JULIANA INOUE

Marcadores moleculares para análise do polimorfismo genético relacionado à resposta de *Plasmodium falciparum* aos antimaláricos

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

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Inoue, Juliana
Marcadores moleculares para análise do polimorfismo genético relacionado à resposta de *Plasmodium falciparum* aos antimaláricos / Juliana Inoue. -- São Paulo, 2014.
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.Resistência a medicamentos 4.Antimaláricos 5.Marcadores genéticos 6.Polimorfismo genético

USP/FM/DBD-079/14

Aos meus pais, Clara e João, que sempre me apoiaram incondicionalmente, por todos os valores, carinho e amor que recebi e por considerarem fundamental meus estudos e educação. A eles devo a conquista de mais uma etapa na minha vida.

Ao meu irmão, Henrique, amigo e parceiro.

*Ao meu "Ditian", Tadao Inoue (*in memmorian*).*

A todos aqueles a quem a malária ainda causa dor e sofrimento.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não seria possível sem a contribuição de diversas pessoas a quem gostaria de expressar minha enorme gratidão:

À minha orientadora, Dra. Silvia Di Santi, pela dedicação, incentivo e confiança depositados, por dividir seus conhecimentos sobre malária e sempre nos lembrar de que nosso trabalho é para o paciente.

À Dra. Dinora Lopes, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical/UNL, pelo apoio em todas as etapas deste estudo e pela receptividade durante o estágio no IHMT/UNL.

Ao Prof. Virgílio do Rosário, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical/UNL por viabilizar o estágio no IHMT/UNL e pelas contribuições ao longo do trabalho.

Ao Prof. Pedro Cravo, pela colaboração neste estudo e auxílio na análise dos resultados.

Ao Prof. Aluísio Segurado, meu orientador acadêmico durante o primeiro ano e por todo apoio e solicitude demonstrados enquanto coordenador do Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Ao Prof. Marcos Boulos, coordenador do NUMETROP, por propiciar minha estadia em Santarém durante a coleta de amostras.

À Dra. Camila Romano, pelo auxílio na análise das sequências de DNA e pelas sugestões no Exame de Qualificação.

Ao Dr. André Tempone e à Dra. Sandra Lago pelas contribuições e sugestões no Exame de Qualificação.

Às companheiras de laboratório, Giselle Lima e Angélica Hristov, pelo apoio constante na execução deste estudo e pela amizade e companheirismo.

Às funcionárias do Núcleo de Estudos em Malária/SUCEN, Christina, Dida, Lia, Maria Silvia e Morgana, por todo apoio durante a realização deste trabalho, risadas e bons momentos de convivência.

À Catarina Alves, Marta Machado e Cristina Mendes, pelo auxílio durante o estágio no IHMT/UNL.

Ao Dr. Paulo Abati e ao biólogo Alberto Soares pelo apoio nas coletas realizadas no Pará.

À equipe do Laboratório de Malária do Hospital Municipal de Santarém, Sr. “Tibinga”, Francisco Silva, Nelson, Francisco Lopes, Paulo, Antônio, Anselmo, José Ricardo e Isidoro, pelo auxílio nas coletas em Santarém e pelas longas conversas sobre a malária nesta região.

À equipe de malária do Serviço de Endemias do Município de Alenquer, Dedê, Jonilson, Maria, Raimundo, Fagner, Pablo, Antônio Maia, Xeréu, Antônio Ximendes e Raimunda, pelo auxílio nas coletas em Alenquer, pela hospitalidade e por me mostrarem a beleza da região Amazônica.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Roseli Antônia Santo, pelo apoio ao longo destes quatro anos.

Aos funcionários do IMTSP/USP, pelo suporte ao longo destes anos.

Ao “XV Seminário Laveran & Deane” pelas contribuições na versão inicial do projeto.

A CAPES e ao CNPq pela bolsa de estudos concedida durante a pós-graduação.

A toda minha família e amigos pelo apoio e incentivo durante esta jornada.

