloreto de magnésio.

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012).

Tabela 13 - Estágios eritrocitários do isolado 32IAS de *P. vivax* em meio McCoy'S 5A modificado com hipoxantina, ácido ascórbico e cloreto de magnésio, no quarto dia de incubação, baseado em Udomsangpetch et al. (2008).

Combinações do meio de cultura				
Estágio	Combinação 1	Combinação 2	Combinação 3	Combinação 4
TJ	2 (4%)	1 (5%)	3 (10%)	0
TM	47 (94%)	18 (90%)	24 (80%)	3 (75%)
TMA	0	0	0	0
E	0	0	3 (10%)	0
G	1 (2%)	1 (5%)	0	1 (25%)
Total	50	20	30	4

TJ: trofozoito jovem, **TM:** trofozoito médio, **TMA:** trofozoito maduro, **E:** esquizonte e **G:** gametócito.

Combinação 1: Meio McCoy'S 5A modificado e hipoxantina.

Combinação 2: Meio McCoy'S 5A modificado, hipoxantina e ácido ascórbico.

Combinação 3: Meio McCoy'S 5A modificado, hipoxantina e cloreto de magnésio.

Combinação 4: Meio McCoy'S 5A modificado, hipoxantina, ácido ascórbico e cloreto de magnésio.

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012).

Tabela 14 - Estágios eritrocitários do isolado 32IAS de *P. vivax* em meio McCoy'S 5A modificado com hipoxantina, ácido ascórbico e cloreto de magnésio, no quinto dia de incubação, baseado em Udomsangpetch et al. (2008).

Combinações do meio de cultura				
Estágio	Combinação 1	Combinação 2	Combinação 3	Combinação 4
TJ	3 (6%)	1 (20%)	0	0
TM	45 (90%)	3 (60%)	6 (75%)	1 (100%)
TMA	0	0	0	0
E	0	0	0	0
G	2 (4%)	1 (20%)	2 (25%)	0
Total	50	5	8	1

TJ: trofozoito jovem, **TM:** trofozoito médio, **TMA:** trofozoito maduro, **E:** esquizonte e **G:** gametócito.

Combinação 1: Meio McCoy'S 5A modificado e hipoxantina.

Combinação 2: Meio McCoy'S 5A modificado, hipoxantina e ácido ascórbico.

Combinação 3: Meio McCoy'S 5A modificado, hipoxantina e cloreto de magnésio.

Combinação 4: Meio McCoy'S 5A modificado, hipoxantina, ácido ascórbico e cloreto de magnésio.

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012).

Figura 9 - Estágios eritrocitários assexuados do isolado 32IAS de *P. vivax* em meio McCoy'S 5A modificado com hipoxantina e cloreto de magnésio, no quarto dia de incubação, baseado em Udomsangpetch et al. (2008). As figuras A e B apresentam trofozoitos jovens. As figuras C e D apresentam um trofozoito médio e um trofozoito maduro respectivamente. As figuras E e F apresentam um esquizonte imaturo e um esquizonte maduro respectivamente.

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012).

4.6 Cultura *ex-vivo* de curto prazo baseada em Chotivanich et al. (2001)

Com base no estudo de Chotivanich et al. (2001), que sugere a necessidade de nutrientes suplementares no meio de cultura para o adequado crescimento *ex-vivo* de *P. vivax*, utilizamos em substituição ao meio McCoy'S 5A modificado, o meio RPMI 1640 suplementado com 50% de soro humano AB⁺, sais e vitaminas (hipoxantina, sulfato de magnésio, fosfato de potássio monobásico, cloreto de cálcio dihidratado, ácido ascórbico e tiamina). Realizamos nestas novas condições, no laboratório de São Paulo, o cultivo *ex-vivo* do isolado 33RPS de *P. vivax*, previamente descongelado, sem atingir a esquizogonia desejada (40%) até finalizar o período de 10 dias. A máxima porcentagem de esquizontes obtida foi 17% no sexto e sétimo dias de incubação (Tabela 16 e Figura 10), no entanto, durante todo o cultivo esquizontes também foram observados nos outros dias, mas em porcentagens inferiores. Além disso, como evidenciado também nos outros ensaios *ex-vivo*, boa quantidade de trofozoitos médios detiveram precocemente seu desenvolvimento. Porém, alguns trofozoitos maduros foram visualizados. A parasitemia diminuiu progressivamente desde o terceiro dia de incubação até finalizar o ensaio.

Na Tabela 15, apresentamos as porcentagens dos estágios eritrocitários do isolado 33RPS de *P. vivax* no início do ensaio. Na Tabela 16, são apresentadas as porcentagens dos estágios de desenvolvimento do parasito atingidos no teste. Na Figura 10, apresentamos o isolado 33RPS de *P. vivax* aos dez dias de incubação.

Tabela 15 - Porcentagens dos estágios eritrocitários do isolado 33RPS de *P. vivax* na coleta e na hora zero de incubação.

	Estágios eritrocitários	
	Coleta	Hora zero
Trofozoito jovem	72	87
Trofozoito médio	19	11
Trofozoito maduro	8	1
Esquizonte	1	0
Gametócito	0	1
Total	100	100

❖ **Parasitemia inicial:** 0,5%

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012).

Tabela 16 - Estágios eritrocitários do isolado 33RPS de *P. vivax* em meio RPMI 1640 suplementado com hipoxantina, sulfato de magnésio, fosfato de potássio monobásico, cloreto de cálcio dihidratado, ácido ascórbico, tiamina e 50% de soro humano AB⁺, baseado em Chotivanich et al. (2001).

Estágios eritrocitários										
Tempo	1 dia	2 dia	3 dia	4 dia	5 dia	6 dia	7 dia	8 dia	9 dia	10 dia
TJ	16	12	17 (34%)	19 (38%)	12 (24%)	14 (47%)	5 (17%)	6 (40%)	2 (33%)	1 (17%)
TM	72	80	27 (54%)	23 (46%)	24 (48%)	10 (33%)	19 (63%)	9 (60%)	3 (50%)	3 (50%)
TMA	0	0	1 (2%)	0	2 (4%)	0	0	0	0	0
E	8	2	2 (4%)	5 (10%)	8 (16%)	5 (17%)	5 (17%)	0	0	1 (17%)
G	4	6	3 (6%)	3 (6%)	4 (8%)	1 (3%)	1 (3%)	0	1 (17%)	1 (17%)
Total	100	100	50	50	50	30	30	15	6	6

TJ: trofozoito jovem, TM: trofozoito médio, TMA: trofozoito maduro, E: esquizonte e G: gametócito.

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012).

Figura 10 - Estágios eritrocitários assexuados do isolado 33RPS de *P. vivax* em meio RPMI 1640, aos dez dias de incubação, baseado em Chotivanich et al. (2001). As figuras A e B apresentam trofozoitos jovens. As figuras C e D apresentam um trofozoito médio e um trofozoito maduro respectivamente. As figuras E e F apresentam um esquizonte imaturo e um esquizonte maduro respectivamente.

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012).

