Rosa Del Carmen Miluska Vargas-Rodriguez

**Comportamento de *Plasmodium falciparum* frente aos esquemas
terapêuticos de primeira linha para malária: avaliação da sensibilidade *in*
vitro e do mecanismo de dormência das terapias combinadas com
artemisinina**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientadora: Profa. Dra. Silvia Maria Fátima Di
Santi

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Vargas-Rodriguez, Rosa Del Carmen Miluska

Comportamento de *Plasmodium falciparum* frente aos esquemas terapêuticos de primeira linha para malária: avaliação da sensibilidade *in vitro* e do mecanismo de dormência das terapias combinadas com artemisinina / Rosa Del Carmen Miluska Vargas-Rodriguez. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Sílvia Maria Fátima Di Santi.

Descritores: 1.Malária 2.*Plasmodium falciparum* 3.Antimaláricos 4.*Artemísia annua* 5.Quimioterapia 6.Resistência a drogas

USP/FM/DBD-385/16

*A Deus, por todo seu amor e por todos os
acontecimentos.*

Aos meus amados pais Martha Luz e Felipe Segundo, por todo seu amor e apoio incondicional. Por ter me acompanhado e motivado sempre.

Aos meus amados irmãos Martha Natalí e Juan Felipe, por todo seu amor, conselhos e compreensão.

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

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, a Profa. Dra. Silvia Maria Fátima Di Santi, por ter me orientado, compartilhado seus valiosos conhecimentos comigo e apoiado sempre durante a realização do meu estudo. Por toda sua ajuda, solidariedade e dedicação. Muito obrigada por tudo.

Ao Prof. Dr. Andrés Jimenez Galisteo Jr, pelo apoio na execução dos ensaios de citometria de fluxo, orientações e ensinamentos. Muito obrigada por ter compartilhado seus conhecimentos e tempo conosco.

Ao Prof. Dr. Gerhard Wunderlich, pelas orientações e conselhos na cultura dos parasitos.

Ao senhor, sou muito agradecida por suas recomendações que facilitaram muito o presente trabalho e pela doação do isolado NF54 de *P. falciparum*.

Ao Prof. Dr. Alejandro Miguel Katzin e à sua equipe de trabalho, pelas orientações e oportunidades de aprendizado que resultaram do convívio com vocês.

À Bióloga Maria de Jesus Costa do Nascimento, pela amizade, apoio nos experimentos e auxílio na preparação de materiais de laboratório.

À Bióloga Noemia Mie Orij, pela amizade, suporte no desenvolvimento e análise dos resultados de citometria de fluxo.

Às autoridades do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP) e do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER), por terem possibilitado que a nossa equipe trabalhasse com os microscopistas no diagnóstico e recrutamento dos pacientes infectados com malária *falciparum*.

À Profa. Dra. Vera Lúcia Pagliusi Castilho, pelo suporte na coleta das amostras sanguíneas do IIER.

Às enfermeiras e aos médicos do IIER pelo apoio na coleta de amostras sanguíneas: Juliana Masson Pasquale, Dra. Luciana Marques Sansão Borges, Dr. Ralcyon Francis Azevedo Teixeira e Dr. Jessé Reis Alves.

Aos meus amigos microscopistas do Ambulatório dos Viajantes do HC/FMUSP e do IIER: Christina Rita de Camilo Toniollo, Wilma Assunção Iuliano, Juliana Souto, Edna Oshino, Sueli e Priscila, pela amizade e apoio incondicional no diagnóstico microscópico. Grande parte deste trabalho é devido a vocês e por isso lhes agradeço muito.

Aos Professores, Ronaldo César Borges Gryscek, José Ângelo Lauletta Lindoso e Eliseu Alves Waldman, pelas sugestões apresentadas no Exame de Qualificação.

À Maria Silvia Araújo Pereira de Paula, por seu grande apoio, disponibilidade e auxílio na preparação de materiais de laboratório. Sua ajuda facilitou muito o presente trabalho.

Às minhas queridas amigas: Lia, Giselle, Juliana, Angélica, Rose e Malu pela amizade, carinho, maravilhosa companhia, colaboração e ensinamentos. Muito obrigada por tudo!

À minhas queridas amigas Michelle Petronilo Sarmento e Danila Daniel por todo seu apoio, maravilhosa amizade e conselhos.

À Raquel Maria Simão Gurge, a Lígia Ferreira Martins e Adriana Alejandra Marin Rodriguez, pelo suporte e orientações na cultura dos parasitos e nos cálculos matemáticos.

Ao Seminário Laveran e Deane organizado pela Fundação Oswaldo Cruz, pela valiosa oportunidade de participar neste evento e pelas fundamentais sugestões que ajudaram a aprimorar o presente trabalho.

Ao Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da FMUSP, pela acolhida fraterna, ensinamentos e por ter me permitido desenvolver a minha tese de Doutorado em suas instalações.

À louvável instituição Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2013/19588-8), que possibilitou que eu realizasse meu Doutorado no Brasil, outorgando-me assistência e auxílio financeiro.

À Superintendência de Controle de Endemias, pela possibilidade de realizar meu estudo no Núcleo de Estudos em Malária, fornecendo estrutura laboratorial.

À Roseli Antônia Santo e Letícia Claudi de Oliveira, secretárias do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da FMUSP, pela gentileza nos esclarecimentos das informações relacionadas à Pós-Graduação.

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

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

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

*Caminhante, são tuas pegadas o caminho e nada mais;
caminhante, não há caminho, se faz caminho ao andar.*

*Ao andar se faz caminho e ao voltar a vista atrás
se vê a senda que nunca se há de voltar a pisar.*

Caminhante não há caminho senão há marcas no mar...

Antonio Machado

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1	Área de estudo	21
3.2	População.....	21
3.2.1	Aspectos éticos da pesquisa.....	24
3.2.2	Definição de caso	24
3.2.3	Processamento das amostras sanguíneas	25
3.3	Preparo das microplacas com DHA, AS, LMF e MFQ	25
3.4	Criopreservação	27
3.5	Ensaio de sensibilidade.....	28
3.5.1	Ensaio fenotípicos com isolados criopreservados de <i>P. falciparum</i>	28
3.5.1.1	Ensaio de sensibilidade <i>in vitro</i> do isolado NF54 de <i>P. falciparum</i>	29
3.5.1.2	Ensaio de sensibilidade <i>in vitro</i> dos isolados Am 16/16, Am 17/16, Am 21/16 e FS27/16 de <i>P. falciparum</i>	30
3.5.2	Ensaio fenotípicos com isolados clínicos de <i>P. falciparum</i>	31
3.5.2.1	Ensaio de sensibilidade <i>ex-vivo</i> de isolados clínicos de <i>P. falciparum</i>	31
3.6	Ensaio de dormência	34
3.6.1	Monitoramento da recrudescência <i>in vitro</i> com NF54 de <i>P. falciparum</i>	34
3.6.2	Monitoramento da recrudescência <i>in vitro</i> com isolados clínicos de <i>P. falciparum</i>	35
3.6.2.1	Monitoramento da recrudescência <i>in vitro</i> com o isolado S-01/15 de <i>P. falciparum</i>	35
3.6.2.2	Monitoramento da recrudescência <i>in vitro</i> com o isolado FS 08/15 de <i>P. falciparum</i>	36
3.7	Citometria de fluxo.....	38
3.7.1	Preparo das soluções de Rodamina 123, DAPI e JC-1 para marcação de	

parasitos	38
3.7.2 Marcação de <i>P. falciparum</i> com Rodamina 123, DAPI e JC-1	39
3.7.3 Determinação dos estágios de <i>P. falciparum</i>	41
3.7.4 Avaliação da viabilidade e do fenômeno de dormência do isolado NF54 de <i>P. falciparum</i> por citometria de fluxo	43
3.8 Ensaio de sobrevivência do trofozoíto jovem (<i>Ring Stage Survival Assay</i> - RSA) do isolado <i>P. falciparum</i> NF54 frente à DHA e LMF	47
3.9 Diagnóstico molecular.....	49
4 RESULTADOS.....	51
4.1 Controle de qualidade.....	52
4.2 Ensaio de sensibilidade.....	55
4.2.1 Ensaio de sensibilidade <i>ex-vivo</i> e <i>in vitro</i> de isolados clínicos de <i>P. falciparum</i>	55
4.2.2 Ensaio de sensibilidade e monitoramento da recrudescência <i>in vitro</i> do isolado NF54 de <i>P. falciparum</i>	70
4.2.3 Ensaio de sensibilidade e monitoramento da recrudescência <i>in vitro</i> dos isolados de campo S-01/15 e FS 08/15 de <i>P. falciparum</i>	72
4.3 Determinação dos estágios sanguíneos do isolado NF54 de <i>P. falciparum</i> em ensaios de citometria de fluxo.....	78
4.4 Comparação entre a avaliação por microscopia e citometria de fluxo em ensaio de sensibilidade <i>in vitro</i> do isolado NF54 de <i>P. falciparum</i>	82
4.5 Ensaio de sobrevivência do trofozoíto jovem (<i>Ring Stage Survival Assay</i> - RSA) do isolado <i>P. falciparum</i> NF54 frente à DHA e LMF	89
5 DISCUSSÃO	90
6 CONCLUSÕES	96
7 ANEXOS.....	98
8 REFERÊNCIAS	109

QUADROS

Quadro 1	Principais drogas associadas e ACTs utilizadas atualmente	9
Quadro 2	Mutações validadas e candidatas para conferir resistência no gene <i>PfK13</i>	11
Quadro 3	Origem dos isolados clínicos de <i>P. falciparum</i> coletados entre 2014 e 2016.....	23
Quadro 4	Parasitemia inicial e drogas testadas em isolados clínicos de <i>P. falciparum</i> nos ensaios de sensibilidade <i>ex-vivo</i> e <i>in vitro</i> às ACTs	33
Quadro 5	Ensaio de citometria de fluxo para a localização das fases de desenvolvimento do isolado NF54 de <i>P. falciparum</i> nos gráficos <i>dot plots</i>	43
Quadro 6	Ensaio de citometria de fluxo para avaliação da viabilidade e do fenômeno de dormência do isolado NF54 de <i>P. falciparum</i>	46

TABELAS

Tabela 1	Teste de sensibilidade <i>in vitro</i> do isolado NF54 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA e LMF baseado no número de esquizontes/200 parasitos. A	52
Tabela 2	Teste de sensibilidade <i>in vitro</i> do isolado NF54 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA e LMF baseado no número de esquizontes/200 parasitos. B.....	53
Tabela 3	Teste de sensibilidade <i>in vitro</i> do isolado NF54 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos.....	53
Tabela 4	Teste de sensibilidade <i>in vitro</i> do isolado NF54 de <i>P. falciparum</i> frente ao ATM e CQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos	54
Tabela 5	Resultados de IC ₅₀ dos testes de sensibilidade <i>in vitro</i> do isolado de referência NF54 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA, LMF, AS, MFQ, ATM e CQ.....	54
Tabela 6	Teste de sensibilidade <i>ex-vivo</i> do isolado S-02/14 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA e LMF baseado no número de esquizontes/200 parasitos	57
Tabela 7	Teste de sensibilidade <i>ex-vivo</i> do isolado FS 05/15 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA e LMF baseado no número de esquizontes/200 parasitos...	58
Tabela 8	Teste de sensibilidade <i>ex-vivo</i> do isolado S-01/15 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA e LMF baseado no número de esquizontes/200 parasitos	58
Tabela 9	Teste de sensibilidade <i>ex-vivo</i> do isolado FS 08/15 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos.....	59

Tabela 10	Teste de sensibilidade <i>ex-vivo</i> do isolado FS 09/15 de <i>P. falciparum</i> frente ao AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos	59
Tabela 11	Teste de sensibilidade <i>ex-vivo</i> do isolado FS 16/15 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos	60
Tabela 12	Teste de sensibilidade <i>ex-vivo</i> do isolado FS 17/15 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos	60
Tabela 13	Teste de sensibilidade <i>ex-vivo</i> do isolado FS 18/15 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos	61
Tabela 14	Teste de sensibilidade <i>ex-vivo</i> do isolado FS 21/15 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos	61
Tabela 15	Teste de sensibilidade <i>ex-vivo</i> do isolado Am 09/16 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos	62
Tabela 16	Teste de sensibilidade <i>ex-vivo</i> do isolado FS 12/16 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos	62
Tabela 17	Teste de sensibilidade <i>ex-vivo</i> do isolado Am 11/16 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos	63
Tabela 18	Teste de sensibilidade <i>ex-vivo</i> do isolado Am 12/16 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA e LMF baseado no número de esquizontes/200 parasitos	63

Tabela 19	Teste de sensibilidade <i>ex-vivo</i> do isolado FS 21/16 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos	64
Tabela 20	Teste de sensibilidade <i>ex-vivo</i> do isolado FS 24/16 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos	64
Tabela 21	Teste de sensibilidade <i>ex-vivo</i> do isolado Am 16/16 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos	65
Tabela 22	Teste de sensibilidade <i>in vitro</i> do isolado Am 16/16 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos	65
Tabela 23	Teste de sensibilidade <i>in vitro</i> do isolado Am 21/16 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos	66
Tabela 24	Teste de sensibilidade <i>in vitro</i> do isolado FS 27/16 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos	66
Tabela 25	Teste de sensibilidade <i>ex-vivo</i> do isolado FS 29/16 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos	67
Tabela 26	Teste de sensibilidade <i>ex-vivo</i> do isolado Am 25/16 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos	67
Tabela 27	Teste de sensibilidade <i>in vitro</i> do isolado Am 17/16 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos	68

Tabela 28 Teste de sensibilidade <i>ex-vivo</i> do isolado FS 31/16 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA e LMF baseado no número de esquizontes/200 parasitos	68
Tabela 29 Resultados de IC ₅₀ dos testes de sensibilidade <i>ex-vivo</i> e <i>in vitro</i> dos isolados clínicos de <i>P. falciparum</i> frente à DHA, LMF, AS e MFQ.....	69
Tabela 30 Intervalos dos resultados de IC ₅₀ dos testes de sensibilidade <i>ex-vivo</i> e <i>in vitro</i> dos isolados clínicos de <i>P. falciparum</i> frente à DHA, LMF, AS e MFQ.....	70
Tabela 31 Ensaio de sensibilidade e avaliação do fenômeno de dormência <i>in vitro</i> do isolado NF54 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA.....	71
Tabela 32 Ensaio de sensibilidade e avaliação do fenômeno de dormência <i>in vitro</i> do isolado NF54 de <i>P. falciparum</i> frente à LMF	71
Tabela 33 Ensaio de sensibilidade e avaliação do fenômeno de dormência <i>in vitro</i> do isolado S-01/15 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA.....	73
Tabela 34 Ensaio de sensibilidade e avaliação do fenômeno de dormência <i>in vitro</i> do isolado S-01/15 de <i>P. falciparum</i> frente à LMF	74
Tabela 35 Ensaio de sensibilidade e avaliação do fenômeno de dormência <i>in vitro</i> do isolado FS-08/15 de <i>P. falciparum</i> frente à DHA.....	75
Tabela 36 Ensaio de sensibilidade e avaliação do fenômeno de dormência <i>in vitro</i> do isolado FS-08/15 de <i>P. falciparum</i> frente à LMF	76
Tabela 37 Ensaio de sensibilidade e avaliação do fenômeno de dormência <i>in vitro</i> do isolado FS-08/15 de <i>P. falciparum</i> frente ao AS.....	77
Tabela 38 Ensaio de sensibilidade e avaliação do fenômeno de dormência <i>in vitro</i> do isolado FS-08/15 de <i>P. falciparum</i> frente à MFQ.....	78

FIGURAS

Figura 1	Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> no hospedeiro vertebrado (reprodução assexuada) e no hospedeiro invertebrado (reprodução sexuada)	3
Figura 2	Mecanismo de resistência à DHA.....	14
Figura 3	Modelo sintético do metabolismo de quiescência de <i>Plasmodium</i>	15
Figura 4	Ensaio de citometria de fluxo com sangue contendo hemácias sem glóbulos brancos (A) e hemácias com glóbulos brancos (B) utilizadas na calibração dos ensaios	80
Figura 5	Ensaio de citometria de fluxo com trofozoítos jovens (anéis) e trofozoítos maduros do isolado NF54 de <i>P. falciparum</i> marcados com Rodamina e DAPI	81
Figura 6	Hemácias não infectadas (A) e infectadas sem pressão de drogas marcadas com Rodamina e DAPI (B).....	83
Figura 7	Parasitos não viáveis submetidos a condições desfavoráveis de cultura <i>in vitro</i> sem e com adição de metanol	84
Figura 8	Ensaio de citometria de fluxo do isolado NF54 de <i>P. falciparum</i> submetido a diferentes concentrações de DHA (1000 nM – 0,2 nM).....	85
Figura 9	Visualização microscópica do isolado NF54 de <i>P. falciparum</i> submetido a diferentes concentrações de DHA (1000 nM – 0,2 nM).....	86
Figura 10	Ensaio de citometria de fluxo do isolado NF54 de <i>P. falciparum</i> submetido a diferentes concentrações de LMF (200 nM – 0,2 nM)	87
Figura 11	Visualização microscópica do isolado NF54 de <i>P. falciparum</i> submetido a diferentes concentrações de LMF (200 nM – 0,2 nM)	88

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
CO₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E	Esquizonte
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina N-2-etanosulfônico
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
N₂	Nitrogênio
nM	Nanomolar
OMS	Organização Mundial da Saúde
O₂	Oxigênio
P	Pontos sem citoplasma
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>nested</i>PCR	Reação em cadeia da polimerase nested
18S rRNA	Porção 18S do ácido ribonucleico ribossômico

rpm	Rotações por minuto
TJ	Trofozoíto jovem
TM	Trofozoíto médio
TMA	Trofozoíto maduro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar

RESUMO

Vargas-Rodriguez RCM. Comportamento de *Plasmodium falciparum* frente aos esquemas terapêuticos de primeira linha para malária: avaliação da sensibilidade *in vitro* e do mecanismo de dormência das terapias combinadas com artemisinina. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

A caracterização fenotípica de *Plasmodium falciparum* permite conhecer o padrão de sensibilidade do parasito às drogas antimaláricas utilizadas em países endêmicos. No presente estudo avaliamos fenotipicamente isolados clínicos de *P. falciparum* provenientes do Continente Africano e do Caribe. A sensibilidade à dihidroartemisinina (DHA: 4 – 1.000 nM), artesunato (AS: 0,1 – 100 nM), lumefantrina (LMF: 3,1 – 200 nM) e mefloquina (MFQ: 0,2 – 1.000 nM) foi investigada por meio de quatro técnicas: (a) ensaio de sensibilidade *ex-vivo* e *in vitro*, (b) ensaio de dormência, (c) ensaio de citometria de fluxo e (d) ensaio de sobrevivência do trofozoíto jovem (*Ring Stage Survival Assay* - RSA). Nos experimentos *ex-vivo* e *in vitro*, os IC₅₀ estabelecidos foram 0,4 - 66,6 nM para DHA; 3,8 - 48,8 nM para LMF; 0,3 - 25,9 nM para AS e 2 - 439 nM para MFQ. No ensaio de dormência, esquizontes foram observados na amostra de referência NF54 de *P. falciparum* e na amostra clínica S-01/15 após pressão com 62,5 nM, 250 nM e 1.000 nM de DHA. O período de recuperação variou de 4 a 40 dias. Para LMF, houve maturação para o estágio de esquizonte no isolado de referência no sétimo e décimo segundo dia após a exposição a 66,6 nM e 200 nM da droga, respectivamente. Esquizontes foram visualizados no isolado clínico FS-08/15 de *P. falciparum* depois da pressão com 100 nM de AS, com recuperação de 0 a 28 dias, portanto sem apresentar dormência. Na citometria de fluxo, trofozoítos jovens viáveis de *P. falciparum* marcados com Rodamina 123 e DAPI foram observados nas máximas concentrações de DHA (1.000 nM) e LMF (200 nM). Finalmente no RSA, a taxa de crescimento (TC) e porcentagem de supervivência (PS) do isolado de referência foi 2,92 e 4,19%, respectivamente, frente a 700 nM de DHA. O mesmo isolado pressionado com 3.500 nM de LMF apresentou 3,6 de TC e 2,25% de PS. A avaliação microscópica dos ensaios de sensibilidade *ex-vivo* e *in vitro* subestima a resposta de *P. falciparum* à terapia combinada com artemisinina (ACT). Nossos resultados sugerem que a dormência, principal mecanismo de tolerância às artemisininas (ART), não aconteceria em todos os isolados clínicos de *P. falciparum*. A citometria de fluxo avaliou com acurácia a viabilidade parasitária. No presente estudo, pela primeira vez foi reportada a dormência de *P. falciparum* à LMF.