A todos os pacientes que aceitaram participar deste estudo.

Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2011/07380-8, da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) e do Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP/CAPES).

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.”

Albert Einstein

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

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 figuras
Lista de tabelas
Lista de quadros
Lista de abreviaturas
Lista de símbolos dos aminoácidos
Resumo
Abstract

INTRODUÇÃO 01
1. Malária: histórico 02
2. Características gerais da malária 03
3. Diagnóstico 04
4. Ciclo biológico do *Plasmodium* 05
5. Epidemiologia da malária no mundo 08
6. Epidemiologia da malária no Brasil 10
7. Tratamento e antimaláricos 13
8. Resistência 21
9. Genes relacionados à resistência 30
   9.1. *pfcrt* 31
   9.2. *pfmdr1* 33
   9.3. *pfmrp* e *pfnhe* 36
   9.4. *pfdhfr* e *pfdhps* 36
   9.5. *pfATPase6* e *pfAP2-µ* 38

OBJETIVOS 40
1. Geral 41
2. Específicos 41

MATERIAL E MÉTODOS 42
1. Local de realização do estudo 43

2. Amostras 44
2.1. Amostras retrospectivas 44
2.2. Amostras prospectivas 44
3. Aspectos éticos do estudo 45
4. Seguimento dos pacientes 45
5. Identificação microscópica da espécie de *Plasmodium* 46
6. Identificação molecular da espécie de *Plasmodium* 46
6.1. Extração de DNA de papel filtro 46
6.2. Extração de DNA de cartão FTA® Elute 47
6.3. *Nested* PCR 47
6.4. Eletroforese 49
7. Análise de polimorfismos relacionados à resistência através de técnicas moleculares 49
7.1. Genes 49
7.2. PCR-RFLP 50
7.3. Eletroforese 53
7.4. PCR tempo real 54
7.5. Sequenciamento 56
8. Testes *in vitro* 60
9. Análise estatística 60

RESULTADOS 61
1. Amostragem 62
2. Identificação molecular da espécie de *Plasmodium* 64
3. Acompanhamento dos pacientes 64
4. Genotipagem 66
4.1. *pfcrt* – códon 76 66
4.2. *pfmdr1* – códons 86 e 1246 66
4.3. *pfdhfr* – códons 51, 59 e 108 e *pfdhps* – códons 437 e 540 69
4.4. *pfATPAase6* – códon 769 72
5. Número de cópias de *pfmdr1* 73
6. Fenotipagem por microtestes *in vitro* 73

7. Resposta *in vitro* à cloroquina *versus* análise molecular de *pfcrt*..... 74
8. Resposta *in vitro* ao quinino e à mefloquina *versus* análise molecular de *pfmdr1*..... 74
9. Resposta *in vivo* ao quinino e à mefloquina *versus* análise molecular de *pfmdr1*..... 75
10. Análise estatística 75
11. Sequenciamento dos gene *pfATPase6* e *pfAP2-µ*..... 76

DISCUSSÃO 80
1. Análise do gene *pfcrt* e resposta *in vitro* à cloroquina..... 81
2. Análise do gene *pfmdr1* e respostas *in vitro* e *in vivo* ao quinino e à mefloquina 83
3. Análise dos genes *pfdhfr* e *pfdhps*..... 86
4. Análise do gene *pfATPase6*..... 88
5. Análise do gene *pfAP2-µ* 90

CONCLUSÕES 94

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 96

ANEXOS 115

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do *Plasmodium*..... 07

Figura 2 - Liberação dos merozoítos de *Plasmodium* na corrente sanguínea via formação de merossomos, dando início ao ciclo eritrocítico 08

Figura 3 - População sob-risco de contrair malária no mundo, 2013, de acordo com o nível de endemicidade 10

Figura 4 - Número de casos de malária notificados na Região Amazônica brasileira e diferença percentual entre 2011 e 2013 11