4.7 Tipagem molecular

4.7.1 Polimorfismos no gene *pvmdr-1*

Com base na tipagem dos cinco SNPs não-sinônimos (A266G, A1498G, A2722C, A2927T e T3226C) que correspondem às mudanças de aminoácidos (N89S, N500D, M908L, Y976F e F1076L) foram obtidos os haplótipos apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Distribuição dos haplótipos do gene *pvmdr-1* em 80 amostras de *P. vivax* coletadas entre 2008 e 2010 nos estados do Acre e Amazonas, Amazônia Ocidental Brasileira.

Haplótipo	Acrelândia (AC)	Plácido de Castro (AC)	Remansinho (AM)
SDLYF	4 (30,8%)	5 (23,8%)	31 (67,4%)
SDLYL	1 (7,9%)	1 (4,8%)	0
SNLYF	4 (30,8%)	13 (61,9%)	15 (32,6%)
SNLYL	4 (30,8%)	2 (9,5%)	0
Total	13	21	46

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012).

Não foram observadas mutações na posição Y976F, potencialmente associada à resistência à CQ; todos os isolados tinham a forma selvagem (Y) nessa posição. Somente 10% dos isolados apresentaram a mutação F1076L, que frequentemente acompanha a mutação Y976F.

Na Tabela 18, os dados originais apresentados na Tabela 17 foram combinados com os obtidos por Orjuela-Sánchez et al. (2010) em populações de parasitos da mesma região, para permitir comparações baseadas em maior número de amostras.

Tabela 18 - Distribuição dos haplótipos do gene *pvmdr-1* em 228 amostras de *P. vivax* coletadas entre 2008 e 2010 nos estados do Acre e Amazonas, Amazônia Ocidental Brasileira, combinado com os dados de Orjuela-Sánchez et al. (2010).

Haplótipo	Acrelândia (AC)	Plácido de Castro (AC)	Remansinho (AM)	Granada (AC)
SDLYF	4 (30,8%)	5 (8,5%)	31 (67,4%)	1 (0,9%)
SDLYL	1 (7,9%)	11 (19,0%)	0	11 (9,9%)
SNLYF	4 (30,8%)	39 (67,2%)	15 (32,6%)	90 (81,1%)
SNLYL	4 (30,8%)	2 (3,4%)	0	6 (5,4%)
SNLFL	0	0	0	2 (1,8%)
SNLFF	0	0	0	1 (0,9%)
SDLFL	0	1 (1,7%)	0	0
Total	13	58	46	111

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012).

Observa-se que Orjuela-Sánchez et al. (2010) haviam encontrado quatro isolados (um em Plácido de Castro e três no Granada) com a mutação Y976F, correspondendo aos haplótipos SNLFL, SNLFF e SDLFL. Nenhum desses haplótipos foi encontrado no presente estudo. Destaca-se também o encontro, no Granada, de um isolado com o haplótipo SNLFF, em que a mutação Y976F não está acompanhada da mutação F1076L.

4.7.2 Número de cópias do gene *pvmdr-1*

Dos 217 isolados de *P. vivax* avaliados no ensaio de número de cópias do gene *pvmdr-1*, coletados entre 2004 e 2011, obtivemos resultado para 215 isolados. Dentre estes 215 isolados somente dois, provenientes de Plácido de Castro em 2008 e Granada em 2004, apresentaram duas cópias do gene *pvmdr-1*. Os 213 isolados restantes apresentaram apenas uma única cópia do mesmo.

5 DISCUSSÃO

Plasmodium vivax é o plasmódio humano de distribuição geográfica mais ampla e o segundo mais prevalente, afetando o 40% da população mundial (Suwanarusk et al., 2007). A malária vivax é considerada um problema de saúde pública em diversas partes do mundo devido, particularmente, à morbidade que ocasiona em crianças e mulheres grávidas (Suwanarusk et al., 2007), ao aumento de infecções graves e potencialmente fatais (Price et al., 2009) e à recente disseminação da resistência desta espécie à CQ (Baird, 2009).

Para avaliar o perfil de sensibilidade aos antimaláricos utilizam-se ensaios clínicos e ensaios *in vitro*. Os ensaios clínicos são muito úteis, mas estão sujeitos a variações no estado imunológico dos pacientes e à presença de recaídas e re-infecções (Suwanarusk et al., 2007). No entanto, os ensaios *in vitro* avaliam a atividade das drogas em ausência destes fatores de confusão (Russell et al., 2008). Os ensaios *in vitro* que avaliam a sensibilidade aos antimaláricos em *Plasmodium falciparum* encontram-se bem estabelecidos, devido entre outros fatores, à facilidade da cultura contínua desta espécie no laboratório. Entretanto, a sensibilidade aos antimaláricos em *P. vivax* apenas pode ser avaliada por ensaios *ex-vivo* baseados, geralmente, no ensaio de maturação de esquizonte, padronizado para *P. falciparum* pela Organização Mundial da Saúde (OMS), e posteriormente adaptado para *P. vivax* por vários laboratórios (Chotivanich et al., 2004; Russell et al., 2003; Tasanor et al., 2002).

Assim mesmo, o mecanismo de resistência à CQ em *P. vivax* ainda é desconhecido. Até o momento, não foram identificados marcadores moleculares que possam prever, com absoluta certeza, a resistência à CQ e outros antimaláricos nesta espécie. Polimorfismos nos genes *pfcr1* e *pfmdr-1* conferem resistência à CQ em *P. falciparum* (Fidock et al., 2000; Reed et al., 2000). Entretanto, em *P. vivax*, não foram estabelecidas relações entre mutações pontuais nos genes ortólogos *pvcrt-o* e *pvmdr-1* e resposta clínica à CQ (Nomura et al., 2001; Sa et al., 2005).

No presente trabalho, avaliamos fenotípica e molecularmente amostras recém-coletadas e criopreservadas de *P. vivax* da Amazônia Ocidental Brasileira. A avaliação fenotípica de sensibilidade à CQ foi realizada mediante o ensaio de maturação de esquizonte. A avaliação molecular foi realizada utilizando duas técnicas de tipagem que permitiram investigar: cinco polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) não-sinônimos

do gene *pvm-dr-1* (A266G, A1498G, A2722C, A2927T e T3226C) e variações no número de cópias do gene mencionado.

5.1 Dificuldades na realização do ensaio de maturação de esquizonte de *P. vivax*

Atualmente, não se dispõem de protocolos para a manutenção de *P. vivax* em cultura continua *in vitro* devido, principalmente, a duas características inerentes do parasito: requerimentos nutricionais específicos que impossibilitam mantê-lo nas mesmas condições de cultura que *P. falciparum* (Trager e Jensen, 1976) e preferência pela invasão de reticulócitos, que rotineiramente não são fáceis de conseguir (Udomsangpetch et al., 2008). Contudo, um número limitado de laboratórios situados no Sudeste Asiático, especialmente na Tailândia, Indonésia e, mais recentemente, Singapura utilizam rotineiramente o ensaio de maturação de esquizonte para avaliar padrões de sensibilidade às drogas antimaláricas em *P. vivax*. No entanto, na América Latina, ainda não há grupos com experiência bem sucedida neste campo, traduzida em publicações científicas em periódicos arbitrados por pares.