Descritores: Malária, *Plasmodium falciparum*, Antimaláricos, *Artemisia annua*, Quimioterapia, Resistência a drogas.

ABSTRACT

Vargas-Rodriguez RCM. Behavior of *Plasmodium falciparum* against first-line regimens for malaria: evaluation of *in vitro* sensitivity and artemisinin combination therapy-induced parasite dormancy. [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

The phenotypic characterization of *Plasmodium falciparum* is useful for the knowledge of parasite sensitivity against antimalarial used in endemic countries. In this study we evaluated the sensitivity of clinical isolates of *P. falciparum* from the African continent and the Caribbean. The sensitivity to dihydroartemisinin (DHA: 4 – 1,000 nM), artesunate (AS: 0.1 - 100 nM), lumefantrine (LMF: 3.1 to 200 nM), and mefloquine (MFQ: 0.2 to 1,000 nM) was investigated through four techniques: (a) *ex vivo* and *in vitro* microtests, (b) dormancy assay, (c) flow cytometry assay and (d) survival assay using young trophozoites (Ring Stage Survival Assay - RSA). In the *ex vivo* and *in vitro* experiments, the IC₅₀ was calculated and was 0.4 – 66.6 nM for DHA; 3.8 – 48.8 nM for LMF; 0.3 – 25.9 nM for AS and 2 - 439 nM for MFQ. According to dormancy assays, schizonts were observed in the *P. falciparum* reference isolate NF54 and in the clinical isolate S-01/15 after pressure with 62.5 nM, 250 nM and 1,000 nM DHA. The recovery period ranged from 4 to 40 days. For LMF was observed the growth to the schizont stage in NF54, in the days 7 e 12 after exposure to 66.6 nM and 200 nM of the drug, respectively. Schizonts were seen in the *P. falciparum* clinical isolate FS-08/15 after pressure with 100 nM of AS, right after incubation period, with no dormancy of trophozoites. In flow cytometry assays, viable young trophozoites of *P. falciparum* labeled with DAPI and Rhodamine 123 were observed at the maximum concentrations of DHA (1,000 nM) and LMF (200 nM). Finally in RSA, the growth rate (GR) and percentage of survival (PS) of the reference isolate was 2.92 and 4.19%, respectively, after pressure with 700 nM of DHA. The same isolate pressed with 3,500 nM of LMF presented GR of 3.6% and PS of 2.25%. In conclusion, microscopic evaluation of *ex vivo* and *in vitro* sensitivity tests underestimates the *P. falciparum* response to artemisinin-based combination therapy (ACT). Our results suggest that the dormancy, main mechanism of tolerance to artemisinin (ART), is not presented in all clinical isolates of *P. falciparum*. Flow cytometry was able to confirm the parasite viability accurately. In this study, for the first time the dormancy of *P. falciparum* after pressure with LMF was reported.

Descriptors: Malaria, *Plasmodium falciparum*, Antimalarials, *Artemisia annua*, Chemotherapy, Drug resistance.

1 INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ciclo biológico de *Plasmodium*

A malária é uma doença infecciosa febril aguda ocasionada por protozoários do gênero *Plasmodium*, transmitida pela picada de fêmeas de *Anopheles* infectadas. São cinco os agentes etiológicos da malária humana: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. O quadro clínico se caracteriza por febre alta, calafrios, sudorese profusa e cefaleia, geralmente em padrões cíclicos. *P. falciparum* é o responsável pela maioria dos casos fatais da doença. O ciclo biológico (Figura 1) se compõe de duas fases: ciclo no hospedeiro vertebrado e ciclo no hospedeiro invertebrado. No hospedeiro vertebrado o ciclo se divide em fase hepática e eritrocitária, onde os parasitos se multiplicam por esquizogonia, causando os sintomas da doença. O ciclo no hospedeiro invertebrado envolve a fase sexuada do parasito, que dá origem às formas infectantes ao homem (Rev. em DI SANTI E BOULOS, 1999; COX-SINGH et al, 2008).

Figura 1. Ciclo biológico de *Plasmodium* no hospedeiro vertebrado (reprodução assexuada) e no hospedeiro invertebrado (reprodução sexuada).

Fonte: http://mappingignorance.org/2013/01/03/the-flick-of-a-switch-controls-the-fate-of-human-parasiteSParasites_figure2/

1.2 A malária como problema de saúde pública

A malária é considerada um grave problema de saúde pública no mundo. Em 2015 foram notificados 214 milhões de casos de malária no globo. Destes, a maioria (88%) ocorreu na Região Africana da Organização Mundial de Saúde (OMS), seguida da

Região do Sudeste Asiático (10%) e da Região do Mediterrâneo Oriental (2%) (WHO, 2015a).

O número de óbitos por malária no mundo tem mostrado um padrão de diminuição desde o ano 2000. De 839.000 mortes notificadas em 2000 houve uma queda para 438.000 em 2015, representando uma redução de 48%. Destas, 90% aconteceram na Região Africana, 7% na Região do Sudeste Asiático e 2% na Região do Mediterrâneo Oriental (WHO, 2015a).

Igualmente, o número de óbitos em crianças menores de cinco anos por malária tem diminuído no mundo. De 723.000 mortes registradas no ano 2000 houve redução para 306.000 em 2015. A maior parte desta diminuição aconteceu na Região Africana da OMS com 292.000 mortes notificadas em 2015. Assim neste ano, a malária passou a ser a quarta causa de mortalidade (10%) em crianças da África subsaariana (WHO, 2015a).

Atualmente o Brasil reporta 42% de todos os casos de malária notificados na América Latina e no Caribe (OPAS, 2016). A transmissão continua principalmente na Bacia Amazônica, que corresponde a 99,5% do total de casos de malária no país (FERREIRA e CASTRO, 2016). A sazonalidade da doença está relacionada com a precipitação, temperatura e nível da água, fatores que afetam a proliferação de mosquitos nos criadouros (BRASIL, 2016c).

Até agosto de 2016 foram notificados 70.921 casos no Brasil, sendo que 99,9% ocorreram em área endêmica constituída pelos nove estados da Amazônia Legal: Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (BRASIL, 2016a).

Na região extra-amazônica mais de 80% dos casos reportados são importados dos estados endêmicos para malária no país, de outros países amazônicos e dos continentes africano e asiático (BRASIL, 2016c). Aproximadamente 0,05% de todos os casos autóctones desta região originam-se em áreas da Serra do Mar localizadas entre os estados de Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Estes estados situados na região Sudeste e Sul do Brasil encontram-se cobertos pela floresta do bioma Atlântico (PINA-COSTA, 2014). Até agosto de 2016 foram registrados na área 60 casos nesse período (BRASIL, 2016b). Embora existam poucas notificações da doença nesta região, a mesma não pode ser negligenciada, devido a sua letalidade mais elevada do que na região endêmica (BRASIL, 2016c).

1.3 Tratamento antimalárico

O tratamento da malária possui três objetivos: erradicar os estágios assexuados sanguíneos do parasito, responsáveis pela patogenia e manifestações clínicas, eliminar os estágios hepáticos latentes de *P. vivax* e *P. ovale* e interromper a transmissão

vetorial, por meio da erradicação dos gametócitos (BRASIL, 2010). As drogas antimaláricas são classificadas segundo a sua estrutura química em aminoálcoois como o quinino (QN), mefloquina (MFQ) e halofantrina (HLF); 4-aminoquinoleínas como cloroquina (CQ) e amodiaquina (AQ); 8-aminoquinoleínas como a primaquina; lactonas sesquiterpênicas (derivados da artemisinina); naftoquinonas como a atovaquona (ATV) e antibióticos (tetraciclina, doxiciclina e clindamicina) (BRASIL, 2001). Os antimaláricos são classificados como esquizonticidas sanguíneos, esquizonticidas teciduais, hipnozoitocidas, gametocitocidas e esporonticidas (BAIRD, 2009). Os tratamentos de primeira linha utilizados no Brasil nas infecções por *P. falciparum* não complicadas são as combinações de arteméter-lumefantrina (Coartem®) e artesunato-mefloquina (Farmanguinhos). O esquema terapêutico de segunda escolha é a combinação: quinino-doxiciclina (BRASIL, 2010).

1.3.1 Artemisinina e derivados

A artemisinina (ART) é uma lactona sesquiterpênica com ligação de peróxido interna presente nas folhas da planta *Artemisia annua* L. (CHINA COOPERATIVE RESEARCH GROUP, 1982). Foi isolada em 1972, tendo sua estrutura química elucidada em 1979 (KLAYMAN, 1985). Possui atividade antimalárica rápida, poucos efeitos adversos e é ativa

contra parasitos resistentes a muitos dos antimaláricos tradicionais (WITKOWSKI et al, 2010).

Para sua melhor utilização em humanos a ART teve sua estrutura química modificada, obtendo-se derivados com biodisponibilidades orais melhoradas (EASTMAN e FIDOCK, 2009). Os derivados arteméter (ATM), artesunato (AS) e o metabólito ativo dihidroartemisinina (DHA) caracterizam-se por alcançar rapidamente níveis plasmáticos altos, com vidas médias de eliminação entre 1 a 3 horas (WHITE, 2008; GERMAN e AWEEKA, 2008). Além disso, reduzem rapidamente a parasitemia assexuada, são ativos nas diferentes fases de desenvolvimento do parasito e inibem a maturação de gametócitos, reduzindo a transmissão (PRICE et al, 1996). A bioconversão do ATM e do AS produz DHA junto com outros metabólitos (EASTMAN e FIDOCK, 2009).

Os mecanismos pelos quais a ART e seus derivados exercem a sua atividade antimalárica permanecem controversos (GOLENSER et al, 2006). A maioria dos estudos concorda que a atividade resulta da ruptura da ligação de peróxido originado pelo Ferro do grupo heme reduzido no vacúolo digestivo (VD) do parasito (HARTWIG et al, 2009), porém outros estabeleceram que estes compostos podem alquilar o grupo heme (CREEK et al, 2008). A ART ativada também poderia gerar radicais livres que oxidam e alquilam proteínas e lipídeos nas hemácias infectadas (KRUNGKRAI e YUTHAVONG, 1987; ASAWAMAHASAKDA et al, 1994; KANNAN et al, 2005). Os derivados da ART também poderiam ser ativados por clivagem da ligação de peróxido, ocasionada

por centros redox de enxofre-ferro intracelulares encontrados em enzimas de *Plasmodium*. A alquilação destas enzimas poderia resultar na morte do parasito (WU, 2002). Outros estudos focaram-se na *PfATPase6*, localizada no retículo endoplasmático de *P. falciparum*, propondo que sua atividade é suprimida pela ART (ECKSTEIN-LUDWIG et al, 2003).

1.3.2 Terapia combinada com artemisinina (ACT)

Devido a certas propriedades farmacocinéticas da ART e de seus derivados, como a sua curta vida média, falhas no tratamento foram registradas quando em monoterapia (WOODROW e KRISHNA, 2006). A terapia combinada com artemisinina (ACT) baseia-se em associar um derivado da ART com outra droga antimalárica de ação lenta e prolongada, incrementando assim a eficácia do tratamento e reduzindo a possibilidade de desenvolvimento de resistência. Após a concentração plasmática dos derivados da ART cair abaixo dos níveis terapêuticos, a droga associada assegura a continuidade da ação antimalárica. As ACTs beneficiam-se da habilidade dos derivados da ART em reduzir rapidamente a biomassa parasitária, o que resulta em poucos parasitos a serem eliminados pela droga associada. As principais drogas associadas e as ACTs utilizadas atualmente são apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1 - Principais drogas associadas e ACTs utilizadas atualmente.

Drogas	ACTs
Lumefantrina (LMF)	Artemeter-lumefantrina (ATM-LMF)
Mefloquina (MFQ)	Artesunato-mefloquina (AS-MFQ)
Amodiaquina (AQ)	Artesunato-amodiaquina (AS-AQ)
Piperaquina (PQP)	Dihidroartemisinina-piperaquina (DHA-PQP)
Pironaridina (PIR)	Artesunato-pironaridina (AS-PIR)

Fonte: Eastman et al, 2009; Wells et al, 2009.

A combinação ATM-LMF é a mais amplamente utilizada no mundo (MAKANGA et al, 2011). A lumefantrina (LMF) é um antimalárico com estrutura química relacionada aos arilaminoalcóois hidrofóbicos, entre os quais a MFQ, QN e HLF (FITCH, 2004). Foi sintetizada pela primeira vez na década de 1970 e registrada como antimalárico em 1987 (WHO, 1990). Dentre suas propriedades farmacocinéticas destacam-se o grande volume de distribuição e vida média de eliminação de 4 a 5 dias (EZZET et al, 1998). Sugere-se que seu mecanismo de ação é similar aos antimaláricos desta classe (FITCH, 2004).

O Coartem® é um antimalárico formado pela associação de ATM e LMF, conhecidos pelo seu efeito sinérgico contra *P. falciparum*. Esta combinação foi utilizada pela primeira vez na década de 1980 na China e registrada como antimalárico no começo da década de 2000 (NZILA et al, 2012). Destaca-se por sua segurança, eficácia e

qualidade, características que foram avaliadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para considerar esta combinação como a primeira ACT (MAKANGA et al, 2011).

1.4 Resistência aos antimaláricos em *P. falciparum*

Um parasito é considerado resistente quando é capaz de sobreviver e de multiplicar-se apesar da administração e absorção adequadas de um regime quimioterapêutico (BAIRD, 2009). Durante décadas as 4-aminoquinoleínas e os antifolatos foram utilizados no tratamento da malária por *P. falciparum*, mas com o surgimento de cepas resistentes o uso foi descontinuado. Em 2001, a ART e seus derivados foram introduzidos como antimaláricos após recomendação da OMS e as ACTs tornaram-se o tratamento de primeira escolha para malária *falciparum* não complicada na maioria dos países endêmicos (WHITE, 2008), porém já existem evidências da diminuição da eficácia da ART em *P. falciparum* na Tailândia e no Camboja (NOEDL et al, 2009; DONDORP et al, 2009). Este fato é preocupante, pois a resistência a outros antimaláricos como a CQ e a combinação sulfadoxina-pirimetamina (SP) foi inicialmente observada no Sudeste Asiático e depois se disseminou para a África (WOOTTON et al, 2002; ROPER et al, 2004).

1.4.1 Resistência à artemisinina

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene *PfATPase6* foram observados em isolados de *P. falciparum* do Senegal e da Guiana Francesa com sensibilidade reduzida às ARTs (JAMBOU et al, 2005). No entanto, análise de conservação da sequência deste gene em isolados clínicos de 17 países, identificou 33 SNPs, 29 dos quais foram mutações não-sinônimas, implicando em um alto grau de diversidade genética (DAHLSTRÖM et al, 2008). Segundo a OMS, algumas mutações no gene Kelch K13 propeller de *P. falciparum* (*PfK13*) já são consideradas associadas à resistência aos derivados de ART (WHO, 2016), conforme apresentado no Quadro 2.

Quadro 2 - Mutações validadas e candidatas para conferir resistência no gene *PfK13*¹.

Mutação K13	Classificação
E252Q	Não associado
P441L	Candidato
F446I	Candidato
G449A	Candidato
N458Y	Candidato
Y493H	Validado
R539T	Validado
I543T	Validado
P553L	Candidato
R561H	Validado
V568G	Candidato
P574L	Candidato
A578S	Não associado
C580Y	Validado
A675V	Candidato

Fonte: WHO, 2016.

¹ Outras variantes menos frequentes foram reportadas associadas com ensaios *in vitro* ou *in vivo* ou ambos: M476I, C469Y, A481V, S522C, N537I, N537D, G538V, M579I, D584V, H719N.

1.4.1.1 A dormência como mecanismo de resistência à artemisinina

Um fenômeno que requer mais estudos é a dormência em *P. falciparum*. Embora a resistência à ART ainda seja tema de debate (TAYLOR et al, 2009), diminuições no tempo de clareamento dos parasitos já foram relatadas (DONDORP et al, 2009; NOEDL et al, 2009). Kyle e Webster (1996) e Hoshen et al. (2000) propuseram o fenômeno de dormência como mecanismo de tolerância à ART em *P. falciparum*. Segundo este mecanismo, os parasitos são capazes de tolerar a ação da ART ao bloquear a sua maturação temporariamente como ocorre com algumas bactérias (GOMEZ e MC KINNEY, 2004). Após a exposição ao AS ou à DHA, os trofozoítos jovens de *P. falciparum* interrompem rapidamente a sua maturação com posterior recuperação do seu normal desenvolvimento (KYLE e WEBSTER, 1996).

Em 2009, WITKOWSKI e colaboradores comprovaram que alguns parasitos paralisam sua maturação na fase de trofozoíto jovem quando expostos a altas concentrações da ART e retomam seu desenvolvimento após a remoção da mesma. Neste estudo a linhagem F32 de *P. falciparum* foi submetida à pressão com ART por mais de três anos, resultando na linhagem F32-ART tolerante à ART, que pode sobreviver a concentrações 7000 vezes maiores que o IC₅₀ inicial. O fenômeno de dormência também acontece após o tratamento *in vitro* com outros antimaláricos: pirimetamina, ATV e MFQ (NAKAZAWA et al, 1995; NAKAZAWA et al, 2002; THAPAR et al,

2005). Porém, não se reportaram taxas de recrudescência altas após monoterapia, devido à prolongada vida média destas drogas (Codd et al, 2011).

Parasitas tolerantes à ART não têm alteradas as suas IC_{50} . Assim, a medição da IC_{50} no caso da ART não reflete a capacidade do parasito de sobreviver ao tratamento com a mesma. A capacidade da linhagem F32-ART de *P. falciparum* para tolerar a ART via fenômeno de dormência passaria inadvertida no teste de sensibilidade radioisotópico. Como este método determina a taxa de síntese de DNA do plasmódio exposto a uma droga, a fase de dormência retarda o metabolismo e a síntese de DNA. Em ausência de síntese de DNA, a linhagem tolerante F32-ART pareceria tão sensível quanto a linhagem controle F32, ao calcular os IC_{50} (WITKOWSKI et al, 2010). Esses dados coincidem com estudo onde isolados resistentes do Camboja não apresentaram altos níveis de IC_{50} (Dondorp et al, 2009).