Figura 5 - Distribuição do vetor *Anopheles darlingi* no Brasil, 2012 11

Figura 6 - Série histórica de casos de malária no Brasil, mostrando o total de casos (—), casos de *P. vivax* (—) e *P. falciparum* (—) . A seta indica a implantação do tratamento com ACTs (*artemisinin-based combination therapy*) e redução de casos de *P. falciparum* 13

Figura 7 - Antimaláricos utilizados para tratamento de malária por *P. falciparum* no Brasil, em 2011. "Inadequado" inclui tratamento com cloroquina 13

Figura 8 - Países em que as ACTs são recomendadas como primeira linha de tratamento para *P. falciparum*..... 16

Figura 9 - Representação de forma sanguínea assexuada de *Plasmodium falciparum* e sítios-alvos propostos para vários antimaláricos 21

Figura 10 - Origem e dispersão de cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina 28

Figura 11 - Topologia e função da proteína PfCRT. (A) Modelo topológico de PfCRT. As setas pretas indicam aminoácidos polimórficos. A substituição de lisina por treonina encontrada em parasitos

resistentes é indicada pela seta vermelha. (B) Substratos propostos de PfCRT. Esta proteína parece transportar drogas para fora do vacúolo digestivo onde são acumuladas. CQ, cloroquina; QN, quinino; MQ, mefloquina; PQ, primaquina. Verapamil (Ver) bloqueia o transporte de drogas mediado por PfCRT 32

Figura 12 - Topologia e função da proteína PfMDR1. (A) Modelo topológico de PfMDR1. Setas em preto indicam aminoácidos polimórficos associados à resposta alterada de *P. falciparum* a antimaláricos. DL, domínio ligante. (B) Substratos propostos de PfMDR1. PfMDR1 parece bombear compostos, incluindo fluorocromos (Fluo-4, Fluo-4 AM) para dentro do vacúolo digestivo. CQ, cloroquina; QN, quinino; MQ, mefloquina; HF, halofantrina; ART, artemisinina..... 35

Figura 13 - Mapa do Estado do Pará destacando em azul escuro o município de Alenquer e em azul claro Santarém, que pertencem ao 9º Centro Regional de Saúde de Santarém (área em verde) 43

Figura 14 - Coleta de amostras. (A) coleta em papel filtro através de punção digital. (B) papel filtro e cartão FTA® Elute com amostras de sangue coletadas 45

Figura 15 - Ilustração esquemática dos fragmentos (em azul) amplificados por PCR para sequenciamento do gene *pfATPase6*, indicando a posição de início e término de cada fragmento no gene. As setas em verde indicam *primers* senso e em vermelho os *primers* antisenso 56

Figura 16 - Ilustração esquemática dos fragmentos (em azul) amplificados por PCR para sequenciamento do gene *pfAP2-μ*, indicando a posição de início e término de cada fragmento no gene. As setas em verde indicam *primers* senso e em vermelho os *primers* antisenso. O *primer* 1F hibridiza em local anterior ao início do gene (fragmento em rosa)..... 56

Figura 17 - Número de pacientes que responderam adequadamente ao tratamento (A) e número de pacientes que apresentaram recrudescência (B) durante o período de acompanhamento. ART, artemeter; ART-MFQ, artemeter e mefloquina; ATS-CLD, artesunato e clindamicina; ATS-MFQ, artesunato mais mefloquina; ATS-QN, artesunato e quinino; DOX, doxiciclina; MFQ, mefloquina; QN, quinino; QN-TT, quinino e tetraciclina; QN-MFQ, quinino e mefloquina 65

Figura 18 - Distribuição das mutações em *pfcrt* e *pfmdr1* em amostras brasileiras ao longo das décadas de 1980 a 2010: detecção de K76T e D1246Y em todos os isolados e surgimento de N86Y na última década 67

Figura 19 - Distribuição geográfica das mutações *pfcrt* K76T (A), *pfmdr1* N86Y (B) e D1246Y (C) ao longo das quatro décadas estudadas: 1980 (✸), 1990 (■), 2000 (●) e 2010 (▲)..... 68