Ao longo deste trabalho, deparamo-nos com diversos obstáculos para a realização do ensaio de maturação de esquizonte de *P. vivax*, que inviabilizaram a obtenção de estimativas confiáveis de valores de IC₅₀. Algumas dessas dificuldades foram devidas a questões inerentes ao trabalho de campo e outras a características próprias do parasito. No trabalho de campo podemos ressaltar três questões: longo período de tempo decorrido entre a coleta das amostras sanguíneas em áreas rurais ou urbanas remotas e a sua chegada a nosso laboratório de campo em Acrelândia, cortes de energia elétrica e oscilações de voltagem frequentes no mencionado laboratório e dificuldade na manutenção de um ambiente rico em CO₂ e pobre em O₂ na cultura dos parasitos. Assim mesmo, entre as características próprias do parasito que também dificultaram a realização do ensaio destacamos as seguintes: baixas densidades parasitárias e predomínio de isolados não-sincrônicos.

Com referência ao transporte, houve demora (entre 3 e 10 horas) no traslado de 25 das 36 amostras sanguíneas coletadas no presente estudo. Este fato pode ter comprometido, em parte, o adequado desenvolvimento dos parasitos, visto que a

viabilidade dos mesmos tende a diminuir conforme transcorre o tempo (Basco, 2007). Por esse motivo, recomenda-se o cultivo dos parasitos logo após da coleta ou no máximo dentro de duas horas (Russell et al., 2008). Além disso, a viabilidade pode ter sido ainda mais afetada devido ao prolongado contato com o anticoagulante heparina. Estudos demonstraram que este anticoagulante, assim como o citrato de sódio e o EDTA, não afetam o normal crescimento dos parasitos, sempre que os mesmos sejam imediatamente cultivados após a coleta do sangue (Basco, 2007). As 11 amostras sanguíneas restantes não tiveram demora no transporte, foram processadas e cultivadas rapidamente (entre 1 e 2 horas), mas mesmo assim, não obtivemos um adequado desenvolvimento do parasito para atingirmos uma esquizogonia de 40%.

Cortes de energia elétrica e oscilações de voltagem ocorreram frequentemente no laboratório de campo durante os dois anos de trabalho. Em 2010, possuíamos apenas um grupo-gerador manual que nos permitiu suprir, em parte, a falta de eletricidade. No entanto, como os cortes também aconteceram durante as madrugadas e o gerador não possuía ligação automática, diversos isolados em cultura foram afetados pela mudança súbita de temperatura na estufa. Em 2011, instalamos um grupo-gerador automático e novos estabilizadores de voltagem com o objetivo de enfrentar estes contratempos. Contudo, não obtivemos melhorias nos resultados quanto ao desenvolvimento dos parasitos.

A manutenção de um ambiente de cultura rico em CO₂ e pobre em O₂ nos primeiros experimentos no campo foi assegurada unicamente, com o uso de velas segundo a técnica *candle-jar* (Trager e Jensen, 1976). Embora esta técnica seja bem padronizada e tenha sido utilizada previamente, com sucesso, em nosso laboratório, não se pode negar que o uso de velas comercialmente disponíveis e de composição variável entre os lotes, não é um método altamente reprodutível para a obtenção e manutenção de concentrações gasosas adequadas para o cultivo de parasitos, especialmente de *P. vivax*. Assim sendo, a conservação de concentrações gasosas adequadas é importante pelo fato de que as variações em alguns de seus componentes podem afetar a viabilidade do parasito e a atividade de algumas drogas como a CQ (Basco, 2007), bem como a alteração da IC₅₀, por alteração do pH do meio. *P. vivax* possui um metabolismo relativamente intenso que tende a esgotar a capacidade de

tamponar o meio, ocasionando a diminuição do pH e, por conseguinte, a interrupção prematura do crescimento do parasito (Tasanor et al., 2002). No entanto, durante a nossa segunda estadia no campo, em 2011, procuramos eliminar estas variações utilizando uma mistura de gases comercialmente disponível (90% de N₂, 5% de CO₂ e 5% de O₂), injetada em recipiente hermeticamente fechado, para assegurar um ambiente adequado ao cultivo dos parasitos como padronizado previamente para *P. falciparum*. Porém, este aprimoramento, não surtiu o efeito desejado quanto ao sucesso no cultivo dos isolados de *P. vivax*.

As baixas densidades parasitárias, geralmente encontradas nos pacientes também afetaram nossa pesquisa em dois aspectos: na quantidade total de amostras sanguíneas coletadas e na quantidade de parasitos disponíveis para o ensaio de maturação de esquizonte. Coletamos apenas 36 amostras sanguíneas, 32 destas em maio-julho de 2010 e as quatro restantes em julho-agosto de 2011. Esta quantidade reduzida de amostras deveu-se ao fato de poucos indivíduos infectados com malária vivax apresentarem parasitemias com pelo menos dois parasitos por campo microscópico de grande aumento ou com 1.000-50.000 trofozoitos jovens/μL de sangue ao exame microscópico das gotas espessas. Além disso, considerando que somente uma fração dos parasitos presentes em cada isolado foi capaz de adaptar-se ao cultivo, impondo uma espécie de gargalo populacional, o resultado foi um número muito reduzido de parasitos plenamente capazes de desenvolverem-se *ex-vivo*.

A assincronicidade dos isolados de *P. vivax* também teve influência em nosso trabalho, pois isolados sincrônicos apresentam um maior número de parasitos numa mesma fase do ciclo, o que facilita obter o número de trofozoitos jovens/μL de sangue necessários para o ensaio. A assincronicidade de *P. vivax* encontra-se bem documentada, mas varia entre áreas de diferente endemicidade (Russell et al., 2008). A quantidade de isolados de *P. vivax* para a sua caracterização fenotípica frente à CQ e à mefloquina se viu reduzida pela pouca quantidade de isolados relativamente sincrônicos presentes na área de estudo, já que o ensaio de maturação de esquizonte de *P. vivax* deve ser realizado com isolados que apresentem de 1.000-50.000 trofozoitos jovens/μL de sangue, visto que somente parasitos nesta fase de desenvolvimento são sensíveis à CQ em *P. vivax*, pelo que a exposição de trofozoitos

maduros a esta droga resulta em níveis altos de IC_{50} (Russell et al., 2008). Assim sendo, das 36 amostras coletadas no presente estudo, somente 14% (cinco amostras) estavam relativamente sincronizadas no estágio de trofozoito jovem e os 86% restantes (31 amostras) foram assincrônicas ou estavam sincronizadas no estágio de trofozoito maduro. Dentre as amostras assincrônicas, 22% (oito amostras), apresentaram a quantidade de trofozoitos jovens/ μL de sangue dentro do requerido para o ensaio, totalizando 36% (13 amostras) que cumpriram este requisito. Em relação aos isolados com pequena quantidade de trofozoitos jovens no início do ensaio, a obtenção de 40% de esquizontes ao longo do período de incubação foi dificultada. Se considerarmos que todos os estágios de desenvolvimento do parasito tiveram que se adaptar às condições de cultura *ex-vivo* teremos como resultado uma diminuição dos mesmos, inclusive, dos trofozoitos jovens. Como neste ensaio de curta duração (42 horas) a reinvasão de hemácias é mínima, a quantidade inicial de trofozoitos jovens constitui-se em um ponto-chave para o sucesso do teste.