Um mecanismo de resistência proposto por Mbengue e colaboradores (2015) sugere que, em *P. falciparum*, os níveis da enzima fosfatidilinositol-3 quinase (*PfPI3K*) são regulados pelo *PfK13*, uma proteína que se liga à enzima *PfPI3K* e media a adição de grupos de ubiquitina (Ub), marcando o *PfPI3K* para ser degradado. A enzima *PfPI3K* é necessária para fosforilar o fosfolípido fosfatidilinositol (PI) para formar fosfatidilinositol 3-fosfato, promovendo a sinalização e sobrevivência celular. Os autores mostraram que a DHA, o metabólito ativo da ART, inibe a atividade da *PfPI3K* nos estágios em trofozoíto jovem. Mutações no *PfK13* impedem sua ligação com a

*Pf*PI3K, levando a um aumento nos níveis desta enzima e auxiliando os parasitos a superar os efeitos da DHA (Figura 2).

Figura 2. Mecanismo de resistência à DHA.

Fonte: Adaptado de BURROWS, 2015.

Paloque e colaboradores (2016) postularam o modelo sintético do metabolismo de quiescência em *Plasmodium* (Figura 3). Neste modelo os parasitos quiescentes de *P. falciparum* evidenciaram bloqueio da via de glicólise levando à suspensão da produção de ATP e de fosfoenolpiruvato. O metabolismo basal nos parasitos quiescentes é mantido pelo metabolismo de FASII que acontece no apicoplasto associado à produção de ATP na mitocôndria.

Figura 3. Modelo sintético do metabolismo de quiescência de *Plasmodium*.

Fonte: Adaptado de PALOQUE et al, 2016.

1.4.2 Resposta de *P. falciparum* à lumefantrina

Com relação à LMF, estudos associaram o risco de falha clínica a concentrações plasmáticas inferiores a 280 ng/mL (EZZET et al, 2000). A utilização do Coartem® tem sido relacionada com rápida seleção de parasitos que são tolerantes à LMF. O fenótipo *in vivo* se traduz, *in vitro*, em susceptibilidade reduzida ao fármaco (NZILA et al, 2012). Estudos mostram que parasitos tolerantes à LMF possuem os genótipos selvagens

*Pfmdr1*_86N e *Pfcrt*_76K, ambos associados à sensibilidade à CQ (MÅRTENSSON et al, 2005, SISOWATH et al, 2005). SNPs e aumento no número de cópias do gene *Pfmdr1* foram reportados após tratamento com Coartem® (SIDHU et al, 2006; PRICE et al, 2006). Em estudo realizado em Zanzibar não foi observada amplificação gênica em *Pfmdr1* (SISOWATH et al, 2007). Estudos mostraram que mutantes em *Pfcrt*, que conferem resistência à CQ, podem melhorar a susceptibilidade à LMF e à ART (SISOWATH et al, 2009).

1.4.3 Resposta de *P. falciparum* à mefloquina

A resistência à mefloquina foi documentada inicialmente na região de fronteira entre o Cambodia e a Tailândia (BOUDREAU et al, 1982). Relatos posteriores foram registados, com a disseminação da resistência para o Sudeste Asiático, África, Índia e Brasil (MUCKENHAUPT, 1995; SHARMA, 1996; BOULOS et al, 1986). A associação entre o incremento no número de cópias do gene *Pfmdr1* e o risco de falha ao tratamento com AS-MFQ foi observada em um estudo clínico na Tailândia (PRICE et al, 2004), fato também observado com ART-MFQ (SIDHU et al, 2006).

1.5 Justificativa

A lenta depuração dos parasitos após tratamento com ART emergente no Sudeste Asiático poderia indicar a possibilidade de sua disseminação global (DONDORP et

al, 2009; NOEDL et al, 2008). Portanto, a busca de métodos alternativos para o monitoramento da sensibilidade à ART é uma necessidade urgente. A resistência do *P. falciparum* aos antimaláricos permanece como um desafio aos programas de controle. A falha terapêutica a tratamentos utilizando a CQ, os antifolatos, o QN associado a tetraciclina e a MFQ foi amplamente descrita (DI SANTI et al, 1988; PETERSON et al, 1991; PRICE et al, 2004; VALDERRAMOS e FIDOCK, 2006; WITKOWSKI et al, 2009). Atualmente a adoção das ACTs como tratamento de primeira linha para *P. falciparum* não grave, torna imprescindível estudos de monitoramento que sejam sentinelas para detectar diminuição da sensibilidade deste parasito aos derivados de ART e dos fármacos utilizados associadamente, como a MFQ e LMF. Este estudo propôs a determinação *ex vivo* e *in vitro* do perfil fenotípico da resposta do *P. falciparum* ao AS e MFQ, ACT utilizada na região extra-amazônica brasileira, além de propor a avaliação da resposta à LMF, utilizada em associação com ATM em diferentes áreas endêmicas para malária. A avaliação do fenômeno de dormência em *P. falciparum* constituiu-se de estudo inédito em laboratórios brasileiros, fato importante visto que o país adota também as ACTs como esquema de primeira linha para tratamento da malária causada por *P. falciparum*.

2 OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o comportamento de *P. falciparum* frente aos esquemas terapêuticos de primeira linha para malária, mediante a avaliação da sensibilidade *ex-vivo* e *in vitro* e do fenômeno de dormência das terapias combinadas com ART.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a)** Avaliar a sensibilidade *ex-vivo* e *in vitro* de isolados de *P. falciparum* frente à DHA, AS, LMF e MFQ e determinar as concentrações inibitórias (IC₅₀);
- b)** Efetuar o ensaio de dormência *in vitro* em isolados de *P. falciparum* frente à DHA, AS, LMF e MFQ e avaliar se a tolerância a estas drogas pode estar influenciada pelo fenômeno de dormência;
- c)** Determinar a duração do fenômeno de dormência *in vitro* após tratamento com DHA, AS, LMF e MFQ.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

A área de estudo localizou-se na região extra-amazônica do Brasil, especificamente na cidade de São Paulo (Estado de São Paulo). Este estado encontra-se localizado na região sudeste do país e faz fronteira com os estados de Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná e Rio de Janeiro. O município de São Paulo está situado na zona leste do estado. Caracteriza-se por possuir um clima subtropical úmido, com inverno ameno e subseco e verão moderadamente quente e chuvoso. A maior precipitação pluvial registra-se entre os meses de outubro e abril. A cidade não é uma região de transmissão de malária por *P. falciparum*, no entanto casos da doença importados de outras regiões do país ou do exterior, principalmente do continente Africano, são registrados. Esta área de estudo foi escolhida devido a sua importância epidemiológica, por ser via de ingresso de isolados de *P. falciparum* ao Brasil.

3.2 População

A população do estudo fenotípico foi constituída por 25 indivíduos provenientes do Continente Africano e do Caribe: Angola (n=7), Camarões (n=1), Continente Africano com país indeterminado (n=1), Gana (n=1), Guiné Bissau (n=1), Moçambique (n=2),

Nigéria (n=4), República Democrática do Congo (n=3), Sudão (n=1), República Dominicana (n=3) e Indeterminado (n=1). Foram envolvidos na pesquisa, sujeitos de ambos os sexos, com idade igual ou superior a 15 anos, que foram diagnosticados com malária por *P. falciparum*. Para serem utilizadas neste estudo, as 25 amostras sanguíneas dos indivíduos cumpriram dois requisitos: apresentar unicamente parasitos da espécie *P. falciparum* ao exame microscópico da gota espessa e serem provenientes de indivíduos sem tratamento pregresso com antimalárico ou antibiótico nos últimos 30 dias. Depois da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelo paciente ou seu representante legal, foram coletados 5 mL de sangue em tubo a vácuo contendo EDTA. No Quadro 3 é apresentada a origem dos isolados clínicos de *P. falciparum* coletados entre 2014 e 2016.

Quadro 3 - Origem dos isolados clínicos de *P. falciparum* coletados entre 2014 e 2016.

Isolado	Data de diagnóstico	Local de infecção	Local de coleta
S-02/14	19/08/14	Angola	São Paulo
FS 05/15	29/05/15	Gana	São Paulo
S-01/15	03/06/15	Angola	São Paulo
FS 08/15	20/07/15	República Dominicana	São Paulo
FS 09/15	21/07/15	Guiné Bissau	São Paulo
FS 15/15	31/08/15	Nigéria	São Paulo
FS 16/15	14/09/15	Nigéria	São Paulo
FS 17/15	14/09/15	Nigéria	São Paulo
FS 18/15	28/09/15	Sudão	São Paulo
FS 21/15	14/10/15	Moçambique	São Paulo
FS 08/16	19/02/16	Moçambique	São Paulo
Am 09/16	16/03/16	República Democrática do Congo	São Paulo
FS 12/16	22/03/16	Angola	São Paulo
Am 11/16	23/03/16	Indeterminado	São Paulo
Am 12/16	04/04/16	Angola	São Paulo
FS 21/16	15/04/16	Angola	São Paulo
FS 24/16	03/05/16	Continente Africano	São Paulo
Am 16/16	04/06/16	Camarões	São Paulo
Am 21/16	27/06/16	Nigéria	São Paulo
FS 27/16	28/06/16	República Dominicana	São Paulo
FS 28/16	28/06/16	República Dominicana	São Paulo
FS 29/16	29/06/16	República Democrática do Congo	São Paulo
Am 25/16	04/07/16	Angola	São Paulo
Am 17/16	05/07/16	República Democrática do Congo	São Paulo
FS 31/16	19/07/16	Angola	São Paulo

3.2.1 Aspectos éticos da pesquisa

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq do HC/FMUSP (Reg. 11012) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emilio Ribas (IIER/1.173.283). Depois da exposição dos objetivos da pesquisa de forma clara e em termos simples e com o consentimento livre e esclarecido por escrito dos doadores ou responsáveis, a coleta das amostras sanguíneas foi iniciada. Em todos os casos, o anonimato dos doadores foi garantido e os aspectos éticos de conservação e utilização de material biológico estocado foram preservados.

3.2.2 Definição de caso

Caso suspeito – toda pessoa residente ou que tenha se deslocado para área onde haja possibilidade de transmissão de malária, no período de 8 a 30 dias anterior à data dos primeiros sintomas, e que apresente febre acompanhada ou não dos seguintes sintomas: cefaleia, calafrios, sudorese, cansaço, mialgia; ou toda pessoa testada para malária durante investigação epidemiológica.

Caso confirmado – toda pessoa cuja presença de parasito ou algum de seus componentes, tenha sido identificada no sangue por exame laboratorial.

Caso descartado – caso suspeito com diagnóstico laboratorial negativo para malária.

3.2.3 Processamento das amostras sanguíneas

O diagnóstico e a quantificação da parasitemia por microscopia foram realizados em lâminas de gotas espessas corados com Giemsa (Merck, Darmstadt, Alemanha). As 25 amostras colhidas entre 2014 e 2016 foram centrifugadas a 1.200 rpm por 5 minutos, em temperatura ambiente, antes da caracterização fenotípica. Após centrifugação, o soro humano foi separado e estocado na Soroteca do Núcleo de Estudos em Malária da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN). Também, foram removidos os leucócitos das amostras sanguíneas. Somente uma alíquota do concentrado de hemácias parasitadas foi utilizada nos ensaios de sensibilidade *ex-vivo* e no fenômeno de dormência. O volume restante de eritrócitos infectados foi armazenado na Cepateca da instituição acima mencionada. A coleção de amostras de *P. falciparum* do Núcleo de Estudos em Malária está vinculada ao Biorrepositório do IMTSP/USP.

3.3 Preparo das microplacas com DHA, AS, LMF e MFQ

O doseamento das microplacas de 96 *wells* para testes de sensibilidade (TPP, Trasadingen, Suíça) foi realizado utilizando DHA, AS, LMF e MFQ. Foram preparadas

microplacas a partir de antimaláricos liofilizados (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), sendo o procedimento de doseamento de cada droga mencionado a seguir:

Microplacas de 96 *wells* de fundo plano foram doseadas, em duplicata, com 200 µL de sete diluições seriadas razão 4 (1.000 nM, 250 nM, 62,5 nM, 15,6 nM, 3,9 nM, 0,9 nM e 0,2 nM) de DHA; 200 µL de sete diluições seriadas razão 3 (100 nM, 33,3 nM, 11,11 nM, 3,7 nM, 1,2 nM, 0,4 nM e 0,1 nM) de AS; 200 µL de sete diluições seriadas razão 3 (200 nM, 66,6 nM, 22,2 nM, 7,4 nM, 2,4 nM, 0,8 nM e 0,2 nM) de LMF base e 200 µL de sete diluições seriadas razão 4 (1.000 nM, 250 nM, 62,5 nM, 15,6 nM, 3,9 nM, 0,9 nM e 0,2 nM) de MFQ. Em seguida foram secas ao ar, em condições de esterilidade no fluxo laminar, por até 96 horas. Quando secas, as microplacas foram armazenadas a 4° C até sua utilização.

As concentrações de DHA, AS, LMF e MFQ que foram adotadas no início do estudo continuaram sendo utilizadas em 2015 nos ensaios *ex-vivo* e *in vitro* de sensibilidade de *P. falciparum* às ACTs. Posteriormente, novas concentrações de DHA e LMF foram ensaiadas em isolados de *P. falciparum*, de modo a adequar as concentrações para cálculo de IC₅₀: sete diluições seriadas razão 2,5 (1.000 nM, 400 nM, 160 nM, 64 nM, 25,6 nM, 10,2 nM e 4 nM) de DHA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); sete diluições seriadas razão 2 (200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,2 nM e 3,1 nM) de LMF base.

Controle de qualidade – Para o controle de qualidade dos ensaios de sensibilidade *ex-vivo*, *in vitro* e do ensaio de dormência de *P. falciparum* às ACTs foi utilizado o isolado de referência NF54 de *P. falciparum* com conhecida sensibilidade à CQ. Os resultados de IC₅₀ deste isolado frente à DHA, ATM, AS, LMF e MFQ foram utilizados como referência e comparados com os resultados de IC₅₀ de isolados clínicos de *P. falciparum*.

3.4 Criopreservação

Para a criopreservação dos isolados de *P. falciparum*, uma alíquota do *pellet* de hemácias infectadas foi misturada suavemente com Glycerolyte estéril pH 7,2 (Lake Zurich, IL, EUA) na proporção 1,7 mL de Glycerolyte para 1 mL de *pellet* de hemácias. Este procedimento foi executado adicionando gota a gota a solução de Glycerolyte ao *pellet* de hemácias parasitadas, agitando gentilmente a mistura. A seguir as alíquotas foram transferidas para Nitrogênio líquido.

3.5 Ensaios de sensibilidade

3.5.1 Ensaios fenotípicos com isolados criopreservados de *P. falciparum*

Descongelamento – As amostras sanguíneas foram aquecidas a 37°C até o descongelamento. A seguir foi acrescentado 1/5 do volume de sangue de NaCl 12% gota a gota, deixando em repouso por 1 minuto, seguido de NaCl 1,6 % em volume de 10 vezes o volume total, gota a gota, misturando suavemente a suspensão. Esta foi centrifugada a 1.400 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Após a centrifugação, um volume de 10 vezes de meio RPMI 1640 suplementado com 30 mM HEPES, hipoxantina 50 µg/mL, 10% AlbuMAX TM II ou AlbuMAX TM I, gentamicina 40 µg/mL e bicarbonato de sódio a 5% (RIECKMANN et al, 1978; DI SANTI et al, 1988) foram adicionados, gota a gota, aos eritrócitos infectados homogeneizando gentilmente. A suspensão foi centrifugada como descrito acima, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de hemácias parasitadas obtido foi adaptado às condições de cultura *in vitro* como por mais de duas semanas para finalmente ser utilizado nos ensaios de sensibilidade às ACTs.

3.5.1.1 Ensaios de sensibilidade *in vitro* do isolado NF54 de *P. falciparum*

A sensibilidade do isolado NF54 de *P. falciparum* à DHA e LMF foi avaliada em experimentos diferentes, utilizando-se o protocolo de Rieckmann. Em todos os casos, parasitos sincronizados no estágio de trofozoíto jovem com parasitemias iniciais de 0,44% - 0,5% foram ressuspensos em meio de cultura RPMI 1640 suplementado como descrito, com hematócrito de 5%. A seguir 200µL dessa suspensão foram adicionados aos *wells* das microplacas doseadas com DHA, LMF, AS, MFQ, ATM e CQ. *Wells* sem droga foram utilizados como controles de crescimento do parasito nos experimentos. As culturas foram incubadas a 37°C em ambiente com 90% de N₂, 5% de CO₂ e 5% de O₂ por 72 horas. Após a incubação foram realizadas gotas espessas às 24, 48 e 72 horas, sem reposição das drogas nas horas 24 e 48. Na leitura por microscopia, a avaliação da concentração inibitória 50 (IC₅₀) foi realizada mediante contagem do número de esquizontes formados com mais de três núcleos em 200 parasitos. Os valores encontrados nos *wells* com as drogas foram comparados aos controles sem droga para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento na presença das drogas. Os valores obtidos foram empregados no cálculo das IC₅₀ utilizando o programa GraphPad.Prism v5.01.

3.5.1.2 Ensaio de sensibilidade *in vitro* dos isolados Am 16/16, Am 17/16, Am 21/16 e FS 27/16 de *P. falciparum*

Ensaio de sensibilidade *in vitro* foram realizados com os isolados Am 16/16, Am 17/16, Am 21/16 e FS 27/16 de *P. falciparum*. Com relação ao isolado Am 16/16 além do teste inicial *ex-vivo* foi desenvolvido ensaio *in vitro* visando comparar o perfil fenotípico de resposta de IC₅₀. Ensaio *in vitro* foram realizados com os isolados Am 17/16 e Am 21/16 depois de estes terem atingido a parasitemia e viabilidade adequada, parâmetros que não foram observados após a coleta do sangue infectado devido a demora entre a coleta e o início dos testes *ex-vivo*. Como o desenvolvimento dos trofozoítos jovens para a fase de esquizonte não foi atingido em experimento *ex-vivo* do isolado FS 27/16 de *P. falciparum* foi efetuado ensaio *in vitro*. Para todos os casos parasitos sincronizados no estágio de trofozoíto jovem com parasitemias iniciais de 0,5%, 0,2%, 1% e 0,2% respectivamente, foram ressuspensos em meio de cultura RPMI 1640 suplementado como descrito, com hematócrito de 5%. A seguir 200µL dessa suspensão foram adicionados aos *wells* das microplacas doseadas com DHA, LMF, AS e MFQ. *Wells* sem droga foram utilizados como controles de crescimento do parasito nos experimentos. Os passos de incubação, tempo para a realização de gotas espessas, sem reposição das drogas nas horas 24 e 48 e avaliação da concentração inibitória 50 (IC₅₀) foram realizados como mencionado no item anterior.

3.5.2 Ensaios fenotípicos com isolados clínicos de *P. falciparum*

3.5.2.1 Ensaios de sensibilidade *ex-vivo* de isolados clínicos de *P. falciparum*

Entre 2014 e 2016, ensaios de sensibilidade *ex-vivo* de isolados de campo de *P. falciparum* frente à DHA, LMF, AS e MFQ foram realizados no laboratório, empregando-se o protocolo de Rieckmann. Para todos os casos, parasitos sincronizados no estágio de trofozoito jovem com parasitemias iniciais entre 720/240 e 1% (Quadro 4), foram resuspendidos em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 30 mM HEPES, hipoxantina 50 µg/mL, 10% AlbuMAX™ II ou AlbuMAX™ I, gentamicina 40 µg/mL e bicarbonato de sódio a 5% (RIECKMANN et al, 1978; DI SANTI et al, 1988) em hematócrito de 5%. A seguir 200µL dessas suspensões foram adicionados aos *wells* das microplacas doseadas com DHA, LMF, AS e MFQ. *Wells* sem droga foram utilizados como controles de crescimento do parasito. Os passos de incubação, tempo para a realização de gotas espessas, sem reposição das drogas nas horas 24 e 48 e avaliação da concentração inibitória 50 (IC₅₀) foram realizados como mencionado acima, em todas as amostras, com exceção do isolado S-01/15 de *P. falciparum* onde foi realizada a reposição de DHA e LMF nas horas 24 e 48.