Figura 20 - Distribuição das frequências de mutações quíntupla (IRNGE), quádruplas (ICNGE e IRNGK) e tripla (ICNGK) nos genes *pfdhfr* e *pfdhps,* em isolados brasileiros de *Plasmodium falciparum* em dois diferentes períodos. 71

Figura 21 - Distribuição das frequências de mutações quíntupla (IRNGE), quádruplas (IRNGK e ICNGE) e triplas (ICNGK, IRNAK e NRNGK) nos genes *pfdhfr* e *pfdhps,* em isolados africanos de *Plasmodium falciparum* coletados no período de 2000 a 2011 72

Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose, de amostras de *P. falciparum* submetidas à PCR-RFLP para análise de polimorfismo no códon 769 do gene *pfATPase6*. K+, amostra não digerida; M, *ladder* 100 pb..... 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - *Primers* e condições de PCR utilizados na identificação molecular da espécie de *Plasmodium* 48

Tabela 2 - Genes de *P. falciparum* relacionados à resistência a antimaláricos analisados neste estudo 50

Tabela 3 - *Primers* e condições de PCR para amplificação de fragmentos dos genes, *pfcrt*, *pfmdr1*, *pfdhfr*, *pfdhps* e *pfATPase6* 52

Tabela 4 - Enzimas de restrição e tamanho dos fragmentos obtidos após incubação para análise de polimorfismos pontuais nos genes *pfcrt*, *pfmdr1*, *pfdhfr*, *pfdhps* e *pfATPase6* 53

Tabela 5 - Sequências dos *primers* utilizados na PCR em tempo real para quantificação relativa do número de cópias do gene *pfmdr1* e tamanho do fragmento obtido 55

Tabela 6 - *Primers*, tamanho dos fragmentos e condições de PCR utilizados para amplificação de cinco fragmentos sobrepostos do gene *pfATPase6* 57

Tabela 7 - *Primers*, tamanho dos fragmentos e condições de PCR utilizados para amplificação de fragmentos sobrepostos do gene *pfap2-μ* ... 59

Tabela 8 - Década de coleta, número de amostra por década e por local de origem das amostras analisadas neste estudo 63

Tabela 9 - Frequência de genótipos selvagem (s), mutante (mt) e misto nos códons 51, 59 e 108 do gene *pfdhfr* em amostras brasileiras dos períodos 1980-1990 e 2000-2010..... 69

Tabela 10 - Frequência de genótipos selvagem (s) e mutante (mt) nos códons 437 e 540 do gene *pfdhps* em amostras brasileiras dos períodos 1980-1990 e 2000-2010..... 70

Tabela 11 - Polimorfismos observados nas amostras em que foi realizado o sequenciamento do gene *pfATPase6*, resposta *in vivo*, origem e década de coleta das amostras. Em verde, amostras de pacientes que apresentaram recrudescência ao tratamento com derivados de artemisinina; em vermelho, amostras de pacientes que responderam adequadamente ao tratamento; em azul, amostras provenientes de lugar com alta pressão seletiva de antimaláricos e sem acompanhamento 78

Tabela 12 - Polimorfismos observados nas amostras em que foi realizado o sequenciamento do gene *pfAP2-μ*, resposta *in vivo*, origem e década de coleta das amostras. Em verde, amostras de pacientes que apresentaram recrudescência ao tratamento com derivados de artemisinina; em vermelho, amostras de pacientes que responderam adequadamente ao tratamento; em azul, amostras provenientes de lugar com alta pressão seletiva de antimaláricos; em amarelo, amostras de pacientes que recrudesceram ao tratamento com mefloquina; em cinza, amostras de pacientes que responderam adequadamente ao tratamento com mefloquina e quinino 79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais antimaláricos utilizados no tratamento e respectivas famílias químicas 20