Embora o ensaio de maturação de esquizonte com leitura por microscopia seja de muita utilidade para a caracterização fenotípica da susceptibilidade a drogas em *P. vivax* (Kosaisavee et al., 2006), os fatores que o influenciam, tanto os mencionados anteriormente como outros fatores adicionais (meios de cultura, hematócrito, tempo de incubação, etc) devem ser avaliados e controlados para a obtenção de valores de IC_{50} válidos. Por outro lado, a metodologia trabalhosa e a necessidade de microscopistas altamente capacitados na identificação e quantificação dos parasitos limitam seu uso e estimulam a busca de outros métodos. Não obstante, apesar destas dificuldades, o ensaio de maturação de esquizonte com leitura por microscopia mantém-se como uma alternativa aos métodos mais automatizados baseados, por exemplo, na incorporação de isoleucina ou hipoxantina marcada radioativamente. Como a grande maioria de pacientes com malária vivax apresenta parasitemias inferiores a 30.000/ μL , quantidade que se encontra abaixo do limite de sensibilidade dos testes de incorporação de hipoxantina ou isoleucina (Tasanor et al., 2002), a leitura microscópica dos ensaios de maturação de esquizontes é, muitas vezes, a única alternativa. Este último método demonstrou maior proporção de ensaios válidos (57%), quando comparado aos métodos isotópicos (32,5%) e PicoGreen (45,5%), mas sem diferença significativa nas

IC₅₀ da CQ para os três casos (Kosaisavee et al., 2006). Finalmente, a visualização dos parasitos por microscopia no ensaio de maturação de esquizonte adquire vital importância porque permite determinar diretamente, não só a quantidade dos mesmos senão também avaliar a morfologia e o estágio destes, o que não acontece com os métodos isotópicos e PicoGreen (Kosaisavee et al., 2006).

5.2 Alternativas testadas para a cultura *ex-vivo* de *P. vivax*

Ao longo dos dois anos de trabalho, mudanças na composição do meio de cultura assim como a utilização de um novo meio foram realizadas sem obter, em ambas as situações, o sucesso esperado. Após a escassa maturação dos parasitos em 2010, decidimos em 2011 modificar o protocolo utilizado (Russell et al., 2008) adicionando ao meio 50% de soro humano AB⁺ em lugar de 20% (Chotivanich et al., 2001). No entanto, apesar desta modificação, não alcançamos a esquizogonia desejada (40%), nem com as amostras recém-coletadas nem com as criopreservadas, mesmo estas últimas sendo cultivadas em nosso laboratório de São Paulo, que possui toda a infraestrutura necessária para este tipo de experimento. Portanto, com estes resultados resolvemos ainda em 2011, realizar uma última tentativa de cultura dos parasitos, baseando-nos em outros dois estudos (Chotivanich et al., 2001; Udomsangpetch et al., 2008), no entanto, não conseguimos o resultado esperado. Ambas as pesquisas expõem que *P. vivax* necessita de nutrientes suplementares como: glicose, hipoxantina, 50% de soro humano AB⁺, ácido ascórbico e altas concentrações de sais para seu adequado crescimento *ex-vivo* quando comparado com *P. falciparum*, sendo os íons metálicos e as vitaminas essenciais para a diferenciação em merozoitos durante a esquizogonia (Brockelman et al., 1987). Finalmente, apesar de haver utilizado o protocolo de coleta e processamento de amostras (incluído seu congelamento), gentilmente cedido por Bruce Russell, Richard Price e colaboradores², que têm vasta experiência em cultivo *ex-vivo* de curto prazo de *P. vivax* e de haver realizado as variações no meio como mencionado acima, não conseguimos os 40% de esquizontes

² Russell B et al. Protocolo de preparo de microplacas com cloroquina e mefloquina. Protocolo de remoção de leucócitos das amostras sanguíneas. Protocolo do ensaio de maturação de esquizonte. Protocolo de criopreservação de isolados de *P. vivax*. Australia, 2010.

necessários. Ao concluir o presente trabalho, deparamo-nos com a sugestão de Manoj Duraisingh (pesquisador da Universidade de Harvard), de que o anticoagulante utilizado (heparina) possa ter afetado o desenvolvimento dos parasitos devido ao prolongado contato com o mesmo, como confirmado por Basco (2007). Nossos esforços estão agora dirigidos para a análise do padrão de desenvolvimento de parasitos colhidos com outros anticoagulantes, como o citrato de sódio, com transporte das amostras (desde a coleta até o laboratório em Acrelândia) em tempo inferior a duas horas.

5.3 Ensaio molecular: polimorfismo e variação no número de cópias do gene *pvmdr-1*

Não se conhecem marcadores moleculares capazes de prever, com absoluta segurança, a presença de resistência à CQ e a outros antimaláricos em *P. vivax*. Entretanto, existe razoável evidência a favor de um papel do produto do gene *pvmdr-1* na modulação da resistência à CQ e à mefloquina, tornando esse gene um alvo plausível de mutações e outros tipos de variação genética associadas à quimiorresistência em *P. vivax*. Neste trabalho, examinamos dois tipos de variação genética no gene *pvmdr-1* de isolados de *P. vivax* da Amazônia Ocidental Brasileira: cinco substituições não-sinônimas de nucleotídeos previamente descritas em isolados de diversas origens geográficas (Figura 1), incluindo uma (Y976F) supostamente associada ao fenótipo de quimiorresistência no Sudeste Asiático (Suwanarusk et al., 2007) e variação no número de cópias de *pvmdr-1*, que parece modular o padrão de susceptibilidade à CQ e à mefloquina em isolados do Sudeste Asiático (Suwanarusk et al., 2008). Entre os 80 isolados de *P. vivax* testados neste estudo, não foram observadas mutações na posição Y976F, potencialmente associada à resistência à CQ. Além disso, a mutação F1076L, que frequentemente acompanha a mutação Y976F, foi observada em somente 10% dos isolados. De fato, a mutação Y976F parece ser rara na Amazônia Ocidental Brasileira; dos 228 isolados analisados neste estudo e em trabalho prévio de Orjuela-Sánchez et al. (2010), somente quatro (1,8%) apresentavam essa mutação. Em contraste, a mutação Y976F é relativamente comum em diversos

países em que se documentou resistência de *P. vivax* à CQ, como a Tailândia e a Indonésia.

A Tabela 19 resume dados compilados da literatura sobre a prevalência global das mutações Y976F e F1076L em *pvmdr-1*. Com base nesses dados, observa-se que a mutação Y976F, diferentemente do observado preliminarmente por Brega et al. (2005) e Orjuela-Sánchez et al. (2010), não é necessariamente acompanhada pela mutação F1076L. Por outra parte, somente dois (0,9%) dos 215 isolados brasileiros testados para a duplicação do gene *pvmdr-1* de fato a apresentavam. Esses dados sugerem que a exposição eventual de isolados locais à mefloquina não teria sido suficiente para selecionar, de modo eficaz, parasitos com a duplicação. Os dados mais recentes da literatura, compilados na Tabela 20, indicam que, em termos globais, a amplificação de *pvmdr-1* mantém-se relativamente rara fora da província de Tak, na Tailândia.