Diferentemente das outras amostras, o isolado S-01/15 recebeu DHA e LMF, às 24 e 48 horas de incubação no teste de sensibilidade *ex-vivo*. Para tal objetivo, em ambos os períodos de incubação, o meio RPMI 1640 de cada um dos sete *wells* das

microplacas foi removido e 200 µL de meio RPMI 1640, suplementado como descrito, foram adicionados às hemácias infectadas de cada um dos sete *wells* de ambas as microplacas. As suspensões foram homogeneizadas gentilmente e em seguida transferidas para *wells* das microplacas de DHA e LMF que continham as sete concentrações seriadas correspondentes de ambas as drogas. Estas microculturas foram misturadas suavemente para a ressuspensão dos fármacos. Os passos de incubação, tempo para a realização de gotas espessas e avaliação da concentração inibitória 50 (IC₅₀) foram efetuados como citado no item 3.5.1.1.

No Quadro 4 são apresentadas a parasitemia inicial e as drogas testadas em isolados clínicos de *P. falciparum* no ensaio de sensibilidade *ex-vivo* às ACTs.

Quadro 4 - Parasitemia inicial e drogas testadas em isolados clínicos de *P. falciparum* nos ensaios de sensibilidade *ex-vivo* e *in vitro* às ACTs.

Isolado	Parasitemia inicial	Drogas testadas
S-02/14	0,5%	DHA, LMF
FS 05/15	0,5%	DHA e LMF
S-01/15	0,5%	DHA e LMF
FS 08/15	0,5%	DHA, LMF, AS e MFQ
FS 09/15	720/mm ³	AS e MFQ
FS 15/15	0,5%	DHA, LMF, AS e MFQ
FS 16/15	1%	DHA, LMF, AS e MFQ
FS 17/15	3920/mm ³	DHA, LMF, AS e MFQ
FS 18/15	0,08%	DHA, LMF, AS e MFQ
FS 21/15	1%	DHA, LMF, AS e MFQ
FS 08/16	0,5%	DHA, LMF, AS e MFQ
Am 09/16	0,6%	DHA, LMF, AS e MFQ
FS 12/16	0,5%	DHA, LMF, AS e MFQ
Am 11/16	0,4%	DHA, LMF, AS e MFQ
Am 12/16	0,3%	DHA, LMF
FS 21/16	0,4%	DHA, LMF, AS e MFQ
FS 24/16	0,5%	DHA, LMF, AS e MFQ
Am 16/16	0,5%	DHA, LMF, AS e MFQ
Am 21/16	1%	DHA, LMF, AS e MFQ
FS 27/16	0,2%	DHA, LMF, AS e MFQ
FS 28/16	0,1%	DHA, LMF, AS e MFQ
FS 29/16	0,7%	DHA, LMF, AS e MFQ
Am 25/16	0,2%	DHA, LMF, AS e MFQ
Am 17/16	0,2%	DHA, LMF, AS e MFQ
FS 31/16	0,5%	DHA, LMF

3.6 Ensaio de dormência

3.6.1 Monitoramento da recrudescência *in vitro* com isolado NF54 de *P. falciparum*

Um primeiro ensaio de recrudescência *in vitro* foi realizado com o isolado NF54 de *P. falciparum*. A parasitemia inicial foi de 0,44% e hematócrito de 5%, frente a sete concentrações de DHA (1.000 nM, 250 nM, 62,5 nM, 15,6 nM, 3,9 nM, 0,9 nM e 0,2 nM) e de LMF (200 nM, 66,6 nM, 22,2 nM, 7,4 nM, 2,4 nM, 0,8 nM e 0,2 nM) que foram adicionadas apenas na implantação do teste, sem reposição de drogas nas horas 24 e 48. A duração do ensaio foi de 72 horas (2 ciclos esquizogônicos), com troca de meio de cultura a cada 24 horas. Após o término do ensaio de sensibilidade, o comportamento do parasito foi acompanhado por 15 dias para a DHA e por 17 dias para a LMF. Para tal objetivo, hemácias parasitadas dos *wells* com concentrações de DHA de 1000 nM, 250 nM e 62,5 nM e de LMF de 200 nM e 66,6 nM, foram transferidas para uma nova microplaca de 96 *wells* sem as drogas acima mencionadas. Estas microculturas foram selecionadas por não apresentarem esquizontes ao exame microscópico das gotas espessas, às 72 horas. Controles de crescimento do parasito também foram transferidos à nova microplaca. Para monitoramento do fenômeno de dormência, diariamente o meio de cultura foi trocado, com reposição de 200 µL de meio de cultura RPMI 1640 suplementado como descrito, sem reposição das drogas. As microculturas foram incubadas a 37°C em ambiente com 90% de N₂, 5% de CO₂ e 5% de O₂ e foram

monitoradas por microscopia e diluídas cada dois dias para evitar crescimento excessivo que pudesse levar à morte do parasito. Procurou-se encontrar esquizontes formados com três núcleos ou mais nas concentrações selecionadas de ambas as drogas. O experimento de dormência foi finalizado após observar esquizontes nos *wells* que foram expostos às maiores concentrações da DHA (1000 nM) e LMF (200 nM) durante o ensaio de sensibilidade. O protocolo baseou-se no descrito por TEUSCHER e colaboradores (2010), com modificações.

3.6.2 Monitoramento da recrudescente *in vitro* com isolados clínicos de *P. falciparum*

3.6.2.1 Monitoramento da recrudescente *in vitro* com o isolado S-01/15 de *P. falciparum*

Após execução do teste de recrudescente *in vitro* com o isolado de referência NF54 de *P. falciparum*, decidiu-se realizar este mesmo ensaio com o isolado clínico S-01/15 de *P. falciparum* para determinar se este igualmente apresentava recrudescente às ACTs. A parasitemia no início do teste de sensibilidade foi de 0,5% com hematócrito de 5%, frente a sete concentrações de DHA (1.000 nM, 250 nM, 62,5 nM, 15,6 nM, 3,9 nM, 0,9 nM e 0,2 nM) e de LMF (200 nM, 66,6 nM, 22,2 nM, 7,4 nM, 2,4 nM, 0,8 nM e 0,2 nM) que foram adicionadas na implantação do teste e às 24 e 48 horas da

incubação (item 3.5.2.1). A duração do ensaio foi de 72 horas, com troca de meio de cultura a cada 24 horas. Após o término do ensaio de sensibilidade, o comportamento do parasito foi acompanhado por 41 dias em ambas as drogas. Para tal objetivo, hemácias parasitadas dos *wells* com concentrações de DHA de 1.000 nM, 250 nM e 62,5 nM e de LMF de 200 nM, foram transferidas para uma nova microplaca de 96 *wells* sem as drogas acima mencionadas. Estas microculturas foram selecionadas por não apresentarem esquizontes ao exame microscópico das gotas espessas, às 72 horas. Controles de crescimento do parasito também foram transferidos à nova microplaca. Para monitoramento do fenômeno de dormência, a troca de meio, incubação, visualização microscópica, diluição e determinação da recrudesência foram efetuadas como mencionado no item anterior. Este experimento finalizou aos 41 dias de incubação.

3.6.2.2 Monitoramento da recrudesência *in vitro* com o isolado FS 08/15 de *P. falciparum*

Um ensaio de recrudesência *in vitro* com o isolado FS 08/15 de *P. falciparum* foi efetuado empregando parasitemia inicial de 0,5% e hematócrito de 5%, frente a sete concentrações de DHA (1.000 nM, 250 nM, 62,5 nM, 15,6 nM, 3,9 nM, 0,9 nM e 0,2 nM), de LMF (200 nM, 66,6 nM, 22,2 nM, 7,4 nM, 2,4 nM, 0,8 nM e 0,2 nM), de AS (100 nM, 33,3 nM, 11,11 nM, 3,7 nM, 1,2 nM, 0,4 nM e 0,1 nM) e de MFQ (1.000 nM,

250 nM, 62,5 nM, 15,6 nM, 3,9 nM, 0,9 nM e 0,2 nM) que foram adicionadas somente na implantação do teste, sem reposição de drogas às 24 e 48 horas da incubação. A duração do ensaio foi de 72 horas, com troca de meio de cultura a cada 24 horas. Após o término do ensaio de sensibilidade, o comportamento do parasito foi acompanhado por 41 dias nas quatro drogas. Para tal objetivo, hemácias parasitadas dos *wells* com concentrações de DHA de 1.000 nM, LMF de 200 nM, AS de 100 nM e MFQ de 1.000 nM foram transferidas para uma nova microplaca de 96 *wells* sem as drogas. Estas microculturas foram selecionadas por não apresentarem esquizontes ao exame microscópico das gotas espessas, às 72 horas. Controles de crescimento do parasito também foram transferidos à nova microplaca. Para monitoramento do fenômeno de dormência, a troca de meio, incubação, visualização microscópica, diluição e determinação da recrudesência foram efetuadas como mencionado no item 3.6.1. O experimento finalizou aos 41 dias de incubação.

3.7 Citometria de fluxo

3.7.1 Preparo das soluções de Rodamina 123, DAPI e JC-1 para marcação de parasitos

Foram selecionados corantes fluorescentes que marcam mitocôndrias de parasitos viáveis, isto é, mitocôndrias polarizadas: Rodamina 123 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e JC-1 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, EUA) e corantes que marcam DNA, preferencialmente dupla fita: DAPI (Sigma, St. Louis, MO, EUA). A Rodamina 123 liofilizada foi ressuspensa em etanol de modo a obter-se uma solução estoque 1mg/mL e estocada a -20° C. Foi preparada uma solução intermediária (100 µg/mL) que foi estocada a -20° C. Esta solução foi utilizada para o preparo da solução de trabalho (1 µg/mL) nos experimentos de marcação. O mesmo procedimento foi utilizado para preparo da solução de trabalho de DAPI, nas mesmas concentrações, com uso de água para preparo da solução estoque. O corante JC-1 liofilizado foi ressuspensa em DMSO (125µL) estocado a -20° C. No momento do uso o *Assay Buffer* 10x (formulado para uso como tampão da reação e para lavagem das células) foi incubado a 37° C e diluído para 1x, para preparo da solução de trabalho (diluição de 100x).

3.7.2 Marcação de *P. falciparum* com Rodamina 123, DAPI e JC-1

Foi realizado experimento com o isolado NF54 de *P. falciparum*, com o objetivo de avaliar a melhor opção para a marcação dos parasitos. Foi realizado esfregaço sanguíneo da cultura *in vitro* e a parasitemia foi calculada em percentual de hemácias infectadas. A parasitemia foi diluída para 1% com hemácias não infectadas. Foram preparados 6 tubos:

- 1 com Rodamina 123
- 1 com DAPI
- 1 com Rodamina 123 + DAPI
- 1 com JC-1
- 1 com hemácias não infectadas (controle para calibração)
- 1 com hemácias infectadas (controle para calibração)

Marcação com Rodamina 123: 16µL de concentrado de hemácias infectadas com parasitemia de 1% foram marcados com 300µL de Rodamina 123 (1µg/mL) obtendo hematócrito de 5%. A seguir, a suspensão foi incubada a 37°C por 5 minutos sem mistura de gases. Após este período de incubação foi centrifugada a 1.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. As hemácias infectadas foram lavadas com meio RPMI 1640 incompleto, homogeneizadas, centrifugadas a 1.000 rpm por 5 minutos e o

sobrenadante descartado. Em seguida, 300µL de meio RPMI 1640 suplementado como descrito foram adicionados à suspensão, a mesma foi homogeneizada e incubada em ambiente com 90% de N₂, 5% de CO₂ e 5% de O₂ a 37° C por 30 minutos. A amostra foi centrifugada a 1.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Por último, as hemácias parasitadas marcadas foram ressuspensas com 300µL de tampão Isoton e analisadas no citômetro de fluxo (BD LSR Fortessa, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, EUA).

Marcação com DAPI: 16µL de hemácias infectadas com parasitemia de 1% foram marcados com 300µL de DAPI (1µg/mL) obtendo hematócrito de 5%. A seguir, a suspensão foi incubada a 37° C por 20 minutos sem mistura de gases e após este período de incubação foi analisada no citômetro de fluxo.

Marcação com a combinação Rodamina 123/DAPI: o procedimento de marcação com Rodamina 123 foi realizado como citado acima. Após estes passos, as hemácias parasitadas foram centrifugadas a 1.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as mesmas foram marcadas com 300µL de DAPI (1µg/mL). A seguir, foram homogeneizadas e incubadas a 37° C por 20 minutos sem mistura de gases. Após este período de incubação a amostra foi analisada no citômetro de fluxo.

Marcação com JC-1: a solução de trabalho foi homogeneizada em agitador e 1 µL de sangue infectado com parasitemia a 1% foi adicionado a 500 µL da solução de trabalho para obter-se hematócrito de 5%. Após incubação a 37° C por 10-15 minutos em estufa de CO₂ foram adicionados 2 mL de *Assay Buffer* 1x e a suspensão foi homogeneizada gentilmente. Após centrifugação a 1.500 rpm por 5 minutos o sobrenadante foi removido cuidadosamente. Foi adicionado 1 mL de *Assay Buffer* 1x e a suspensão foi homogeneizada gentilmente. Após centrifugação a 1.500 rpm por 5 minutos o sobrenadante foi removido cuidadosamente. Foram adicionados 0,5 mL de *Assay Buffer* 1x e suspensão foi homogeneizada gentilmente para análise em citômetro. Como controle do experimento, 16µL de hemácias não parasitadas tipo O⁺ foram ressuspensas em 300µL de tampão Isoton, obtendo hematócrito de 5%. As mesmas foram homogeneizadas, transferidas para tubos de citometria de 5 mL Falcon BD (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, EUA) e analisadas no citômetro de fluxo. Este mesmo procedimento foi efetuado para preparar hemácias parasitadas.

O protocolo utilizado neste estudo foi baseado no descrito por WITKOWSKI e colaboradores (2010).

3.7.3 Determinação dos estágios de *P. falciparum*:

Com a finalidade de determinar a localização das fases de desenvolvimento sanguíneo do isolado NF54 de *P. falciparum* nos gráficos *dot plots* de citometria de

fluxo, foi realizado um experimento de marcação dos trofozoítos jovens e trofozoítos maduros com os corantes Rodamina 123 e DAPI. Como apresentado no Quadro 5, sete amostras foram utilizadas neste ensaio. Três amostras contendo trofozoítos jovens foram marcadas com Rodamina 123 e DAPI: uma amostra foi marcada unicamente com Rodamina 123; uma amostra foi marcada somente com DAPI e uma amostra foi marcada com a combinação Rodamina 123/DAPI. Duas amostras contendo trofozoítos maduros também foram marcadas com Rodamina 123/DAPI: uma amostra de trofozoítos maduros e uma amostra contendo a mistura de trofozoítos jovens e trofozoítos maduros. Como controles do experimento foram utilizadas duas amostras: uma amostra de hemácias não parasitadas tipo O⁺ com glóbulos brancos e uma amostra de hemácias não parasitadas tipo O⁺ sem glóbulos brancos, ambas com hematócrito de 5%, conforme descrito. AS marcações com Rodamina 123, DAPI e Rodamina 123/DAPI foram realizadas conforme descrito anteriormente.

Quadro 5 - Ensaio de citometria de fluxo para a localização das fases de desenvolvimento do isolado NF54 de *P. falciparum* nos gráficos *dot plots*.

	Amostra	Marcação			
		Rodamina 123	DAPI	Rodamina 123/DAPI	Sem marcação
Controles	Hemácias não parasitadas com glóbulos brancos
	Hemácias não parasitadas sem glóbulos brancos
Fase sanguínea	Trofozoítos jovens
	Trofozoítos maduros
	Trofozoítos jovens + trofozoítos maduros

3.7.4 Avaliação da viabilidade e do fenômeno de dormência do isolado NF54 de *P. falciparum* por citometria de fluxo

Com o objetivo de avaliar a viabilidade e o fenômeno de dormência do isolado NF54 de *P. falciparum* após pressão de sete concentrações da DHA (1.000 nM, 250 nM, 62,5 nM, 15,6 nM, 3,9 nM, 0,9 nM e 0,2 nM) e sete concentrações da LMF (200 nM, 66,6 nM, 22,2 nM, 7,4 nM, 2,4 nM, 0,8 nM e 0,2 nM) por citometria de fluxo, foi realizada a marcação das mitocôndrias e dos núcleos do parasito utilizando os corantes Rodamina 123 e DAPI. Após a finalização do ensaio de sensibilidade à DHA e LMF (parasitemia inicial de 0,5% e hematócrito final de 5%) às 72 horas, o meio RPMI 1640 de cada *well* das microplacas de DHA e LMF foi removido e 20 µL de hemácias

parasitadas foram transferidos para microtubos. A seguir, 400 µL de Rodamina 123 (1 µg/mL) foram adicionados a cada 20 µL de hemácias infectadas, obtendo hematócrito de 5%. Os tubos foram agitados e incubados a 37° C, sem mistura de gases, durante 5 minutos. Após esta primeira incubação, a suspensão foi centrifugada a 1.500 rpm durante 1 minuto e meio e o sobrenadante descartado. As hemácias infectadas foram lavadas com 400 µL de meio RPMI 1640 incompleto, agitadas, centrifugadas a 1.500 rpm durante 1 minuto e meio e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, 400 µL de meio de cultura RPMI 1640 suplementado como descrito, foram adicionados em cada tubo, agitados e incubados em ambiente com 90% de N₂, 5% de CO₂ e 5% de O₂ a 37° C por 30 minutos. Os tubos foram centrifugados a 1.500 rpm por 1 minuto e meio, o sobrenadante foi descartado e 400 µL de DAPI (1 µg/mL) foram adicionados em cada tubo. A suspensão foi agitada e incubada a 37° C, sem mistura de gases durante 20 minutos. Finalmente, as hemácias parasitadas marcadas com Rodamina 123/DAPI foram homogeneizadas e transferidas para tubos de citometria. Como controles do ensaio de citometria de fluxo foram utilizados três amostras: a) um tubo contendo 20 µL de hemácias não parasitadas tipo O⁺, livre de glóbulos brancos, sem pressão de drogas e não marcadas com Rodamina 123/DAPI suspendidos em 400 µL de tampão Isoton; b) um tubo contendo hemácias parasitadas que foram privadas de nutrientes (meio RPMI 1640 suplementado com 10% AlbuMAXTM II e hemácias não infectadas tipo O⁺), da temperatura de 37° C e da mistura de gases durante 48 horas, de modo a causar a morte do parasito. Para análise, 20 µL de hemácias parasitadas foram ressuspendidos

em 400 µL de tampão Isoton; c) um tubo submetido ao mesmo tratamento do item b), ao qual foram adicionados 50 µL de metanol, com objetivo de causar a morte do parasito, e diluídos para hematócrito de 5% em Isoton, para análise. As 19 amostras (3 controles e 8 amostras de cada teste de sensibilidade *in vitro*) foram analisadas em citômetro Fortessa (Quadro 6).

Quadro 6 - Ensaio de citometria de fluxo para avaliação da viabilidade e do fenômeno de dormência do isolado NF54 de *P. falciparum*.