LISTA DE ABREVIATURAS

ACT	*artemisinin-based combination therapy*
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CI_{50}	concentração inibitória média
CMI	concentração mínima inibitória
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CSP	*circumsporozoite protein*
Ct	*cycle threshold*
DELI	*doublesite enzyme-linked lactate dehydrogenase immunodetection assay*
DHF	proteína dihidrofolato
DHFR	enzima dihidrofolato redutase
DHPS	enzima dihidropteroato sintetase
DNA	*deoxyribonucleic acid*
dNTP	*deoxyribonucleotide triph*osphates
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IMTSP	Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
NAD	*nicotinamide adenine dinucleotide*
NADPH	*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	*phosphate buffered saline*
PCR	*polymerase chain reaction*
pfAP2-μ	gene *Plasmodium falciparum μ chain of the adaptor protein 2 complex*
pfATPase6	gene *Plasmodium falciparum sarcoplasmic/endoplasmic reticulum* Ca^{2+}*-ATPase*
pfβactin1	gene *Plasmodium falciparum βactin1*
pfcrt	gene *Plasmodium falciparum chloroquine resistant transporter*
PfCRT	proteína *Plasmodium falciparum chloroquine resistant transporter*

pfdhfr	gene *Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase*
pfdhps	gene *Plasmodium falciparum dihydropteroate synthase*
PfHRP-2	proteína *Plasmodium falciparum histidine rich*
pfmdr1	gene *Plasmodium falciparum multidrug resistant*
PfDMR1	proteína *Plasmodium falciparum multidrug resistant*
pfmrp	gene *Plasmodium falciparum multidrug resistance-associated*
PfMRP	proteína *Plasmodium falciparum multidrug resistance-associated*
pfnhe-1	gene *NaH exchanger*
Pgh1	glicoproteína-P homóloga 1
PIRA-PCR	*primer-introduced restriction analysis-PCR*
pLDH	enzima *Plasmodium* lactate dehydrogenase
qPCR	*quantitative polymerase chain reaction*
Ravreda	Rede Amazônica de Vigilância da Resistência às Drogas Antimaláricas
RFLP	*restriction fragment lengh polymorphism*
RNA	*ribonucleic acid*
SERCA	proteína *sarco/endoplasmic reticulum* Ca^{2+}
SNP	*single nucleotide polymorphism*
SP	sulfadoxina-pirimetamina
SUCEN	Superintedência de Controle de Endemias
TBE	tris borato EDTA
TRAP	proteína *thrombospondin related adhesive*
UNL	Universidade Nova de Lisboa

LISTA DE SÍMBOLOS DOS AMINOÁCIDOS

A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Aspartato ou Ácido aspártico
E	Glu	Glutamato ou Ácido glutâmico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina

RESUMO

Inoue J. *Marcadores moleculares para análise do polimorfismo genético relacionado à resposta de* Plasmodium falciparum *aos antimaláricos.* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