Na Tabela 19, apresentamos a prevalência das mutações Y976F e F1076L no gene *pvmdr-1* em isolados de *P. vivax* de diversas regiões geográficas. Na Tabela 20, apresentamos o número de cópias do gene *pvmdr-1* em isolados de *P. vivax* de diversas regiões geográficas.

Tabela 19 - Prevalência das mutações Y976F e F1076L no gene *pvmdr-1* em isolados de *P. vivax* de diversas regiões geográficas. **(continua)**

Local (data)	Número de amostras	Tipo selvagem YF	Mutação simples YL	Mutação simples FF	Dupla mutação FL	Método de tipagem [referência]
Américas						
Brasil						
Acrelândia, Acre (2008-11)	13	8	5	0	0	Ensaio Ampifluor [este estudo]
Plácido de Castro, Acre (2008-10)	58	44	13	0	1	Ensaio Ampifluor [este estudo, Orjuela-Sánchez et al., 2010]
Granada, Acre (2004-06)	111	91	17	1	2	Ensaio Ampifluor [Orjuela-Sánchez et al., 2010]
Remansinho, Amazonas (2009-11)	46	46	0	0	0	Ensaio Ampifluor [este estudo]
Porto Velho, Rondônia (1995)	8	2	5	0	1	Ensaio Ampifluor [Orjuela-Sánchez et al., 2010]
Paragominas, Pará (2004)	28	0	0	24	4	Sequenciamento [Gama et al., 2009]
Total	264	191 (72.3%)	40 (15.1%)	25 (9.5%)	8 (3.0%)	
Guiana Francesa						
Locais desconhecidos	4	4 (100%)	0	0	0	Sequenciamento [Brega et al., 2005]
Honduras						
Tegucigalpa, Juticalpa, Puerto Lempira, Trujillo, La Cerba (2004-09)	37	29 (78.4%)	1 (2.7%)	3 (8.1%)	4 (10.8%)	Sequenciamento [Jovel et al., 2011]
África						
Mauritânia						
Nouakchott (2007-09)	103	2 (1.9%)	73 (70.9%)	0	28 (27.2%)	Sequenciamento [Mint Lekweiry et al., 2012]

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012) (em fase de submissão)³.

³ Vargas-Rodriguez RCM. Single-Nucleotide Polymorphism and Copy Number Variation at the *multidrug resistance-1 (mdr-1)* Locus of *Plasmodium vivax*: Local and Global Patterns. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.

Tabela 19 - Prevalência das mutações Y976F e F1076L no gene *pvmdr-1* em isolados de *P. vivax* de diversas regiões geográficas. **(continuação)**

Local (data)	Número de amostras	Tipo selvagem YF	Mutação simples YL	Mutação simples FF	Dupla mutação FL	Método de tipagem [referência]
Madagascar						
Sul (2006)	5	0	0	0	5	Sequenciamento [Barnadas et al., 2008]
Oriente (2006)	53	0	1	0	52	Sequenciamento [Barnadas et al., 2008]
Planalto Central (2006)	22	0	0	0	22	Sequenciamento [Barnadas et al., 2008]
Total	80	0	1 (1.2%)	0	79 (98.7%)	
Ásia						
Azerbaijão						
Região Central	4	0	4 (100%)	0	0	Sequenciamento [Brega et al., 2005]
Turquia						
Região Sudeste	3	0	3 (100%)	0	0	Sequenciamento [Brega et al., 2005]
Sri Lanka						
Trincomalee (2007)	20	8 (40.0%)	8 (40.0%)	0	4 (20.0%)	Ensaio Ampifluor [Orjuela-Sánchez et al., 2010]
Camboja						
Pursat (2008)	69	7 (10.1%)	1 (1.4%)	0	61 (88.4%)	Ensaio Ampifluor [Orjuela-Sánchez et al., 2010]
Vietnã						
Bao Loc (1995)	9	0	0	0	9 (100%)	Ensaio Ampifluor [Orjuela-Sánchez et al., 2010]
Myanmar						
Yangon (1999)	11	6	3	0	2	Sequenciamento [Lu F et al., 2011]
Locais desconhecidos	5	2	0	0	3	Sequenciamento [Imwong et al., 2008]

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012) (em fase de submissão)⁴.

⁴ Vargas-Rodriguez RCM. Single-Nucleotide Polymorphism and Copy Number Variation at the *multidrug resistance-1 (mdr-1)* Locus of *Plasmodium vivax*: Local and Global Patterns. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.

Tabela 19 - Prevalência das mutações Y976F e F1076L no gene *pvmdr-1* em isolados de *P. vivax* de diversas regiões geográficas. **(continuação)**

Local (data)	Número de amostras	Tipo selvagem YF	Mutação simples YL	Mutação simples FF	Dupla mutação FL	Método de tipagem [referência]
Total	16	8 (50.0%)	3 (18.7%)	0	5 (31.2%)	
Laos						
Locais desconhecidos	5	0	5 (100%)	0	0	Sequenciamento [Imwong et al., 2008]
Tailândia						
Mae Sod, Tak	9	4	1	0	4	Sequenciamento [Brega et al., 2005]
Mae Sod, Tak (2003-06)	7	0	2	0	5	Sequenciamento [Suwanarusk et al., 2007]
Mae Sod, Tak (2008)	24	8	11	0	5	Sequenciamento [Lu F et al., 2011]
Locais desconhecidos, Tak	11	3	7	0	1	Sequenciamento [Imwong et al., 2008]
Total	51	15 (29.4%)	21 (41.2%)	0	15 (29.4%)	
Indonésia						
Alor, East Nusa Tenggara	3	1	0	0	2	Sequenciamento [Brega et al., 2005]
Timika, Papua (2003-06)	24	0	1	0	23	Sequenciamento [Suwanarusk et al., 2007]
Total	27	1 (3.7%)	1 (3.7%)	0	25 (92.6%)	
Coréia do Sul						
Locais desconhecidos (2007-09)	96	0	96 (100%)	0	0	Sequenciamento [Lu F et al., 2011]
Oceania						
Papua New Guinea						
Simbu, East Sepik e Madang (2004-05)	94	57	0	37	0	Ensaio de ressonância fluorescente [Marfurt et al., 2008]

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012) (em fase de submissão)⁵.

⁵ Vargas-Rodriguez RCM. Single-Nucleotide Polymorphism and Copy Number Variation at the *multidrug resistance-1 (mdr-1)* Locus of *Plasmodium vivax*: Local and Global Patterns. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.

Tabela 19 - Prevalência das mutações Y976F e F1076L no gene *pvmdr-1* em isolados de *P. vivax* de diversas regiões geográficas. **(conclusão)**

Local (data)	Número de amostras	Tipo selvagem YF	Mutação simples YL	Mutação simples FF	Dupla mutação FL	Método de tipagem [referência]
Local desconhecido (2008)	1	0	0	0	1	Sequenciamento [Lu F et al., 2011]
Total	95	57 (60.0%)	0	37 (38.9%)	1 (1.0%)	
Total geral	883	322 (36.5%)	257 (29.1%)	65 (7.4%)	239 (27.1%)	

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012) (em fase de submissão)⁶.

⁶ Vargas-Rodriguez RCM. Single-Nucleotide Polymorphism and Copy Number Variation at the *multidrug resistance-1 (mdr-1)* Locus of *Plasmodium vivax*: Local and Global Patterns. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.