	Número	Amostra	Marcação	
			Rodamina123/DAPI	Sem marcação
Controles	1	Hemácia não parasitada		●
	2	Parasito morto sem metanol		●
	3	Parasito morto com metanol		●
Dihidroartemisinina	4	Well A - 1000 nM	●	
	5	Well B - 250 nM	●	
	6	Well C - 62,5 nM	●	
	7	Well D - 15,6 nM	●	
	8	Well E - 3,9 nM	●	
	9	Well F - 0,9 nM	●	
	10	Well G - 0,2 nM	●	
	11	Well H - Controle negativo	●	
Lumefantrina	12	Well A - 200 nM	●	
	13	Well B - 66,6 nM	●	
	14	Well C - 22,2 nM	●	
	15	Well D - 7,4 nM	●	
	16	Well E - 2,4 nM	●	
	17	Well F - 0,8 nM	●	
	18	Well G - 0,2 nM	●	
	19	Well H - Controle negativo	●	

3.8 Ensaio de sobrevivência do trofozoíto jovem (*Ring Stage Survival Assay* - RSA) do isolado *P. falciparum* NF54 frente à DHA e LMF.

O ensaio RSA do isolado NF54 de *P. falciparum* frente à DHA foi realizado empregando parasitos sincronizados no estágio de trofozoíto jovem com parasitemia de 0,5% e hematócrito de 2%. Para tal objetivo, 50 µL de hemácias infectadas com 0,5% de parasitemia foram colocados em 2,5 mL de meio RPMI 1640 completo suplementado. A seguir foi preparada a solução teste de DHA adicionando 20 µL de solução estoque de DHA (200 µg/mL) em 2.000 µL de meio RPMI 1640 completo suplementado como descrito, com homogeneização em *Vortex*. A solução controle de DMSO foi preparada adicionando 10 µL de DMSO absoluto (100%) em 1.000 µL de meio RPMI 1640 completo suplementado.

Para a implantação do RSA foram utilizados dois *wells* da microplaca de 48 *wells*: *well* exposto (DHA) e *well* não exposto (DMSO). No *well* exposto à DHA foram dispensados 100 µL de solução teste de DHA com 900 µL da mistura de hemácias infectadas com trofozoítos jovens de *P. falciparum* em meio RPMI 1640 completo, obtendo uma concentração final de DHA de 0,2 µg/mL (700 nM). Esta suspensão foi homogeneizada delicadamente e a microcultura foi incubada em condições de cultura a 37° C em ambiente com 90% de N₂, 5% de CO₂ e 5% de O₂ por exatamente 6 horas. Com relação ao *well* não exposto (DMSO), 100 µL de solução controle de DMSO foram colocados em um *well* da microplaca de 48 *wells* e a ele foram adicionados 900 µL da

suspensão de hemácias infectadas com trofozoítos jovens de *P. falciparum* em meio RPMI 1640 completo, obtendo uma concentração final de DMSO de 0,1%. A suspensão foi homogeneizada delicadamente e mantida em cultura nas mesmas condições que RSA da DHA por exatamente 6 horas.

Após seis horas de incubação, os conteúdos de cada *well* exposto e não exposto foram centrifugados a 1.200 rpm por 2 minutos e os sobrenadantes foram removidos. Em cada *pellet* de hemácias infectadas foram adicionados 12 mL de meio RPMI 1640 incompleto e as mesmas foram ressuspensas. As suspensões foram novamente centrifugadas a 1.000 rpm por 5 minutos e os sobrenadantes foram removidos. Foi adicionado 1 mL de meio RPMI 1640 completo em cada *pellet* dos *wells* expostos e não expostos e os mesmos foram ressuspensos.

As suspensões foram transferidas para dois novos *wells* da microplaca de 48 *wells* e as microculturas foram incubadas a 37° C em ambiente com 90% de N₂, 5% de CO₂ e 5% de O₂ sem troca do meio de cultura RPMI 1640 as 24 e 48 horas. O ensaio foi finalizado às 66 horas de incubação e os conteúdos dos *wells* expostos e não expostos foram gentilmente homogeneizados, as suspensões foram centrifugadas a 2.000 rpm por 30 segundos e o sobrenadante foi descartado. Finalmente, foram confeccionados esfregaços empregando 2 µL de *pellet* de hemácias de ambos os *wells*.

Com relação à LMF foi utilizado o mesmo protocolo de RSA empregado para a DHA, no entanto as concentrações finais testadas no RSA da LMF e do seu solvente etanol (solução controle) foram 3.500 nM e 0,7%, respectivamente.

A leitura dos esfregaços foi realizada mediante contagem do número de parasitos viáveis em 10.000 hemácias. Foram realizadas leituras na Hora Zero (INI) e após a incubação de 72 horas, nos *wells* controles não expostos à droga (NE) e expostos (DHA ou LMF).

A Taxa de Crescimento (TC) foi calculada segundo a fórmula: $TC = NE/INI$.

O Percentual de Sobrevivência (PS) foi calculado segundo a fórmula:

$PS = (DHA/NE) \times 100$ ou $PS = (LMF/NE) \times 100$, de acordo com a droga ensaiada.

O protocolo foi utilizado segundo WITKOWSKI e colaboradores (2013).

3.9 Diagnóstico molecular

A extração de DNA e o diagnóstico molecular foram realizados, com o objetivo de confirmar a monoinfecção por *P. falciparum*. Para extração de DNA genômico a amostra foi submetida à lise com saponina 1%, obtendo-se um *pellet* concentrado do qual foram retirados 200µL para extração com QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN®, Hilden, Alemanha), conforme instruções do fabricante. O DNA foi eluído em 200µL e estocado a -20°C. A *nested* PCR foi realizada usando genes de *ssrRNA* como alvo. A primeira reação empregou *primers* gênero-específicos rPLU5 e rPLU6 que amplificam um fragmento de 1,2 Kb e a segunda reação utilizou *primers* espécie-específicos. A reação foi preparada com 25µL com 250nM de cada *primer*, 125µM dNTPs, 2mM

MgCl₂, 50mM KCl, 10 mM Tris pH 8,3, 0,4 U de *Taq* polimerase e 1μL de DNA genômico. Foram incluídos controles positivos (DNA genômico de *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*) e negativo (água ultrapura), com 1 ciclo de denaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 58°C por 2 minutos, 72°C por 2 minutos e então 24 ciclos a 94°C por 1 minuto, 58°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos, e um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos. Na 2ª reação foram realizados 30 ciclos de amplificação, nas mesmas condições. Os fragmentos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE (0,089M Trizma Base, 0,089M Ácido Bórico, 0,02M EDTA), marcador de peso molecular de 100 bp e visualizados com brometo de etídio através de luz UV (SNOUNOU et al, 1993).

4. RESULTADOS

4.1 Controle de qualidade

Controles de qualidade das microplacas de 96 *wells* que continham as drogas objeto do estudo: DHA, LMF, AS, MFQ e ATM foram realizados em diferentes etapas da pesquisa. Ensaio de sensibilidade *in vitro* baseado na contagem do número de esquizontes em 200 parasitos após 72 horas de cultivo foram efetuados empregando o isolado de referência NF54 de *P. falciparum*. Os resultados obtidos em cada teste são apresentados a seguir (Tabelas 1 – 5).

Tabela 1 - Teste de sensibilidade *in vitro* do isolado NF54 de *P. falciparum* frente à DHA e LMF baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM. A.

Número de esquizontes/200 parasitos			
Concentração	DHA	Concentração	LMF
1000	0	200	0
250	0	66,6	0
62,5	0	22,2	47
15,6	51	7,4	51
3,9	76	2,4	69
0,9	85	0,8	68
0,2	84	0,2	74
Controle	87	Controle	73

Tabela 2 - Teste de sensibilidade *in vitro* do isolado NF54 de *P. falciparum* frente à DHA e LMF baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM. B.

Número de esquizontes/200 parasitos			
Concentração	DHA	Concentração	LMF
1000	0	200	0
250	3	66,6	0
62,5	3	22,2	13
15,6	17	7,4	12
3,9	13	2,4	24
0,9	17	0,8	26
0,2	22	0,2	35
Controle	22	Controle	21

Tabela 3 - Teste de sensibilidade *in vitro* do isolado NF54 de *P. falciparum* frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM.

Número de esquizontes/200 parasitos							
Concentração	DHA	Concentração	LMF	Concentração	AS	Concentração	MFQ
1000	1	200	3	100	2	1000	0
400	6	100	8	33,3	23	250	2
160	7	50	34	11,11	75	62,5	38
64	11	25	50	3,7	83	15,6	38
25,6	12	12,5	69	1,2	112	3,9	71
10,2	36	6,2	70	0,4	113	0,9	73
4	50	3,1	72	0,1	115	0,2	74
Controle	63	Controle	73	Controle	120	Controle	88

Tabela 4 - Teste de sensibilidade *in vitro* do isolado NF54 de *P. falciparum* frente ao ATM e CQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM.

Número de esquizontes/200 parasitos			
Concentração	ATM	Concentração	CQ
200	5	3200	0
66,6	11	1,066	0
22,2	81	355,5	0
7,4	116	118,5	2
2,4	137	39,5	18
0,8	138	13,1	82
0,2	144	4,38	121
Controle	145	Controle	140

Os resultados de IC₅₀ do isolado NF54 de *P. falciparum* frente à DHA, LMF, AS, MFQ, ATM e CQ foram obtidos empregando o Programa GraphPad.Prism v5.01 e são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados de IC₅₀ dos testes de sensibilidade *in vitro* do isolado de referência NF54 de *P. falciparum* frente à DHA, LMF, AS, MFQ, ATM e CQ.

Número	Isolado	IC ₅₀ (nM)					
		DHA	LMF	AS	MFQ	ATM	CQ
1	NF54	15,5	18,4	NR	NR	NR	NR
2	NF54	19,1	4,9	NR	NR	NR	NR
3	NF54	11.1	39,1	10,9	17,6	NR	NR
4	NF54	NR	NR	NR	NR	19,3	14

NR = não realizado

4.2 Ensaios de sensibilidade

4.2.1 Ensaios de sensibilidade *ex-vivo* e *in vitro* de isolados clínicos de *P. falciparum*

Entre os anos 2014 a 2016 foram realizados ensaios de sensibilidade *ex-vivo* e *in vitro* às ACTs empregando-se 25 isolados clínicos de *P. falciparum*. Dez isolados começaram o ensaio de sensibilidade com parasitemias iniciais de 0,5%, três foram testados com parasitemias de 1% e outras três amostras com parasitemias de 0,2%. Dois isolados tiveram parasitemia de 0,4% ao início do teste e as sete amostras restantes apresentaram parasitemias de: 0,7%; 0,6%; 0,3%; 0,1%; 0,08%; 3920/mm³ e 720/mm³.

Os isolados de *P. falciparum* S-02/14, FS 05/15, S-01/15, Am 12/16 e FS 31/16 foram testados somente frente a DHA e LMF. A amostra FS 09/15 foi ensaiada unicamente frente ao AS e MFQ. Os isolados FS 08/15, FS 15/15, FS 16/15, FS 17/15, FS 18/15, FS 21/15, FS 08/16, Am 09/16, FS 12/16, Am 11/16, FS 21/16, FS 24/16, Am 16/16, Am 21/16, FS 27/16, FS 28/16, FS 29/16, Am 25/16 e Am 17/16 foram pressionados com os quatro fármacos: DHA, LMF, AS e MFQ.

Com relação à reposição das drogas durante a incubação, 24 isolados receberam pressão dos fármacos unicamente durante 24 horas, exceto a amostra S-01/15 que além de ter sido pressionada às 24 horas recebeu um segundo tratamento com os antimaláricos às 48 horas de incubação. Os isolados S-02/14, FS 05/15, S-01/15

e FS 08/15 foram testados com as sete concentrações de DHA e LMF estabelecidas no início do estudo, entretanto os isolados FS 15/15, FS 16/15, FS 17/15, FS 18/15, FS 21/15, FS 08/16, Am 09/16, FS 12/16, Am 11/16, Am 12/16, FS 21/16, FS 24/16, Am 16/16, Am 21/16, FS 27/16, FS 28/16, FS 29/16, Am 25/16, Am 17/16 e FS 31/16 receberam as sete novas concentrações de DHA e LMF, redefinidas para otimizar o cálculo do IC₅₀.

Ao final dos experimentos todos os isolados, exceto as amostras FS 15/15, FS 08/16, FS 27/16 e FS 28/16 de *P. falciparum*, apresentaram a quantidade de esquizontes necessária para considerar os ensaios *ex-vivo* válidos. Nestes quatro isolados, a quantidade de esquizontes requerida não foi atingida nos *wells* controles de crescimento das microplacas. De fato, raríssimos parasitos viáveis foram observados às 72 horas de incubação. Com relação ao isolado FS 15/15, este resultado poderia derivar-se da sua exposição previa ao antibiótico clindamicina, o que comprometeu a viabilidade parasitaria no cultivo *in vitro* e frente às ACTs. A análise por citometria de fluxo corroborou com estes resultados, visto que não foram observados parasitos viáveis nos gráficos *dot plots*. Nos isolados FS 08/16, FS 27/16 e FS 28/16 houve adequado crescimento parasitário até aproximadamente às 48 horas de incubação, no entanto ao finalizar o período de cultura dos testes *ex-vivo* (72 horas) houve diminuição da parasitemia e raríssimos parasitos saudáveis foram visualizados.

Com referência ao desenvolvimento dos parasitos nos experimentos de sensibilidade *ex-vivo* e *in vitro*, na maioria das amostras clínicas, houve inibição da

maturação com as maiores concentrações das drogas, contudo pontos sem citoplasma (P), trofozoítos jovens (TJ), trofozoítos médios (TM) e trofozoítos maduros (TMA) foram observados nestas concentrações. Esquizontes (E) foram visualizados na concentração de 100 nM de AS nas amostras: FS 08/15, FS 21/15, FS 24/16, Am 09/16, FS 12/16, Am 11/16, Am 17/16, FS 27/16 e Am 21/16; na concentração de 200 nM de LMF nos isolados: Am 09/16, Am 17/16, Am 21/16 e FS 31/16; e na concentração de 1000 nM de MFQ na amostra: Am 21/16. Os cálculos das IC₅₀ foram realizados utilizando o programa GraphPad.Prism v5.01.

Nas Tabelas 6 a 28 são apresentados os números de esquizontes dos isolados clínicos de *P. falciparum* frente à DHA, LMF, AS e MFQ. Também são apresentados os controles de crescimento sem droga de cada experimento. Nas Tabelas 29 e 30 são apresentados os resultados de IC₅₀ dos testes de sensibilidade *ex-vivo* e *in vitro* das amostras clínicas e os intervalos dos IC₅₀, respectivamente.

Tabela 6 - Teste de sensibilidade *ex-vivo* do isolado S-02/14 de *P. falciparum* frente à DHA e LMF baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM.

Número de esquizontes/200 parasitos			
Concentração	DHA	Concentração	LMF
1000	0	200	0
250	0	66,6	3
62,5	0	22,2	67
15,6	12	7,4	69
3,9	79	2,4	67
0,9	61	0,8	68
0,2	83	0,2	76
Controle	81	Controle	70

Tabela 7 - Teste de sensibilidade *ex-vivo* do isolado FS 05/15 de *P. falciparum* frente à DHA e LMF baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM.

Número de esquizontes/200 parasitos			
Concentração	DHA	Concentração	LMF
1000	0	200	0
250	0	66,6	0
62,5	4	22,2	3
15,6	6	7,4	5
3,9	4	2,4	4
0,9	1	0,8	5
0,2	0	0,2	5
Controle	4	Controle	7

Tabela 8 - Teste de sensibilidade *ex-vivo* do isolado S-01/15 de *P. falciparum* frente à DHA e LMF baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM.

Número de esquizontes/200 parasitos			
Concentração	DHA	Concentração	LMF
1000	0	200	0
250	0	66,6	0
62,5	0	22,2	2
15,6	6	7,4	22
3,9	11	2,4	21
0,9	32	0,8	23
0,2	44	0,2	25
Controle	44	Controle	36

Tabela 9 - Teste de sensibilidade *ex-vivo* do isolado FS 08/15 de *P. falciparum* frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM.

Número de esquizontes/200 parasitos							
Concentração	DHA	Concentração	LMF	Concentração	AS	Concentração	MFQ
1000	0	200	0	100	3	1000	0
250	0	66,6	0	33,3	16	250	0
62,5	29	22,2	31	11,11	30	62,5	27
15,6	35	7,4	41	3,7	38	15,6	42
3,9	45	2,4	53	1,2	37	3,9	54
0,9	61	0,8	62	0,4	37	0,9	65
0,2	61	0,2	64	0,1	37	0,2	67
Controle	67	Controle	68	Controle	43	Controle	68

Tabela 10 - Teste de sensibilidade *ex-vivo* do isolado FS 09/15 de *P. falciparum* frente ao AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM.

Número de esquizontes/200 parasitos			
Concentração	AS	Concentração	MFQ
100	0	1000	0
33,3	0	250	0
11,11	0	62,5	0
3,7	2	15,6	5
1,2	3	3,9	12
0,4	11	0,9	19
0,1	21	0,2	21
Controle	27	Controle	29

Tabela 11 - Teste de sensibilidade *ex-vivo* do isolado FS 16/15 de *P. falciparum* frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM.

Número de esquizontes/200 parasitos							
Concentração	DHA	Concentração	LMF	Concentração	AS	Concentração	MFQ
1000	0	200	0	100	0	1000	0
400	0	100	0	33,3	2	250	0
160	0	50	32	11,11	17	62,5	17
64	0	25	52	3,7	42	15,6	28
25,6	2	12,5	54	1,2	53	3,9	45
10,2	27	6,2	62	0,4	62	0,9	54
4	53	3,1	65	0,1	67	0,2	62
Controle	62	Controle	65	Controle	66	Controle	62

Tabela 12 - Teste de sensibilidade *ex-vivo* do isolado FS 17/15 de *P. falciparum* frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM.

Número de esquizontes/200 parasitos							
Concentração	DHA	Concentração	LMF	Concentração	AS	Concentração	MFQ
1000	0	200	0	100	0	1000	0
400	0	100	0	33,3	0	250	0
160	0	50	0	11,11	0	62,5	0
64	0	25	8	3,7	0	15,6	8
25,6	0	12,5	18	1,2	9	3,9	14
10,2	0	6,2	29	0,4	19	0,9	22
4	12	3,1	27	0,1	29	0,2	27
Controle	28	Controle	29	Controle	29	Controle	31

Tabela 13 - Teste de sensibilidade *ex-vivo* do isolado FS 18/15 de *P. falciparum* frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM.

Número de esquizontes/200 parasitos							
Concentração	DHA	Concentração	LMF	Concentração	AS	Concentração	MFQ
1000	0	200	0	100	0	1000	0
400	0	100	0	33,3	0	250	0
160	0	50	0	11,11	3	62,5	0
64	0	25	8	3,7	14	15,6	5
25,6	0	12,5	17	1,2	17	3,9	15
10,2	0	6,2	22	0,4	19	0,9	18
4	8	3,1	21	0,1	21	0,2	25
Controle	21	Controle	29	Controle	28	Controle	32

Tabela 14 - Teste de sensibilidade *ex-vivo* do isolado FS 21/15 de *P. falciparum* frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM.

Número de esquizontes/200 parasitos							
Concentração	DHA	Concentração	LMF	Concentração	AS	Concentração	MFQ
1000	0	200	0	100	21	1000	0
400	0	100	0	33,3	22	250	0
160	0	50	17	11,11	22	62,5	27
64	0	25	26	3,7	27	15,6	35
25,6	25	12,5	27	1,2	35	3,9	42
10,2	32	6,2	31	0,4	38	0,9	42
4	39	3,1	39	0,1	43	0,2	45
Controle	41	Controle	48	Controle	43	Controle	47

Tabela 15 - Teste de sensibilidade *ex-vivo* do isolado Am 09/16 de *P. falciparum* frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM.