Tabela 20 - Número de cópias do gene *pvmdr-1* em isolados de *P. vivax* de diversas regiões geográficas.
(continua)

Local (data)	Número de amostras	Número de cópias do gene <i>pvmdr-1</i>			Método para estimar número de cópias [referência]
		1	2	3	
Américas					
Brasil					
Acrelândia, Acre (2008--10)	10	10	0	0	PCR em tempo real [este estudo]
Plácido de Castro, Acre (2008--10)	54	53	1	0	PCR em tempo real [este estudo]
Granada (2004-06)	97	96	1	0	PCR em tempo real [este estudo]
Remansinho (2008-10)	54	0	0	0	PCR em tempo real [este estudo]
Total	215	213 (99.1%)	2 (0.9%)	0	
Honduras					
Tegucigalpa, Juticalpa, Puerto Lempira, Trujillo, La Cerba (2004-09)	63	62 (98.4%)	1 (1.6%)	0	PCR em tempo real [Jovel et al., 2011]
África					
Mauritânia					
Nouakchott (2007-09)	105	102 (97.1%)	3 (2.9%)	0	Ensaio TaqMan [Mint Lekweiry et al., 2012]
Ásia					
Myanmar					
Yangon (1999)	11	11	0	0	Ensaio TaqMan [Lu F et al., 2011]
Locais desconhecidos	49	48	1	0	Ensaio TaqMan [Imwong et al., 2008]
Total	60	59 (98.3%)	1 (1.7%)	0	
Laos					
Locais desconhecidos	50	48 (96.0%)	2 (4.0%)	0	Ensaio TaqMan [Imwong et al., 2008]
Tailândia					

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012) (em fase de submissão)⁷.

⁷ Vargas-Rodriguez RCM. Single-Nucleotide Polymorphism and Copy Number Variation at the *multidrug resistance-1 (mdr-1)* Locus of *Plasmodium vivax*: Local and Global Patterns. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.

Tabela 20 - Número de cópias do gene *pvmdr-1* em isolados de *P. vivax* de diversas regiões geográficas.
(conclusão)

Número de cópias do gene <i>pvmdr-1</i>					
Local (data)	Número de amostras	1	2	3	Método para estimar número de cópias [referência]
Mae Sod, Tak (2008)	27	25	2	0	Ensaio TaqMan [Lu F et al., 2011]
Locais desconhecidos, Tak	66	60	6	0	Ensaio TaqMan [Imwong et al., 2008]
Locais desconhecidos, fora de Tak	50	50	0	0	Ensaio TaqMan [Imwong et al., 2008]
Mae Sod, Tak (2003-07)	71	56	13	2	PCR em tempo real [Suwanarusk et al., 2008]
Total Indonésia	214	191 (89.4%)	21 (9.8%)	2 (0.9%)	
Timika, Papua (2003--07)	114	114 (100%)	0	0	PCR em tempo real [Suwanarusk et al., 2008]
Coréia do Sul					
Locais desconhecidos	96	96 (100%)	0	0	Ensaio TaqMan [Lu F et al., 2011]
Total geral	917	885 (96.5%)	30 (3.3%)	2 (0.2%)	

Fonte: Vargas-Rodriguez (2012) (em fase de submissão)⁸.

⁸ Vargas-Rodriguez RCM. Single-Nucleotide Polymorphism and Copy Number Variation at the *multidrug resistance-1 (mdr-1)* Locus of *Plasmodium vivax*: Local and Global Patterns. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.

6 CONCLUSÕES

1. A resistência à CQ em amostras recém-coletadas e criopreservadas de *P. vivax* por avaliação fenotípica não foi estabelecida neste estudo. Não se conseguiu calcular as IC_{50} , devido ao escasso desenvolvimento do parasito, sempre inferior aos 40% de esquizontes maduros, até mesmo modificando as condições de cultura.
2. Mutações na posição Y976F, potencialmente associada à resistência à CQ em *P. vivax* não foram observadas em amostras colhidas entre 2008 e 2010 e foram raras em amostras colhidas entre 2004 e 2007. Apenas 10% dos isolados apresentaram a mutação F1076L, que usualmente acompanha à mutação Y976F.
3. Somente dois isolados de *P. vivax* dos 215 avaliados apresentaram duas cópias do gene *pvmdr-1*. Isto sugere que a duplicação gênica, potencial mecanismo de resistência à mefloquina, ainda não está disseminada nas populações de parasitos desta região.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LH, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66:641-48.
- Arias AE, Corredor A. Low response of Colombian strains of *Plasmodium vivax* to classical antimalarial therapy. *Trop Med Parasitol.* 1989;40:21-3.
- Baird JK. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:4075-83.
- Baird JK. Resistance to therapies for infection by *Plasmodium vivax*. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:508-34.
- Barnadas C, Ratsimbaoa A, Tichit M, Bouchier C, Jahevitra M, Picot S, Menard D. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in Madagascar: clinical efficacy and polymorphisms in *pvm-dr1* and *pvcr-t-o* genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:4233-40.
- Basco LK. Field application of in vitro assays for the sensitivity of human malaria parasites to antimalarial drugs. Geneva: World Health Organization; 2007.
- Bray PG, Martin RE, Tilley K, Ward SA, Kirk K, Fidock DA. Defining the role of PfCRT in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance. *Mol Microbiol.* 2005;56:323-33.
- Brega S, Meslin B, de Monbrison F, Severini C, Gradoni L, Udomsangpetch R, Sutanto I, Peyron F, Picot S. Identification of the *Plasmodium vivax mdr-like* gene (*pvm-dr1*) and analysis of single-nucleotide polymorphisms among isolates from different areas of endemicity. *J Infect Dis.* 2005;191:272-77.
- Brockelman CR, Tan-ariya P, Menabandhu C. The influence of magnesium ion and ascorbic acid on the erythrocytic schizogony of *Plasmodium vivax*. *Parasitol Res.* 1987;73:107-12.
- Chotivanich K, Silamut K, Udomsangpetch R, Stepniewska KA, Pukrittayakamee S, Looareesuwan S, White NJ. Ex-vivo short-term culture and developmental assessment of *Plasmodium vivax*. *Transactions of the Royal Society of Trop Med Hyg.* 2001;95:677-80.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editor. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: simple references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>.

Chotivanich K, Udomsangpetch R, Chierakul W, Newton PN, Ruangveerayuth R, Pukrittayakamee S, Looareesuwan S, White NJ. In vitro efficacy of antimalarial drugs against *Plasmodium vivax* on the western border of Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;70:395–7.

de Monbrison F, Raynaud D, Latour-Fondanaiche C, Staal A, Favre S, Kaiser K, Peyron F, Picot S. Real-time PCR for chloroquine sensitivity assay and for pfmdr1-pfcrtr single nucleotide polymorphisms in *Plasmodium falciparum*. *J Microbiol Methods*. 2003;54:391-401.

de Santana Filho FS, Arcanjo AR, Chehuan YM, Costa MR, Martinez-Espinosa FE, Vieira JL, Barbosa MG, Alecrim WD, Alecrim MG. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:1125-26.

Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y, Dicko A, Su XZ, Nomura T, Fidock DA, Wellems TE, Plowe CV, Coulibaly D. A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *N Engl J Med*. 2001;344:257-63.

Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, Lwin KM, Arie F, Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NP, Lindegardh N, Socheat D, White NJ. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 2009;361:455-567.

Endicott JA, Ling EV. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem*. 1989;58:137-71.

Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, Ursos LMB, Amar bir Singh Sidhu, Naudé B, Deitsch KW, Xin-zhuan Su, Wootton JC, Roepe PD, Wellems TE. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell*. 2000;6:861-71.

Gama BE, de Oliveira NK, de Souza JM, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz MF. Characterisation of *pvmdr1* and *pvdhfr* genes associated with chemoresistance in Brazilian *Plasmodium vivax* isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:1009-11.

Gonçalves RM, Salmazi KC, Santos BA, Bastos MS, Rocha SC, Boscardin SB, Silber AM, Kallás EG, Ferreira MU, Scopel KK. CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T cells, dendritic cells and circulating cytokines in uncomplicated malaria: do different parasite species elicit similar host responses? *Infect Immun*. 2010;78:4763-72.

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

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

Imwong M, Pukrittayakamee S, Pongtavornpinyo W, Nakeesathit S, Nair S, Newton P, Nosten F, Anderson TJC, Dondorp A, Day NP, White NJ. Gene amplification of the *multidrug resistance 1* gene of *Plasmodium vivax* isolates from Thailand, Laos, and Myanmar. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:2657-59.

Jovel IT, Mejia RE, Banegas E, Piedade R, Alger J, Fontecha G, Ferreira PE, Veiga MI, Enamorado IG, Bjorkman A, Ursing J. Drug resistance associated genetic polymorphisms in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* collected in Honduras, Central America. *Malar J.* 2011;10:376.

Kaddouri H, Nakache S, Houzé S, Mentré F, Le Bras J. Drug susceptibility of *Plasmodium falciparum* clinical isolates from Africa using *Plasmodium* lactate dehydrogenase immunodetection assay and inhibitory Emax model for precise IC50 measurement. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:3343-9.

Kimura M, Kaneko O, Liu Q, Zhou M, Kawamoto F, Wataya Y, Otani S, Yamaguchi Y, Tanabe K. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasitol Int.* 1997;46:91-5.

Kosaisavee V, Suwanarusk R, Nosten F, Kyle DE, Barrends M, Jones J, Price R, Russell B, Lek-Uthai U. *Plasmodium vivax*: isotopic, PicoGreen, and microscopic assays for measuring chloroquine sensitivity in fresh and cryopreserved isolates. *Exp Parasitol.* 2006;114:34-9.

Krogstad DJ, Gluzman YV, Kyle DE, Oduola AM, Martin SK, Milhous WE, Schlesinger PH. Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. *Science.* 1987;238:1283-5.

Lu F, Lim CS, Nam DH, Kim K, Lin K, Kim TS, Lee HW, Chen JH, Wang Y, Sattabongkot J, Han ET. Genetic polymorphism in *pvmdr1* and *pvcr1-o* genes in relation to in vitro drug susceptibility of *Plasmodium vivax* isolates from malaria-endemic countries. *Acta Trop.* 2011;117:69-75.

Marfurt J, de Monbrison F, Brega S, Barbolat L, Mueller I, Sie A, Goroti M, Reeder JC, Beck HP, Picot S, Genton B. Molecular markers of in vivo *Plasmodium vivax* resistance to amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine: mutations in *pvdhfr* and *pvmdr1*. *J Infect Dis.* 2008;198:409-17.

Mint Lekweiry K, Ould Mohamed Salem Boukhary A, Gaillard T, Wurtz N, Bogreau H, Hafid JE, Trape JF, Bouchiba H, Ould Ahmedou Salem MS, Pradines B, Rogier C, Basco LK, Briolant S. Molecular surveillance of drug-resistant *Plasmodium vivax* using *pvdhfr*, *pvdhps* and *pvmdr1* markers in Nouakchott, Mauritania. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:367-74.

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

Nazarenko IA, Bhatnagar SK, Hohman RJ. A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:2516-21.

Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 1989;17:2503-16.

Nomura T, Carlton JM, Baird JK, del Portillo HA, Fryauff DJ, Rathore D, Fidock DA, Su XZ, Collins WE, McCutchan TF, Wootton JC, Wellem TE. Evidence for different mechanisms of chloroquine resistance in 2 *Plasmodium* species that cause human malaria. *J Infect Dis.* 2001;183:1653-61.

Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J.* 2010;9:115.

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

Orjuela-Sánchez P, de Santana Filho FS, Machado-Lima A, Chehuan YF, Costa MR, Alecrim MG, del Portillo HA. Analysis of single-nucleotide polymorphisms in the crt-o and mdr1 genes of *Plasmodium vivax* among chloroquine-resistant isolates from the Brazilian Amazon region. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009b;53:3561-4.

Orjuela-Sánchez P, Karunaweera NK, da Silva-Nunes M, da Silva NS, Scopel KKG, Gonçalves RM, Amaratunga C, Sá JM, Socheat D, Fairhurst RM, Gunawardena S, Thavakodirasah T, Galappaththy GNL, Abeyasinghe RR, Kawamoto F, Wirth DF, Ferreira MU. Single-nucleotide polymorphism, linkage disequilibrium and geographic structure in the malaria parasite *Plasmodium vivax*: prospects for genome-wide association studies. *BMC Genet.* 2010;11:65.

Penman B, Buckee C, Gupta S, Nee S. Genome-wide association studies in *Plasmodium* species. *BMC Biology.* 2010;8:90.

Phillips EJ, Keystone JS, Kain KC. Failure of combined chloroquine and high-dose primaquine therapy for *Plasmodium vivax* malaria acquired in Guyana, South America. *Clin Infect Dis.* 1996;23:1171-3.

Price RN, Uhlemann AC, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, Patel R, Laing K, Looareesuwan S, White NJ, Nosten F, Krishna S. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased pfmdr1 gene copy number. *Lancet.* 2004;364:438-47.

Price RN, Douglas NM, Anstey NM. New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. *Curr Opin Infect Dis*. 2009;22:430-5.

Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, Cowman AF. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2000;403:906-9.

Ruebush TK 2nd, Zegarra J, Cairo J, Andersen EM, Green M, Pillai DR, Marquiño W, Huilca M, Arévalo E, Garcia C, Solary L, Kain KC. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* malaria in Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;69:548-52.

Russell BM, Udomsangpetch R, Rieckmann KH, Kotecka BM, Coleman RE, Sattabongkot J. Simple in vitro assay for determining the sensitivity of *Plasmodium vivax* isolates from fresh human blood to antimalarials in areas where *P. vivax* is endemic. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:170-3.

Russell BM, Chalfein F, Prasetyorini B, Kenangalem E, Piera K, Suwanarusk R, Brockman A, Prayoga P, Sugiarto P, Cheng Q, Tjitra E, Anstey NM, Price RN. Determinants of in vitro drug susceptibility testing of *Plasmodium vivax*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:1040-5.

Sa JM, Nomura T, Neves JD, Baird JK, Wellems TE, del Portillo HA. *Plasmodium vivax*: allele variants of the *mdr1* gene do not associate with chloroquine resistance among isolates from Brazil, Papua, and monkey-adapted strains. *Exp Parasitol*. 2005;109:256-9.