Número de esquizontes/200 parasitos							
Concentração	DHA	Concentração	LMF	Concentração	AS	Concentração	MFQ
1000	0	200	2	100	6	1000	0
400	0	100	6	33,3	9	250	9
160	2	50	7	11,11	9	62,5	9
64	10	25	8	3,7	9	15,6	10
25,6	27	12,5	14	1,2	16	3,9	10
10,2	27	6,2	14	0,4	16	0,9	10
4	30	3,1	16	0,1	20	0,2	10
Controle	33	Controle	20	Controle	20	Controle	10

Tabela 16 - Teste de sensibilidade *ex-vivo* do isolado FS 12/16 de *P. falciparum* frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM.

Número de esquizontes/200 parasitos							
Concentração	DHA	Concentração	LMF	Concentração	AS	Concentração	MFQ
1000	0	200	0	100	7	1000	0
400	0	100	4	33,3	20	250	1
160	11	50	36	11,11	52	62,5	19
64	20	25	37	3,7	53	15,6	51
25,6	23	12,5	38	1,2	64	3,9	57
10,2	29	6,2	39	0,4	67	0,9	63
4	35	3,1	58	0,1	68	0,2	64
Controle	36	Controle	59	Controle	69	Controle	65

Tabela 17 - Teste de sensibilidade *ex-vivo* do isolado Am 11/16 de *P. falciparum* frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM.

Número de esquizontes/200 parasitos							
Concentração	DHA	Concentração	LMF	Concentração	AS	Concentração	MFQ
1000	0	200	0	100	37	1000	0
400	0	100	15	33,3	39	250	9
160	0	50	76	11,11	64	62,5	56
64	1	25	84	3,7	71	15,6	59
25,6	27	12,5	85	1,2	73	3,9	62
10,2	51	6,2	102	0,4	74	0,9	70
4	67	3,1	105	0,1	75	0,2	72
Controle	103	Controle	110	Controle	128	Controle	98

Tabela 18 - Teste de sensibilidade *ex-vivo* do isolado Am 12/16 de *P. falciparum* frente à DHA e LMF baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM.

Número de esquizontes/200 parasitos			
Concentração	DHA	Concentração	LMF
1000	0	200	0
400	0	100	0
160	0	50	2
64	0	25	2
25,6	0	12,5	7
10,2	0	6,2	8
4	2	3,1	9
Controle	18	Controle	19

Tabela 19 - Teste de sensibilidade *ex-vivo* do isolado FS 21/16 de *P. falciparum* frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM.

Número de esquizontes/200 parasitos							
Concentração	DHA	Concentração	LMF	Concentração	AS	Concentração	MFQ
1000	0	200	0	100	0	1000	0
400	0	100	0	33,3	0	250	0
160	0	50	4	11,11	3	62,5	5
64	0	25	11	3,7	7	15,6	38
25,6	2	12,5	22	1,2	9	3,9	39
10,2	10	6,2	37	0,4	29	0,9	40
4	16	3,1	37	0,1	31	0,2	40
Controle	28	Controle	38	Controle	44	Controle	43

Tabela 20 - Teste de sensibilidade *ex-vivo* do isolado FS 24/16 de *P. falciparum* frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM.

Número de esquizontes/200 parasitos							
Concentração	DHA	Concentração	LMF	Concentração	AS	Concentração	MFQ
1000	0	200	0	100	2	1000	0
400	0	100	0	33,3	17	250	0
160	0	50	41	11,11	48	62,5	29
64	23	25	48	3,7	49	15,6	52
25,6	33	12,5	50	1,2	49	3,9	59
10,2	45	6,2	57	0,4	58	0,9	62
4	59	3,1	60	0,1	61	0,2	62
Controle	65	Controle	68	Controle	61	Controle	69

Tabela 21 - Teste de sensibilidade *ex-vivo* do isolado Am 16/16 de *P. falciparum* frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM.

Número de esquizontes/200 parasitos							
Concentração	DHA	Concentração	LMF	Concentração	AS	Concentração	MFQ
1000	0	200	0	100	0	1000	0
400	0	100	2	33,3	14	250	0
160	0	50	5	11,11	28	62,5	13
64	7	25	17	3,7	36	15,6	33
25,6	8	12,5	31	1,2	52	3,9	49
10,2	41	6,2	46	0,4	59	0,9	55
4	68	3,1	55	0,1	62	0,2	60
Controle	71	Controle	65	Controle	64	Controle	64

Tabela 22 - Teste de sensibilidade *in vitro* do isolado Am 16/16 de *P. falciparum* frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM.

Número de esquizontes/200 parasitos							
Concentração	DHA	Concentração	LMF	Concentração	AS	Concentração	MFQ
1000	0	200	0	100	0	1000	0
400	0	100	0	33,3	2	250	0
160	0	50	3	11,11	17	62,5	0
64	0	25	18	3,7	21	15,6	12
25,6	0	12,5	25	1,2	42	3,9	27
10,2	19	6,2	35	0,4	48	0,9	36
4	29	3,1	37	0,1	48	0,2	39
Controle	47	Controle	53	Controle	52	Controle	47

Tabela 23 - Teste de sensibilidade *in vitro* do isolado Am 21/16 de *P. falciparum* frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM.

Número de esquizontes/200 parasitos							
Concentração	DHA	Concentração	LMF	Concentração	AS	Concentração	MFQ
1000	0	200	2	100	14	1000	4
400	0	100	4	33,3	46	250	4
160	1	50	5	11,11	54	62,5	26
64	7	25	14	3,7	66	15,6	42
25,6	24	12,5	50	1,2	67	3,9	43
10,2	28	6,2	51	0,4	68	0,9	60
4	50	3,1	64	0,1	70	0,2	62
Controle	51	Controle	74	Controle	71	Controle	68

Tabela 24 - Teste de sensibilidade *in vitro* do isolado FS 27/16 de *P. falciparum* frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM.

Número de esquizontes/200 parasitos							
Concentração	DHA	Concentração	LMF	Concentração	AS	Concentração	MFQ
1000	0	200	0	100	4	1000	0
400	0	100	6	33,3	12	250	0
160	0	50	14	11,11	26	62,5	24
64	0	25	24	3,7	27	15,6	40
25,6	14	12,5	25	1,2	44	3,9	52
10,2	18	6,2	40	0,4	54	0,9	58
4	22	3,1	60	0,1	55	0,2	59
Controle	42	Controle	84	Controle	60	Controle	68

Tabela 25 - Teste de sensibilidade *ex-vivo* do isolado FS 29/16 de *P. falciparum* frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM.

Número de esquizontes/200 parasitos							
Concentração	DHA	Concentração	LMF	Concentração	AS	Concentração	MFQ
1000	0	200	0	100	0	1000	0
400	0	100	0	33,3	0	250	0
160	0	50	53	11,11	0	62,5	0
64	0	25	0	3,7	0	15,6	0
25,6	0	12,5	54	1,2	63	3,9	106
10,2	0	6,2	0	0,4	1	0,9	107
4	0	3,1	68	0,1	96	0,2	0
Controle	50	Controle	104	Controle	108	Controle	108

Tabela 26 - Teste de sensibilidade *ex-vivo* do isolado Am 25/16 de *P. falciparum* frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM.

Número de esquizontes/200 parasitos							
Concentração	DHA	Concentração	LMF	Concentração	AS	Concentração	MFQ
1000	0	200	0	100	0	1000	0
400	0	100	0	33,3	7	250	0
160	0	50	28	11,11	26	62,5	58
64	0	25	18	3,7	43	15,6	59
25,6	0	12,5	98	1,2	92	3,9	144
10,2	30	6,2	99	0,4	106	0,9	145
4	52	3,1	110	0,1	42	0,2	176
Controle	60	Controle	122	Controle	112	Controle	122

Tabela 27 - Teste de sensibilidade *in vitro* do isolado Am 17/16 de *P. falciparum* frente à DHA, LMF, AS e MFQ baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM.

Número de esquizontes/200 parasitos							
Concentração	DHA	Concentração	LMF	Concentração	AS	Concentração	MFQ
1000	0	200	4	100	3	1000	0
400	0	100	6	33,3	14	250	1
160	0	50	36	11,11	20	62,5	54
64	1	25	37	3,7	28	15,6	55
25,6	18	12,5	44	1,2	34	3,9	68
10,2	26	6,2	48	0,4	38	0,9	72
4	34	3,1	49	0,1	44	0,2	76
Controle	38	Controle	64	Controle	47	Controle	77

Tabela 28 - Teste de sensibilidade *ex-vivo* do isolado FS 31/16 de *P. falciparum* frente à DHA e LMF baseado no número de esquizontes/200 parasitos. Concentrações em nM.

Número de esquizontes/200 parasitos			
Concentração	DHA	Concentração	LMF
1000	0	200	1
400	0	100	16
160	0	50	24
64	0	25	56
25,6	0	12,5	60
10,2	20	6,2	61
4	28	3,1	62
Controle	44	Controle	64

Tabela 29 - Resultados de IC₅₀ dos testes de sensibilidade *ex-vivo* e *in vitro* dos isolados clínicos de *P. falciparum* frente à DHA, LMF, AS e MFQ.

Número	Isolado	IC ₅₀ (nM)			
		DHA	LMF	AS	MFQ
1	S-02/14	7.6	32.2	-	-
2	FS 05/15	66.6	8.9	-	-
3	S-01/15	2	3.8	-	-
4	FS 08/15	18.8	11.1	16.5	26.5
5	FS 09/15	-	-	0.3	2
6	FS 15/15	-	-	-	-
7	FS 16/15	7.6	40.2	4.6	13
8	FS 17/15	1.8	15.5	0.6	3
9	FS 18/15	1.6	17.3	1.6	49.9
10	FS 21/15	22.7	17.3	1.6	49.9
11	FS 08/16	-	-	-	-
12	Am 09/16	40.5	16.4	1.9	439
13	FS 12/16	56.6	30.2	14.2	32.5
14	Am 11/16	8.1	48.8	0.3	32
15	Am 12/16	0.4	4.1	-	-
16	FS 21/16	4.7	16.2	0.5	29.1
17	FS 24/16	25	35.4	16.2	36.9
18	Am 16/16 <i>ex-vivo</i>	11.4	10.8	6.4	14.3
19	Am 16/16 <i>in vitro</i>	5.1	9.6	3.6	4.3
20	Am 21/16 <i>in vitro</i>	17.5	11.6	25.9	17.1
21	FS 27/16 <i>in vitro</i>	6.4	6.7	3.6	21.2
22	FS 28/16	-	-	-	-
23	FS 29/16	-	3.8	0.3	6.4
24	Am 25/16	8.1	16.3	2.9	-
25	Am 17/16 <i>in vitro</i>	17.4	24.4	5	62.2
26	FS 31/16	5.7	48	-	-

Tabela 30 - Intervalos dos resultados de IC₅₀ dos testes de sensibilidade *ex-vivo* e *in vitro* dos isolados clínicos de *P. falciparum* frente à DHA, LMF, AS e MFQ.

Droga	IC ₅₀ (nM)
DHA	0,4 - 66,6
LMF	3,8 - 48,8
AS	0,3 - 25,9
MFQ	2 - 439

4.2.2 Ensaios de sensibilidade e monitoramento da recrudescência *in vitro* do isolado NF54 de *P. falciparum*

O teste de sensibilidade foi finalizado 72 horas após incubação dos parasitos nas diferentes concentrações das drogas. Para a DHA não houve crescimento para o estágio de esquizontes nos *wells* 1000 nM, 250 nM e 62,5 nM. Nas duas primeiras concentrações foram observados raríssimos trofozoítos e na terceira concentração raros trofozoítos. Foram observados esquizontes no quarto dia na concentração de 62,5 nM, no sétimo na concentração de 250 nM e no décimo primeiro na concentração de 1000 nM. Com relação à LMF, às 72 horas não foram observados esquizontes nas concentrações de 200 nM e 66,6 nM. Na primeira concentração foram observados trofozoítos e na segunda trofozoítos e trofozoítos maduros. Foram observados esquizontes no sétimo dia na concentração de 66,6 nM e no décimo segundo dia na concentração de 200 nM. Estes resultados são apresentados nas Tabelas 31 e 32.

Tabela 31 - Ensaio de sensibilidade e avaliação do fenômeno de dormência *in vitro* do isolado NF54 de *P. falciparum* frente à DHA.

Ensaio	Dia	Concentração de DHA (nM)							Controle
		1000	250	62,5	15,6	3,9	0,9	0,2	
Microteste	0	0	0	0	51	76	85	84	87
Dormência	2	RTJ	RTJ	RTJ/TMA					79
	4	RTJ	TM/TMA	11					83
	5	RTJ	TM/TMA	9					86
	7	RTJ	14	52					79
	9	RTJ	20	71					81
	11	4	79	84					87
	12	12	76	84					85
	14	13	74	86					89
	15	48	73	84					88

RTJ: raríssimos trofozoítos jovens; TM: trofozoítos médios; TMA: trofozoítos maduros

Tabela 32 - Ensaio de sensibilidade e avaliação do fenômeno de dormência *in vitro* do isolado NF54 de *P. falciparum* frente à LMF.

Ensaio	Dia	Concentração de LMF (nM)							Controle
		200	66,6	22,2	7,4	2,4	0,8	0,2	
Microteste	0	0	0	47	51	69	68	74	73
Dormência	2	RTJ	TM/TMA						62
	4	RTJ	TM/TMA						79
	5	RTJ	TM/TMA						82
	7	RTJ	22						87
	9	RTJ	36						81
	11	RTJ	66						87
	12	2	74						85
	14	3	77						89
	15	2	80						88
	17	2	-						87

RTJ: raríssimos trofozoítos jovens; TM: trofozoítos médios; TMA: trofozoítos maduros

4.2.3 Ensaios de sensibilidade e monitoramento da recrudescência *in vitro* dos isolados de campo S-01/15 e FS 08/15 de *P. falciparum*

O ensaio de sensibilidade *ex-vivo* às drogas antimaláricas terminou-se após 72 horas de incubação. Com relação ao isolado S-01/15, para a DHA não houve desenvolvimento do parasito para o estágio de esquizonte nas concentrações de 1000 nM, 250 nM e 62,5 nM. Nas duas primeiras concentrações foram observados pontos sem citoplasma e parasitos com morfologia alterada (trofozoítos) com raríssimos trofozoítos saudáveis. Com referência à LMF, às 72 horas não foram encontrados esquizontes na concentração de 200 nM. Nesta concentração foram observados pontos sem citoplasma, com raríssimos trofozoítos saudáveis e a maioria de trofozoítos médios mortos. Ao finalizar o teste de recrudescência, foi observada recuperação dos parasitos nas concentrações 1.000 nM, 250 nM e 62,5 nM de DHA. Na maior concentração de LMF (200 nM), a recuperação do parasito não foi atingida. Estes resultados são apresentados nas Tabelas 33 e 34.

O isolado FS 08/15 de *P. falciparum* foi testado frente às quatro drogas antimaláricas: DHA, LMF, AS e MFQ. Após 72 horas de incubação, não houve maturação do parasito para o estágio de esquizontes nas concentrações de 1.000 nM de DHA, 200 nM de LMF e 1.000 nM de MFQ. A fase de esquizonte foi atingida apenas na concentração de 100 nM de AS. Em todos os casos o ensaio de dormência foi iniciado. O esquema de análise parasitária é apresentado nas Tabelas 35-38.

Tabela 33 - Ensaio de sensibilidade e avaliação do fenômeno de dormência *in vitro* do isolado S-01/15 de *P. falciparum* frente à DHA.

Ensaio	Dia	Concentração de DHA (nM)							Controle
		1000	250	62,5	15,6	3,9	0,9	0,2	
Microteste	0	0	0	0	6	11	32	44	44
	2	P; RTJ	P; RTJ	P; RTJ					34
	4	P; RTJ; 1TM	P; RTJ	P; RTJ					37
	6	P; RTJ	P; RTJ	P; RTJ					43
	8	P; RTJ	P; RTJ	P; RTJ					52
	10	P; RTJ	1TM; 1E	2TM; 2E					61
	12	2TJ; 1TM	-	-					29
	14	-	-	-					12
	16	-	-	-					TJ
	18	-	-	-					12
	20	-	-	-					15
	22	-	-	-					19
	24	-	-	-					21
	26	-	-	-					13
	28	-	-	-					13
	30	-	-	-					19
	32	-	-	TJ					23
	34	-	-	TJ					34
	36	-	-	TJ					32
Dormência	38	-	-	-					33
	40	RTJ,TM,E	RTJ,TM,E	RTJ,TM,E					32
	41	RTJ;TM	RTJ;TM	RTJ;TM					37

P: pontos sem citoplasma; RTJ: raríssimos trofozoítos jovens; TM: trofozoítos médios; E: esquizontes

Tabela 34 - Ensaio de sensibilidade e avaliação do fenômeno de dormência *in vitro* do isolado S-01/15 de *P. falciparum* frente à LMF.

Ensaio	Dia	Concentração de LMF (nM)							Controle
		200	66,6	22,2	7,4	2,4	0,8	0,2	
Microteste	0	0	0	2	22	21	23	25	36
	2	P; RTJ							34
	4	P; RTJ							41
	6	P; RTJ							47
	8	P; RTJ							52
	10	P; RTJ							61
	12	-							21
	14	-							12
	16	-							TJ
	18	-							12
	20	-							12
	22	-							13
Dormência	24	-							9
	26	-							15
	28	-							13
	30	-							23
	32	-							23
	34	-							42
	36	-							31
	38	-							35
	40	-							32

P: pontos sem citoplasma; RTJ: raríssimos trofozoítos jovens

Tabela 35 - Ensaio de sensibilidade e avaliação do fenômeno de dormência *in vitro* do isolado FS-08/15 de *P. falciparum* frente à DHA.

Ensaio	Dia	Concentração de DHA (nM)							Controle
		1000	250	62,5	15,6	3,9	0,9	0,2	
Microteste	0	P; RTJ	P; RTJ	29	35	45	61	61	67
	2	P; RTJ							17
	4	P							4
	6	P; RTJ							12
	8	P; RTJ							17
	10	P							40
	12	-							41
	14	-							16
	16	1 TJ							14
	18	-							9
Dormência	20	-							10
	22	-							12
	24	-							22
	26	-							32
	28	-							23
	30	-							-
	32	-							18
	34	-							24
	36	-							27
	38	-							26
	40	-							17
	41	-							11

P: pontos sem citoplasma; RTJ: raríssimos trofozoítos jovens

Tabela 36 - Ensaio de sensibilidade e avaliação do fenômeno de dormência *in vitro* do isolado FS-08/15 de *P. falciparum* frente à LMF.

Ensaio	Dia	Concentração de LMF (nM)							Controle
		200	66,6	22,2	7,4	2,4	0,8	0,2	
Microteste	0	A	A; RT	31	41	53	62	64	68
	2	P; RTJ							17
	4	P; RTJ							4
	6	P; RTJ							12
	8	P; RTJ							17
	10	P; RTJ							40
	12	-							41
	14	-							16
	16	-							14
	18	-							9
	20	-							10
	22	-							12
Dormência	24	-							22
	26	-							32
	28	-							23
	30	-							-
	32	-							18
	34	-							24
	36	-							27
	38	-							26
	40	-							17
	41	-							11

P: pontos sem citoplasma; RTJ: raríssimos trofozoítos jovens

Tabela 37 - Ensaio de sensibilidade e avaliação do fenômeno de dormência *in vitro* do isolado FS-08/15 de *P. falciparum* frente ao AS.

Ensaio	Dia	Concentração de AS (nM)							Controle
		100	33,3	11,11	3,7	1,2	0,4	0,1	
Microteste	0	3	16	30	38	37	37	37	43
	2	P; RTJ; TM; TMA; 2 E							17
	4	P; RTJ; 2 E							4
	6	P; 1 E							12
	8	P; RTJ; TM; TMA; 4 E							17
	10	P; TM; TMA; 2 E							40
	12	RTJ; TM; TMA; 1 E							41
	14	TM; TMA							16
	16	RTJ; TM							14
	18	RTJ; TMA; 2 E							9
	20	RTJ; TM; 6 E							10
	22	TM; 1 E							12
	24	RTJ; TMA; 2 E							22
	26	TMA							32
	28	RTJ; TM; TMA; 1 E							23
Dormência	30	TMA							-
	32	TMA							18
	34	TM							24
	36	-							27
	38	-							26
	40	-							17
	41	-							11

P: pontos sem citoplasma; RTJ: raríssimos trofozoítos jovens; TM: trofozoítos médios; TMA: trofozoítos maduros; E: esquizontes

Tabela 38 - Ensaio de sensibilidade e avaliação do fenômeno de dormência *in vitro* do isolado FS-08/15 de *P. falciparum* frente à MFQ.

Ensaio	Dia	Concentração de MFQ (nM)							Controle
		1000	250	62,5	15,6	3,9	0,9	0,2	
Microteste	0	P; RTJ	P; RTJ	27	42	54	65	67	68
	2	P; RTJ							17
	4	P							4
	6	P; RTJ							12
	8	P							17
	10	-							40
	12	-							41
	14	-							16
	16	RTJ							14
	18	-							9
Dormência	20	-							10
	22	-							12
	24	-							22
	26	-							32
	28	-							23
	30	-							-
	32	-							18
	34	-							24
	36	-							27
	38	-							26
	40	-							17
	41	-							11

P: pontos sem citoplasma; RTJ: raríssimos trofozoítos jovens

4.3 Determinação dos estágios sanguíneos do isolado NF54 de *P. falciparum* em ensaios de citometria de fluxo

Na calibração com sangue contendo hemácias e glóbulos brancos e hemácias sem glóbulos brancos, não houve diferença significativa no perfil apresentado na

citometria de fluxo. Os resultados são apresentados na Figura 4. Também foram marcados com Rodamina 123 e DAPI parasitos provenientes de cultivo contínuo, separados em trofozoítos jovens e maduros obtidos por centrifugação, conforme apresentado na Figura 5.

A

B

Figura 4. Ensaio de citometria de fluxo com sangue contendo hemácias sem glóbulos brancos (A) e hemácias com glóbulos brancos (B) utilizadas na calibração dos ensaios.

Figura 5. Ensaio de citometria de fluxo com trofozoítos jovens (anéis) e trofozoítos maduros do isolado NF54 de *P. falciparum* marcados com Rodamina e DAPI.

4.4 Comparação entre a avaliação por microscopia e citometria de fluxo em ensaios de sensibilidade *in vitro* do isolado NF54 de *P. falciparum*

Na análise por citometria de fluxo, optou-se por utilizar Rodamina 123 e DAPI (Figura 6), visto que estes dois corantes apresentaram melhores resultados quando comparados à marcação com JC-1. Com relação aos ensaios de indução da morte parasitária, o melhor resultado para avaliar parasitos não viáveis foi aquele sem adição de metanol (Figura 7).

Foram comparados os resultados da leitura por microscopia do isolado NF54 de *P. falciparum* frente a DHA e LMF, com leitura após 72 horas da incubação inicial (Tabela 2) com o ensaio de citometria de fluxo com marcações por Rodamina 123 e DAPI (Figuras 8-11), nas diferentes concentrações de DHA e LMF.

Figura 6. Hemácias não infectadas (A) e infectadas sem pressão de drogas marcadas com Rodamina e DAPI (B).

Figura 7. Parasitos não viáveis submetidos a condições desfavoráveis de cultura *in vitro* sem e com adição de metanol.

Figura 8. Ensaio de citometria de fluxo do isolado NF54 de *P. falciparum* submetido a diferentes concentrações de DHA (1000 nM – 0,2 nM).

1000 nM

250 nM

62,5 nM

15,6 nM

3,9 nM

0,9 nM

0,2 nM

Controle

Figura 9. Visualização microscópica do isolado NF54 de *P. falciparum* submetido a diferentes concentrações de DHA (1000 nM – 0,2 nM).

Figura 10. Ensaio de citometria de fluxo do isolado NF54 de *P. falciparum* submetido a diferentes concentrações de LMF (200 nM – 0,2 nM).

Figura 11. Visualização microscópica do isolado NF54 de *P. falciparum* submetido a diferentes concentrações de LMF (200 nM – 0,2 nM).

4.5 Ensaio de sobrevivência do trofozoíto jovem (*Ring Stage Survival Assay* - RSA) do isolado *P. falciparum* NF54 frente à DHA e LMF.

Após finalização do ensaio RSA do isolado NF54 de *P. falciparum* frente à DHA e LMF, foram realizados cálculos para estabelecer a PS e a TC do parasito frente a ambas as drogas. A TC e a PS desta amostra foi 2,92 e 4,19%, respectivamente, frente a 700 nM de DHA. Este mesmo isolado pressionado com 3.500 nM de LMF apresentou 3,6 de TC e 2,25% de PS.

5. DISCUSSÃO

Ainda que o número de casos de malária por *P. falciparum* tenha diminuído em nível global, a importância de se monitorar a resposta desta espécie de *Plasmodium* ao tratamento de primeira linha preconizado pela OMS, denominado Terapia Combinada com Artemisinina (ACT), é indiscutível. Estudos de vigilância que permitam avaliar a sensibilidade dos isolados de *P. falciparum* que circulam no país frente aos medicamentos adotados pelo Ministério da Saúde (ATM, LMF, AS, MFQ) devem ser realizados de maneira contínua de modo a possibilitar a rápida identificação de parasitos tolerantes a estas drogas.

Evidências da diminuição da eficácia da ART em *P. falciparum* já foram reportadas na Tailândia e no Camboja (NOEDL et al, 2009; DONDORP et al, 2009). Portanto a possibilidade da disseminação de linhagens resistentes é preocupante (WOOTTON et al, 2002; ROPER et al, 2004). A capacidade do parasito de resistir à ação das drogas antimaláricas foi amplamente estudada (DI SANTI et al, 1988; PETERSON et al, 1991; PRICE et al, 2004; VALDERRAMOS e FIDOCK, 2006; WITKOWSKI et al, 2009). Diferentes mecanismos estão relacionados com a resistência de *P. falciparum* aos antimaláricos. Nesta pesquisa estudamos a dormência, fenômeno que foi postulado para conferir tolerância deste parasito aos derivados da ART (WITKOWSKI et al, 2010). Atualmente a dormência é reconhecida como mecanismo de resistência às ACTs. Os mecanismos envolvidos estão sendo descritos e envolvem a participação da enzima PfPI3K e de

polimorfismos no gene que codifica a proteína *PfK13* propeller. De fato, mutações no gene *PfK13* impedem sua ligação com a *PfPI3K* o que leva a um incremento nos níveis desta enzima auxiliando os parasitos a superar os efeitos da DHA (MBENGUE et al, 2015).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o comportamento de isolados clínicos de *P. falciparum* frente aos esquemas terapêuticos de primeira linha para malária utilizados no Brasil, por meio da avaliação da sensibilidade *ex-vivo* e *in vitro* e da ocorrência do fenômeno de dormência *in vitro*, determinando a duração deste evento.

A análise dos controles de qualidade das microplacas que continham as drogas objeto do estudo mostrou variação nos resultados, com inibição do crescimento dos parasitos com 62,5 nM de DHA e 66,6 nM de LMF no primeiro ensaio; 1.000 nM de DHA e 66,6 nM de LMF no segundo ensaio; ausência de inibição nas doses utilizadas no terceiro ensaio. Uma explicação para este comportamento é que a leitura com base no número de esquizontes em 200 parasitos pode ser insuficiente para detectar esquizontes em número muito baixo na amostra; ou estes esquizontes seriam parasitos já presentes na implantação do ensaio, visto que os ensaios *in vitro* utilizam parasitos provenientes de cultura.

A caracterização fenotípica de sensibilidade *ex-vivo* e *in vitro* dos isolados clínicos de *P. falciparum* à DHA, LMF, AS e MFQ foi realizada mediante o protocolo clássico de maturação do esquizonte, o qual avalia o desenvolvimento do parasito desde a fase de trofozoíto jovem até o esquizonte maduro. Entretanto, com o surgimento do fenômeno de dormência, parasitos tolerantes à ART e seus derivados

passariam despercebidos na análise baseada neste ensaio. Como este se fundamenta na quantificação do número de esquizontes em 200 parasitos ao finalizar o teste, após a dormência ocorrer, unicamente os trofozoítos jovens seriam visualizados nos *wells* das microplacas com as maiores concentrações das drogas, considerando assim que os isolados foram sensíveis ao não apresentar esquizontes. Este resultado pode gerar uma falsa sensibilidade, visto que alguns isolados que foram pressionados com os derivados da ART e as drogas associadas, e que ficaram na fase de trofozoíto jovem após esta pressão continuam seu normal desenvolvimento depois da droga ser removida do ambiente onde o parasito se desenvolve.

Uma das formas de avaliar o comportamento das amostras clínicas de *P. falciparum* coletadas neste estudo frente à DHA, LMF, AS e MFQ foi calcular os IC₅₀. Os intervalos para cada droga foram: 0,4 - 66,6 nM para DHA; 3,8 – 48,8 nM para LMF; 0,3 - 25,9 nM para AS e 2 – 439 nM para MFQ. Comparando com os dados da literatura, o valor máximo de IC₅₀ encontrado é dez vezes maior que o reportado por Zatra e colaboradores (2012). Porém, com relação à LMF, cujo maior IC₅₀ encontrado neste estudo foi de 48,8 nM, estudos na Tailândia resultaram em IC₅₀ 2 vezes maior (Munghthin et al, 2010). Os testes de sensibilidade com o AS mostraram um valor máximo de IC₅₀ de 25,9 nM, cinco vezes maior que o reportado por Pillai e colaboradores (2012). Quanto à MFQ, o alto valor de IC₅₀ (439 nM) encontrado em nossos isolados não foi reportado anteriormente, visto que dados da literatura mostram IC₅₀ de no máximo 90 nM (O Rogers et al, 2009).

Foi observado que 14 isolados apresentaram crescimento mesmo na concentração mais alta de AS, de 100 nM. Os intervalos entre as concentrações utilizadas neste estudo foram adotados com base no menor e maior valor encontrado na literatura. Diferentemente do comportamento destes 14 isolados frente ao AS, a resposta frente à DHA, metabólito ativo dos derivados de artemisinina, não mostrou crescimento parasitário nas maiores concentrações. Embora não esteja estabelecido o limiar que define sensibilidade e resistência às artemisininas, parece adequado que concentrações maiores de AS sejam adotadas nos testes *ex vivo* e *in vitro*, de modo a obter-se a faixa que possibilite o cálculo acurado do IC₅₀. Com relação à LMF, droga parceira utilizada mundialmente com o ATM, é preocupante que quatro amostras tenham apresentado crescimento de esquizontes até a maior concentração, de 200 nM.

Com relação à reposição das drogas durante a incubação, 24 isolados receberam pressão dos fármacos unicamente durante 24 horas, exceto a amostra S-01/15, que além de ter sido pressionada por 24 horas recebeu tratamentos com os antimaláricos até 72 horas de incubação. A comparação com diferentes períodos de incubação dos parasitos com as drogas em estudo não resultou em aumento da sensibilidade, visto que o isolado S-01/15 apresentou o fenômeno de dormência mesmo na concentração mais alta, de 1.000 nM de DHA.

Neste estudo, a citometria de fluxo foi padronizada com Rodamina 123 e DAPI, com o objetivo de comparar os resultados com a leitura por hemoscopia, método

clássico de avaliação de sensibilidade a antimaláricos. Os resultados mostraram que quando a microscopia apontou para uma ação da droga, medida pela ausência de esquizontes após incubação *in vitro*, a citometria indicou a viabilidade dos trofozoítos jovens presentes, mesmo nas maiores concentrações da droga em questão.

Uma limitação deste estudo foi o número de amostras coletadas para realização dos testes de sensibilidade às quatro drogas (DHA, LMF, AS, MFQ), que constituem a primeira opção para o tratamento de *P. falciparum* mundialmente. Embora tenham sido ensaiadas somente 25 amostras, este estudo é um *base-line* da sensibilidade de *P. falciparum* às ACTs em isolados que, embora originários de outros países, circulam em território brasileiro, podendo fazer parte da transmissão em áreas com presença do vetor. É necessário ressaltar a importância da comprovação do fenômeno de dormência em isolados clínicos deste estudo, visto que na literatura os dados disponíveis referem-se a isolados de referência, adaptados ao cultivo contínuo. Além disso, a descrição inédita do fenômeno de dormência no isolado de referência frente à LMF, traz um forte alerta aos programas de controle, visto que esta droga foi proposta como parceira do ATM com o objetivo de retardar o aparecimento de resistência aos ACTs.

6 CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. Foi determinado o comportamento de *P. falciparum* frente aos esquemas terapêuticos de primeira linha para malária (DHA, LMF, AS, MFQ), mediante a avaliação da sensibilidade *ex-vivo* e *in vitro* e determinação das concentrações inibitórias (IC₅₀);
2. Foi confirmado o fenômeno de dormência *in vitro* em isolado de referência (NF54) frente à DHA e LMF e em isolado clínico de *P. falciparum* frente à DHA;
3. Foi determinada a duração do fenômeno de dormência *in vitro* após tratamento com DHA e LMF e recrudescência *in vitro*.
4. Foi validado o uso da citometria de fluxo para avaliar a viabilidade parasitária após pressão com os antimaláricos DHA e LMF.

7. ANEXOS

ANEXO A. Termo de consentimento livre e esclarecido de HCFMUSP

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:.....
.....DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:..... SEXO: M ☐
F ☐ DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO:.....
Nº:..... APTO:..... BAIRRO:.....
CIDADE:..... CEP:..... FONE:DDD(.....)
2. RESPONSÁVEL
LEGAL:.....
..... NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador
etc.):..... DOCUMENTO DE
IDENTIDADE Nº:..... SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO:
...../...../.....
ENDEREÇO:.....
Nº:..... APTO:.....
BAIRRO:..... CIDADE:.....
CEP:..... FONE:DDD(.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Comportamento de *Plasmodium falciparum* frente aos esquemas terapêuticos de primeira linha para malária: avaliação da

sensibilidade *in vitro* e do mecanismo de dormência das terapias combinadas com artemisinina.

PESQUISADOR: Silvia Maria Di Santi CARGO: Pesquisador Científico INSCRIÇÃO
CRBio: 01078-01

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO (x) RISCO MÉDIO () RISCO BAIXO ()
RISCO MAIOR ()

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 48 meses.

1 – Estas informações estão sendo fornecidas para convidá-lo (a) a participar de modo voluntário neste estudo, que quer avaliar o comportamento dos parasitos que ocasionam a malária frente aos medicamentos utilizados no tratamento desta doença. O estudo vai coletar amostras sanguíneas de pacientes infectados com malária por *P. falciparum* em Santarém, PA e São Paulo, SP, entre os anos 2015 e 2017.

2 – Alguns exames são diferentes daqueles usados para diagnóstico de malária como rotina, e os resultados somente serão conhecidos no final do estudo.

3 – Será coletado um tubo de sangue da veia do antebraço contendo 5 mL (aproximadamente uma colher de sopa rasa) e todo o material utilizado é descartável.

4 – O senhor (a) sentirá o desconforto da picada da agulha no momento da coleta do sangue, que será realizada por profissional capacitado; em poucos casos, pode ocorrer desmaio, mancha roxa e inchaço no local da picada, que desaparecem sozinhos.

5 – Embora não haja benefício direto para o participante, no final do estudo poderemos concluir se houve benefício para o tratamento futuro dos pacientes com malária por *P. falciparum*.

6 – Não há outro procedimento que possa ser vantajoso para o senhor (a) optar quanto à coleta de sangue.

7 – Em qualquer etapa do estudo o senhor (a) poderá entrar em contato com a profissional responsável pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas, que é

a Dra. Silvia M. Di Santi, que pode ser encontrada na Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, 1º andar, Núcleo de Estudos em Malária, tel. 3061-7019 ou 3081-8039. Se o senhor (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com a Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP, Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar, tel: 2661-6442 ramais 16, 17 ou 18, FAX: 2661-6442 ramal 26, e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu acompanhamento na Instituição. Neste caso, sua amostra será destruída.

9 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum.

10 – O senhor (a) terá o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa.

11 – Não há despesas pessoais para o senhor (a) em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há pagamento financeiro por sua participação.

12 – Esta amostra será utilizada para este estudo. O armazenamento de sua amostra de sangue para uso em outros projetos no futuro, bem como os resultados deste trabalho seriam úteis para realizar pesquisas sobre outros assuntos que sejam interessantes para conhecer melhor a doença, sem necessidade de colher novas amostras, mesmo que seja daqui a muitos anos. Sua amostra será guardada em um Biorrepositório, no Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN/Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, de forma segura e adequada, sob a responsabilidade da Dra. Silvia Maria Di Santi. O senhor (a) pode concordar ou não que a amostra seja armazenada para estudos posteriores, com a garantia que estes estudos serão submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa. Se o senhor (a) não concordar com o armazenamento, sua amostra será descartada. Para escolher, indique uma das alternativas abaixo:

Não concordo Concordo

Há necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas?

(....) SIM. Eu quero ser consultado para autorizar ou não cada pesquisa futura com o meu material.

(....) NÃO. Eu dispenso a autorização para cada pesquisa e estou informado (a) que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando. O tempo de armazenamento do material será autorizado pela CAPPesq.

13 – Em caso de morte, seus familiares ou outros que o senhor (a) indicar poderão decidir sobre o destino do material armazenado:

14 – O estudo é considerado de risco mínimo, porém o senhor (a) será indenizado (a) por quaisquer danos decorrentes da pesquisa.

15 – Este Termo de Consentimento é redigido em duas vias, sendo que uma fica com o pesquisador responsável e a outra será entregue ao senhor (a).

“Estou ciente das informações que li ou que foram lidas para mim, sobre o estudo “Comportamento de *Plasmodium falciparum* frente aos esquemas terapêuticos de primeira linha para malária: avaliação da sensibilidade *in vitro* e do mecanismo de dormência das terapias combinadas com artemisinina”. Eu discuti com pelo menos um dos responsáveis sobre minha decisão em participar do estudo. Ficaram claros para mim seus propósitos, os procedimentos a serem realizados, desconfortos e riscos, garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro que minha participação é isenta de despesas e que tenho acesso a tratamento hospitalar quando necessário, com o compromisso do responsável que terei assistência e acompanhamento por danos decorrentes da pesquisa. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento,

sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço”.

Assinatura do paciente/representante legal

Data / /

Assinatura da testemunha

Data / /

Para casos de pacientes analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data / /

ANEXO B. Termo de consentimento livre e esclarecido de IIER

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1.NOME:.....

.....DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:..... SEXO: M ☐

F ☐ DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO:.....

Nº:..... APTO:..... BAIRRO:.....

CIDADE:..... CEP:..... FONE:DDD(.....)

2.RESPONSÁVEL

LEGAL:.....

..... NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):..... DOCUMENTO DE

IDENTIDADE Nº:..... SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO:.....

Nº:..... APTO:.....