Sa JM, Yamamoto MM, Fernandez-Becerra C, de Azevedo MF, Papakrivovs J, Naude B, Wellems TE, del Portillo HA. Expression and function of *pvcrt-o*, a *Plasmodium vivax* ortholog of *pfcr*, in *Plasmodium falciparum* and *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biochem Parasitol*. 2006;150:219-28.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Sattabongkot J, Tsuboi T, Zollner GE, Sirichaisinthop J, Cui L. *Plasmodium vivax* transmission: chances for control? *Trends Parasitol*. 2004;20:192-8.

Suwanarusk R, Russell B, Chavchich M, Chalfein F, Kenangalem E, Kosaisavee V, Prasetyorini B, Piera KA, Barends M, Brockman A, Lek-Uthai U, Anstey NM, Tjitra E, Nosten F, Cheng Q, Price RN. Chloroquine resistant *Plasmodium vivax*: in vitro characterisation and association with molecular polymorphisms. *PLoS One*. 2007;2:e1089.

Suwanarusk R, Chavchich M, Russell B, Jaidee A, Chalfein F, Barends M, Prasetyorini B, Kenangalem E, Piera KA, Lek-Uthai U, Anstey NM, Tjitra E, Nosten F, Cheng Q,

Price RN. Amplification of *pvmdr1* associated with multidrug-resistant *Plasmodium vivax*. J Infect Dis. 2008;198:1558-64.

Talisuna AO, Bloland P, D'Alessandro U. History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance. Clin Microbiol Rev. 2004;17:235-54.

Tasanor O, Noedl H, Na-Bangchang K, Congpuong K, Sirichaisinthop J, Wernsdorfer WH. An in vitro system for assessing the sensitivity of *Plasmodium vivax* to chloroquine. Acta Trop. 2002;83:49-61.

Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. Science. 1976;193:673-5.

Udomsangpetch R, Kaneko O, Chotivanich K, Sattabongkot J. Cultivation of *Plasmodium vivax*. Trends Parasitol. 2008;24:85-8.

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

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

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

Wellems TE, Panton LJ, Gluzman YV, do Rosario VE, Gwadz RW, Walker-Jonah A, Krogstad DJ. Chloroquine resistance not linked to *mdr-like* genes in a *Plasmodium falciparum* cross. Nature. 1990;345:253-5.

ANEXOS

ANEXO A - Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes menores de 18 anos

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(menores de 18 anos)

ESTUDO: Resistência à Cloroquina em *Plasmodium vivax*: Avaliação Fenotípica e Molecular na Amazônia Ocidental Brasileira

Seu (sua) filho (a) está sendo convidado (a) a participar do presente estudo. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Leia atentamente. Caso tenha dúvidas, teremos prazer em esclarecê-las. Se concordar, o documento será assinado e só então daremos início ao estudo. Sua colaboração será muito importante para nós. Mas, se quiser desistir a qualquer momento, isto não causará nenhum prejuízo, nem a você, nem ao (à) seu (sua) filho (a).

Eu, RG, abaixo assinado (a), concordo de livre e espontânea vontade que meu (minha) filho (a) nascido (a) em ____ / ____ /____, seja voluntário no estudo “Resistência à Cloroquina em *Plasmodium vivax*: Avaliação Fenotípica e Molecular na Amazônia Ocidental Brasileira”.

Assim mesmo, declaro que obtive todas as informações necessárias e que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Estou ciente que o estudo se faz necessário para que se possam estudar casos de resistência dos parasitos que ocasionam a Malária ao tratamento com Cloroquina.

A malária é uma doença infecciosa ocasionada por parasitos do gênero *Plasmodium* e transmitida pela picada do mosquito denominado *Anopheles*, sendo os sintomas principais: dor de cabeça, fadiga, febre, náuseas, calafrios e sudoração.

Para a realização do estudo:

I) Será feita a coleta de 20 ml. de sangue venoso, do (a) meu (minha) filho (a), se ele (ela) estivesse infectado (a) com malária por *Plasmodium vivax*;

II) Estas coletas serão feitas apenas para este estudo e em nada influenciarão o tratamento do (a) meu (minha) filho (a); podendo apresentar no momento da coleta das amostras um pequeno incômodo de dor da picada de agulha;

III) A participação neste estudo não tem fins terapêuticos e será sem custo algum para mim;

IV) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de dar qualquer explicação;

V) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem a meu (minha) filho (a), nem interferirá no atendimento ou tratamento médico a que ele (ela) estiver sendo submetido;

VI) Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo em que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome, nem o do (a) meu (minha) filho (a) sejam mencionados;

VII) Caso eu deseje, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final deste estudo;

() Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

() Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

VIII) Poderei contatar a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – ICB/USP -, no Fone (11) 3091-7733, (11) 3091-7746 ou (11) 8508-2733 para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo.

_____, de _____ de 20

() Paciente/() Responsável

.....

Testemunha 1: _____

Nome / RG / Telefone

Testemunha 2: _____

Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto:

Rosa Del Carmen Miluska Vargas Rodriguez

Química Farmacêutica

RNE V657341-Q

ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes adultos

Universidade de São Paulo

Instituto de Ciências Biomédicas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Modelo padrão

ESTUDO: Resistência à Cloroquina em *Plasmodium vivax*: Avaliação Fenotípica e Molecular na Amazônia Ocidental Brasileira

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu.....
 , de profissão....., residente e domiciliado (a) na
, portador (a) da Cédula de identidade RG
, e inscrito (a) no CPF/MF....., nascido (a) em
 ____ / ____ /____, abaixo assinado (a), concordo de livre e espontânea vontade
 em participar como voluntário (a) do estudo “Resistência à Cloroquina em *Plasmodium vivax*: Avaliação Fenotípica e Molecular na Amazônia Ocidental Brasileira”.

Assim mesmo, declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que o estudo se faz necessário para que se possam estudar casos de resistência dos parasitos que ocasionam a Malária ao tratamento com Cloroquina.

A malária é uma doença infecciosa ocasionada por parasitos do gênero *Plasmodium* e transmitida pela picada do mosquito denominado *Anopheles*, sendo os sintomas principais: dor de cabeça, fadiga, febre, náuseas, calafrios e sudoração.

Para a realização do estudo:

I) Será realizada a coleta de 20 ml. de sangue venoso, se eu estivesse infectado (a) com malária por *Plasmodium vivax*;

II) Essa coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciarão o meu tratamento; não vão me curar; não vão me causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue);

III) A participação neste projeto não tem objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não me acarretará qualquer despesa econômica com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados com o estudo;

IV) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

V) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;

VI) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;

VII) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa;

() Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

() Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

VIII) Concordo que o material poderá ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa;

() Sim ou () Não

IX) Poderei contatar a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – ICB/USP, no Fone (11) 3091-7733, (11) 3091-7746 ou (11) 8508-2733 para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo.

_____, de _____ de 20____

() Paciente/() Responsável

.....

Testemunha 1:

Nome / RG / Telefone

Testemunha 2: _____

Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto:

Rosa Del Carmen Miluska Vargas Rodriguez

Química Farmacêutica

RNE V657341-Q