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:.....FONE:DDD(.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Comportamento de *Plasmodium falciparum* frente aos esquemas terapêuticos de primeira linha para malária: avaliação da sensibilidade *in vitro* e do mecanismo de dormência das terapias combinadas com artemisinina.

PESQUISADOR: Silvia Maria Di Santi CARGO: Pesquisador Científico INSCRIÇÃO
CRBio: 01078-01

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO (x) RISCO MÉDIO () RISCO BAIXO ()
RISCO MAIOR ()

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 48 meses.

1 – Estas informações estão sendo fornecidas para convidá-lo (a) a participar de modo voluntário neste estudo, que quer avaliar o comportamento dos parasitos que ocasionam a malária frente aos medicamentos utilizados no tratamento desta doença. O estudo vai coletar amostras sanguíneas de pacientes infectados com malária por *P. falciparum* em Santarém, PA e São Paulo, SP, entre os anos 2015 e 2017.

2 – Alguns exames são diferentes daqueles usados para diagnóstico de malária como rotina, e os resultados somente serão conhecidos no final do estudo.

3 – Será coletado um tubo de sangue da veia do antebraço contendo 5 mL (aproximadamente uma colher de sopa rasa) e todo o material utilizado é descartável.

4 – O senhor (a) sentirá o desconforto da picada da agulha no momento da coleta do sangue, que será realizada por profissional capacitado; em poucos casos, pode ocorrer desmaio, mancha roxa e inchaço no local da picada, que desaparecem sozinhos.

5 – Embora não haja benefício direto para o participante, no final do estudo poderemos concluir se houve benefício para o tratamento futuro dos pacientes com malária por *P. falciparum*.

6 – Não há outro procedimento que possa ser vantajoso para o senhor (a) optar quanto à coleta de sangue.

7 – Em qualquer etapa do estudo o senhor (a) poderá entrar em contato com a profissional responsável pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas, que é a Dra. Silvia M. Di Santi, que pode ser encontrada na Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, 1º andar, Núcleo de Estudos em Malária, tel. 3061-7019 ou 3081-8039. Se o

senhor (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, Av. Dr. Arnaldo, 165 - Cerqueira Cesar - CEP 01246900 Tel. 3896-1406.

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu acompanhamento na Instituição. Neste caso, sua amostra será destruída. Da mesma forma o Sr. (a) pode se recusar a participar sem nenhum prejuízo para o seu seguimento no Instituto.

9 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum.

10 – O senhor (a) terá o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa.

11 – Não há despesas pessoais para o senhor (a) em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há pagamento financeiro por sua participação.

12 – Esta amostra será utilizada para este estudo. O armazenamento de sua amostra de sangue para uso em outros projetos no futuro, bem como os resultados deste trabalho seriam úteis para realizar pesquisas sobre outros assuntos que sejam interessantes para conhecer melhor a doença, sem necessidade de colher novas amostras. Sua amostra será guardada em um Biorrepositório, por cinco anos, no Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN/Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, de forma segura e adequada, sob a responsabilidade da Dra. Silvia Maria Di Santi, na Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, 1º andar, sala 107, CEP 05403-000, São Paulo, SP. O senhor (a) pode concordar ou não que a amostra seja armazenada para estudos posteriores, com a garantia que estes estudos serão submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa. Se o senhor (a) não concordar com o armazenamento, sua amostra será descartada. Para escolher, indique uma das alternativas abaixo:

Não concordo Concordo

Há necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas?

(....) SIM. Eu quero ser consultado para autorizar ou não cada pesquisa futura com o meu material.

(....) NÃO. Eu dispenso a autorização para cada pesquisa e estou informado (a) que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.

13 – Em caso de morte, seus familiares ou outros que o senhor (a) indicar poderão decidir sobre o destino do material armazenado:

14 – O estudo é considerado de risco mínimo, porém o senhor (a) será indenizado (a) por quaisquer danos decorrentes da pesquisa.

15 – Este Termo de Consentimento é redigido em duas vias, sendo que uma fica com o pesquisador responsável e a outra será entregue ao senhor (a).

“Estou ciente das informações que li ou que foram lidas para mim, sobre o estudo “Comportamento de *Plasmodium falciparum* frente aos esquemas terapêuticos de primeira linha para malária: avaliação da sensibilidade in vitro e do mecanismo de dormência das terapias combinadas com artemisinina”. Eu discuti com pelo menos um dos responsáveis sobre minha decisão em participar do estudo. Ficaram claros para mim seus propósitos, os procedimentos a serem realizados, desconfortos e riscos, garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro que minha participação é isenta de despesas e que tenho acesso a tratamento hospitalar quando necessário, com o compromisso do responsável que terei assistência e acompanhamento por danos decorrentes da pesquisa. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço”.

Para casos de pacientes analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

108

8. REFERÊNCIAS

Asawamahasakda W, Ittarat I, Pu YM, Ziffer H, Meshnick SR. Reaction of antimalarial endoperoxides with specific parasite proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1854-8.

Baird JK. Resistance to therapies for infection by *Plasmodium vivax*. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 508-34.

Boudreau EF, Webster HK, Pavanand K, Thosingha L. Type II mefloquine resistance in Thailand. *Lancet* 1982; 2: 1335.

Boulos M, Di Santi SM, Barata LCB, Segurado AAC, Dutra AP, Camargo Neves VLF. Some aspects of treatment, prophylaxis and chemoresistance of *Plasmodium falciparum* malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986; 81: 255-7.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Terapêutica da Malária. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública-Sucam 6ª. ed. Brasília, 2001.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia Prático de Tratamento da Malária no Brasil. Serie A Normas e Manuais Técnicos 1ª. ed. Brasília, 2010.

Brasil. Ministério da Saúde/SVS/SIVEP-MALÁRIA. Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica. Resumo Epidemiológico Nacional Mensal 2016a. Disponível em: <http://dw.saude.gov.br/gsid/servlet/mstrWeb?evt=2048001&documentID=AC2B0F5041CEE8C671FA39D5337A697&server=srvbipdf03&project=DMMalaria&uid=convidado&pwd=datasus&hiddensections=header,path,dockTop,dockLeft,footer>.

Brasil. Ministério da Saúde/SVS/SINAN NET. MALÁRIA - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net 2016b. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/malaria/bases/malabrnet.def>.

Brasil. Ministério da Saúde/SVS/SIVEP-MALÁRIA. Portal da Saúde. Informações Técnicas 2016c. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11343-informacoes-tecnicas>.

Burrows J. Microbiology: Malaria runs rings round artemisinin. *Nature* 2015; 520: 628-30.

Bustamante C, Folarin OA, Gbotosho GO, Batista CN, Mesquita EA, Brindeiro RM, Tanuri A, Struchiner CJ, Sowunmi A, Oduola A, Wirth DF, Zalis MG, Happi CT. *In vitro*-reduced susceptibility to artemether in *P. falciparum* and its association with polymorphisms on transporter genes. *J Infect Dis* 2012; 206:324-32.

China Cooperative Research Group. On qinghaosu and its derivatives as anti-malarials. *Trad Chin Med* 1982; 2: 3-8.

Codd A, Teuscher F, Kyle DE, Cheng Q, Gatton ML. Artemisinin-induced parasite dormancy: a plausible mechanism for treatment failure. *Malar J* 2011; 10: 56.

Cox-Singh J, Davis TME, Lee KS, Shasul SSG, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B. *Plasmodium knowlesi* malaria in human is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 165-71.

Creek DJ, Charman WN, Chiu FCK, Pranker RJ, Dong Y, Vennerstrom JL, Charman SA. Relationship between antimalarial activity and heme alkylation for spiro- and dispiro-1,2,4-trioxolane antimalarials. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1291-6.

Dahlström S, Veiga MI, Ferreira P, Mårtensson A, Kaneko A, Andersson B, Björkman A, Gil JP. Diversity of the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase orthologue of *Plasmodium falciparum* (PfATP6). *Infect Genet Evol* 2008; 8: 340-5.

Di Santi SM, Boulos M. Protozoários – Malária. In *Parasitologia humana e seus Fundamentos Gerais*. (Ed. B. Cimerman and S. Cimerman), São Paulo: Atheneu; 1999; 375pp.

Di Santi SM, Camargo Neves VL, Boulos M, Dutra AP, Ramos AM, Santos M, Barata LC. Evaluation of the *Plasmodium falciparum* response to chloroquine, quinine and mefloquine. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1988; 30:147-52.

Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyto 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: 455-67.

Eastman RT, Fidock DA. Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 864-74.

Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, Van Goethem ID, East JM, Lee AG, Kimura M, O'Neill PM, Bray PG, Ward SA, Krishna S. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2003; 424: 957-61.

Ezzet F, Mull R, Karbwang J. Population pharmacokinetics and therapeutic response of CGP 56697 (artemether + benflumetol) in malaria patients. *Br J Clin Pharmacol* 1998; 46: 553-61.

Ezzet F, van Vugt M, Nosten F, Looareesuwan S, White NJ. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of lumefantrine (benflumetol) in acute falciparum malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 697-704.

Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar J* 2016; 15: 284.

Fitch CD. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life Sci* 2004; 74: 1957-72.

German P, Aweeka F. Clinical pharmacology of artemisinin-based combination therapies. *Clin. Pharmacokinet* 2008; 47: 91-102.

Golenser J, Waknine JH, Krugliak M, Hunt NH, Grau GE. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. *Int J Parasitol* 2006; 36: 1427-41.

Gomez JE, Mc Kinney JD. *M. tuberculosis* persistence, latency and drug tolerance. *Tuberculosis (Edinb)* 2004; 84: 29-44.

Hartwig CL, Rosenthal AS, D'Angelo J, Griffin CE, Posner GH, Cooper RA. Accumulation of artemisinin trioxane derivatives within neutral lipids of *Plasmodium falciparum* malaria parasites is endoperoxide-dependent. *Biochem Pharmacol* 2009; 77: 322-36.

Hoshen MB, Na-Bangchang K, Stein WD, Ginsburg H. Mathematical modelling of the chemotherapy of *Plasmodium falciparum* malaria with artesunate: postulation of 'dormancy', a partial cytostatic effect of the drug, and its implication for treatment regimens. *Parasitology* 2000; 121: 237-46.

Jambou R, Legrand E, Niang M, Khim N, Lim P, Volney B, Ekala MT, Bouchier C, Esterre P, Fandeur T, Mercereau-Puijalon O. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to *in vitro* artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet* 2005; 366: 1960-3.

Kannan R, Kumar K, Sahal D, Kukreti S, Chauhan VS. Reaction of artemisinin with haemoglobin: implications for antimalarial activity. *Biochem J* 2005; 385: 409-18.

Klayman DL. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science* 1985; 228: 1049-55.

Krungkrai SR, Yuthavong Y. The antimalarial action on *Plasmodium falciparum* of qinghaosu and artesunate in combination with agents which modulate oxidant stress. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 710-4.

Kyle DE, Webster HK. Postantibiotic effect of quinine and dihydroartemisinin on *Plasmodium falciparum* *in vitro*: implications for a mechanism of recrudescence. In: Abstracts of the XIVth International Congress for Tropical Medicine and Malaria. 1996. Abstract 0-22-6.

Makanga M, Bassat Q, Falade CO, Premji ZG, Krudsood S, Hunt P, Walter V, Beck HP, Marrast AC, Cousin M, Rosenthal PJ. Efficacy and safety of artemether-lumefantrine in the treatment of acute, uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: a pooled analysis. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 85: 793-804.

Mårtensson A, Strömberg J, Sisowath C, Msellem MI, Gil JP, Montgomery SM, Olliaro P, Ali AS, Björkman A. Efficacy of artesunate plus amodiaquine versus that of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated childhood *Plasmodium falciparum* malaria in Zanzibar, Tanzania. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1079-86.

Mbengue A, Bhattacharjee S, Pandharkar T, Liu H, Estiu G, Stahelin RV, Rizk SS, Njimoh DL, Ryan Y, Chotivanich K, Nguon C, Ghorbal M, Lopez-Rubio JJ, Pfrender M, Emrich S, Mohandas N, Dondorp AM, Wiest O, Haldar K. A molecular mechanism of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 2015; 520: 683-7.

Muckenhaupt FP. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today* 1995; 11: 248-53.

Mungthin M, Suwandittakul N, Chaijaroenkul W, Rungsrihirunrat K, Harnyuttanakorn P, Seugorn A, Na Bangchang K. The patterns of mutation and amplification of *Plasmodium falciparum* pfcrt and pfmdr1 genes in Thailand during the year 1988 to 2003. *Parasitol Res* 2010; 107: 539-45.

Nakazawa S, Kanbara H, Aikawa M. *Plasmodium falciparum*: recrudescence of parasites in culture. *Exp Parasitol* 1995; 81: 556-63.

Nakazawa S, Maoka T, Uemura H, Ito Y, Kanbara H. Malaria parasites giving rise to recrudescence *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 958-65.

Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med* 2008; 359: 2619-20.

Noedl H, Socheat D, Satimai W. Artemisinin-resistant malaria in Asia. *N Engl J Med* 2009; 361: 540-1.

Nzila A, Okombo J, Ohuma E, Al-Thukair A. Update on the *in vivo* tolerance and in vitro reduced susceptibility to the antimalarial lumefantrine. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 2309-15.

OPAS. Pan American Health Organization. Interactive malaria statistics. Washington DC: PAHO; 2016. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=view&id=2632&Itemid=2130. Acessado em 1 Fev 2016.

Paloque L, Ramadani AP, Mercereau-Puijalon O, Augereau JM, Benoit-Vical F. *Plasmodium falciparum*: multifaceted resistance to artemisinins. *Malar J* 2016; 15: 149.

Pascual A, Parola P, Benoit-Vical F, Simon F, Malvy D, Picot S, Delaunay P, Basset D, Maubon D, Faugère B, Ménard G, Bourgeois N, Oeuvray C, Didillon E, Rogier C, Pradines B. *Ex vivo* activity of the ACT new components pyronaridine and piperaquine in comparison with conventional ACT drugs against isolates of *Plasmodium falciparum*. *Malar J* 2012; 11:45.

Peterson DS, Di Santi SM, Pova M, Calvosa VS, Do Rosario VE, Wellems TE. Prevalence of the dihydrofolate reductase Asn-108 mutation as the basis for pyrimethamine-resistant falciparum malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 45: 492-7.

Pillai DR, Lau R, Khairnar K, Lepore R, Via A, Staines HM, Krishna S. Artemether resistance in vitro is linked to mutations in PfATP6 that also interact with mutations in PfMDR1 in travellers returning with *Plasmodium falciparum* infections. *Malar J* 2012; 11: 131.

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

Price RN, Nosten F, Luxemburger C, ter Kuile F, Paiphun L, Chongsuphajaisiddhi T, White N. Effects of artemisinin derivatives on malaria transmissibility. *Lancet* 1996; 347: 1654-8.

Price RN, Uhlemann AC, van Vugt M, Brockman A, Hutagalung R, Nair S, Nash D, Singhasivanon P, Anderson TJ, Krishna S, White NJ, Nosten F. Molecular and pharmacological determinants of the therapeutic response to artemether-lumefantrine in multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 1570-7.

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.

Rieckmann KH, Campbell GH, Sax LJ, Mrema JE. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An *in-vitro* microtechnique. *Lancet* 1978; 1: 22-3.

Rogers WO, Sem R, Tero T, Chim P, Lim P, Muth S, Socheat D, Arie F, Wongsrichanalai C. Failure of artesunate-mefloquine combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in southern Cambodia. *Malar J* 2009; 8: 10.

Roper C, Pearce R, Nair S, Sharp B, Nosten F, Anderson T. Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria. *Science* 2004; 305: 1124.

Sharma VP. Re-emergence of malaria in India. *Indian J Med Res* 1996; 103: 26-45.

Sidhu AB, Uhlemann AC, Valderramos SG, Valderramos JC, Krishna S, Fidock DA. Decreasing *pfmdr1* copy number in *Plasmodium falciparum* malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. *J Infect Dis* 2006; 194: 528-35.

Sisowath C, Ferreira PE, Bustamante LY, Dahlström S, Mårtensson A, Björkman A, Krishna S, Gil JP. The role of *pfmdr1* in *Plasmodium falciparum* tolerance to artemether-lumefantrine in Africa. *Trop Med Int Health* 2007; 12: 736-42.

Sisowath C, Petersen I, Veiga MI, Mårtensson A, Premji Z, Björkman A, Fidock DA, Gil JP. In vivo selection of *Plasmodium falciparum* parasites carrying the chloroquine-susceptible *pfcr* K76 allele after treatment with artemether-lumefantrine in Africa. *J Infect Dis* 2009; 199: 750-7.

Sisowath C, Strömberg J, Mårtensson A, Msellem M, Obondo C, Björkman A, Gil JP. In vivo selection of *Plasmodium falciparum* *pfmdr1* 86N coding alleles by artemether-lumefantrine (Coartem®). *J Infect Dis* 2005; 191: 1014-7.

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

Taylor SM, Juliano JJ, Meshnick SR. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 2009; 361: 1807.

Teuscher F, Gatton ML, Chen N, Peters J, Kyle DE, Cheng Q. Artemisinin-induced dormancy in *Plasmodium falciparum*: duration, recovery rates, and implications in treatment failure. *J Infect Dis* 2010; 202: 1362-8.

Thapar MM, Gil JP, Bjorkman A. *In vitro* recrudescence of *Plasmodium falciparum* parasites suppressed to dormant state by atovaquone alone and in combination with proguanil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005; 99: 62-70.

Valderramos SG, Fidock DA. Transporters involved in resistance to antimalarial drugs. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27: 594-601.

Wells TN, Alonso PL, Gutteridge WE. New medicines to improve control and contribute to the eradication of malaria. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8: 879-91.

White NJ. Qinghaosu (artemisinin): the price of success. *Science* 2008; 320: 330-4.

WHO. Artemisinin and artemisinin-based combination therapy resistance. Geneva: World Health Organization; 2016.

WHO. Practical chemotherapy of malaria. *WHO Tech Rep Ser* 805. Geneva: WHO, 1990; 141 p.

WHO. World Malaria Report 2015. World Health Organization 2015a; 181 p.

WHO. Status report on artemisinin and ACT resistance. Geneva: World Health Organization; 2015b.

Witkowski B, Berry A, Benoit-Vical F. Resistance to antimalarial compounds: methods and applications. *Drug Resist Update* 2009; 12: 42-50.

Witkowski B, Lelièvre J, Barragán MJ, Laurent V, Su XZ, Berry A, Benoit-Vical F. Increased tolerance to artemisinin in *Plasmodium falciparum* is mediated by a quiescence mechanism. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 1872-7.

Witkowski B, Amaratunga C, Khim N, Sreng S, Chim P, Kim S, Lim P, Mao S, Sopha C, Sam B, Anderson JM, Duong S, Chuor CM, Taylor WR, Suon S, Mercereau-Puijalon O, Fairhurst RM, Menard D. Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: *in-vitro* and *ex-vivo* drug-response studies. *Lancet Infect Dis* 2013; 13: 1043-9.

Woodrow CJ, Krishna S. Antimalarial drugs: recent advances in molecular determinants of resistance and their clinical significance. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 1586-96.

Wootton JC, Feng X, Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, Baruch DI, Magill AJ, Su XZ. Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2002; 418: 320-3.

Wu Y. How might qinghaosu (artemisinin) and related compounds kill the intraerythrocytic malaria parasite? A chemist's view. *Acc Chem Res* 2002; 35: 255-9.

Zatra R, Lekana-douki JB, Lekoulou F, Bisvigou U, Ngoungou EB, Ndouo FS. *In vitro* antimalarial susceptibility and molecular markers of drug resistance in Franceville, Gabon. *BMC Infect Dis* 2012; 12: 307.