A malária é responsável por cerca de 207 milhões de casos e 627 mil óbitos em todo o mundo. No Brasil, em 2013, foram registrados mais de 167 mil casos. Um dos grandes desafios para o controle da doença é o desenvolvimento de resistência aos antimaláricos. Dentre as cinco espécies que podem causar malária em seres humanos, *Plasmodium falciparum* é a que apresenta maior habilidade de desenvolver resistência a quase todas as classes de medicamentos utilizados no tratamento. Estudos com marcadores moleculares têm associado mutações em diversos genes à resistência aos antimaláricos. A mutação K76T no gene *pfcrt* é relacionada à resistência à cloroquina. Mutações em *pfmdr1* e aumento de seu número de cópias foram associados à resistência a diversos antimaláricos, como quinino, mefloquina e derivados de artemisinina. A resistência aos antifolatos é associada a mutações nos genes *pfdhfr* e *pfdhps*. Mutações nos genes *pfATPase6* e *pfAP2-μ* têm sido relacionadas à diminuição de sensibilidade à artemisinina. O monitoramento dessas mutações e suas associações às respostas *in vivo* e *in vitro* aos antimaláricos pode contribuir para a escolha de terapêutica para o controle da doença. O objetivo deste estudo foi analisar o perfil genético relacionado à resistência em *P. falciparum* ao longo de 27 anos. Foram analisadas amostras de *P. falciparum* coletadas no período entre 1984 e 2011, de pacientes atendidos em serviços de saúde nos estados do Pará e São Paulo, com infecções provenientes principalmente de países da América do Sul e África. A análise do gene *pfcrt* mostrou frequência de 100% da mutação K76T nas amostras de países da América do Sul ao longo das décadas analisadas. Este resultado é concordante com o fenótipo de resistência à cloroquina observado em 100% das amostras testadas *in vitro* para sensibilidade a este antimalárico. Amostras de países africanos apresentaram o genótipo selvagem em infecções únicas ou mistas. Com relação ao gene *pfmdr1*, a análise do códon 86 mostrou surgimento do mutante 86Y na última década em amostras da América do Sul e ocorrência de alelos selvagens e mutantes em amostras da África. Na análise do códon 1246 foi observada predominância do mutante 1246Y nas amostras sul-americanas e do selvagem D1246 nas africanas. Com relação ao gene *pfdhfr*, as amostras brasileiras apresentaram frequência de 100% dos mutantes 51I e 108N. O mutante 59R não foi observado no período 1980-1990, mas estava presente em 22,6% das amostras de 2000-2010. A análise do gene *pfdhps* das amostras brasileiras mostrou frequência de 100% do mutante 437G em todas as décadas e diminuição da frequência de 540E no período 2000-2010 em relação aos anteriores. O sequenciamento do gene *pfATPase6* revelou a ocorrência de mutações que já haviam sido relatadas anteriormente, porém seu papel na resistência aos derivados de artemisinina ainda não foi elucidado. Na análise do gene *pfAP2-μ* foram observadas duas novas mutações. Não foram observadas associações entre as mutações estudadas e a resposta *in vivo* e *in vitro* à mefloquina, quinino e derivados de

artemisinina. Este estudo permitiu a avaliação do perfil genético de *P. falciparum*, com análise de marcadores moleculares relacionados à resistência a diversos antimaláricos, em amostras coletadas ao longo de 27 anos em que o parasito foi submetido à pressão de diferentes esquemas terapêuticos adotados no Brasil.

Descritores: 1.Malária; 2.*Plasmodium falciparum*; 3.Resistência a medicamentos; 4.Antimaláricos; 5.Marcadores genéticos; 6.Polimorfismo genético.

ABSTRACT

Inoue J**.** *Molecular markers for analysis of genetic polymorphism related to the response of* Plasmodium falciparum *to antimalarials.* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

Malaria is responsible for 207 million cases and 627 thousand deaths worldwide. In Brazil, in 2013, more than 167 thousand cases were reported. The major challenge for malaria control is the emergence and spread of resistance to antimalarials. Among the five species able to cause malaria in humans, *Plasmodium falciparum* presents ability to develop resistance to almost all classes of drugs for malaria treatment. Studies with molecular markers have associated mutations in several genes to antimalarial resistance. The mutation K76T in *pfcrt* is related to chloroquine resistance. Polymorphisms in *pfmdr1* and increased copy number were associated to several antimalarials resistance, such as quinine, mefloquine and artemisinin derivatives. Resistance to antifolates is associated to mutations in *pfdhfr* and *pfdhps* genes. Mutations in *pfATPase6* and *pfAP2-μ* were linked to decreased sensibility to artemisinins. The monitoring of these mutations and their association with *in vivo* and *in vitro* responses may contribute to the choice of therapeutics for malaria control. The aim of the present study was to analyze the genetic profile related to resistance in *P. falciparum* over twenty-seven years. Samples collected from 1984 to 2011 from patients enrolled at health facilities in Para and Sao Paulo States were assessed. The origin of infections was mainly from South America and Africa countries. *Pfcrt* analysis showed that all samples from South America countries harbored the K76T mutation over the four decades, in agreement with the resistant phenotypic response of samples tested *in vitro* for chloroquine. African samples presented the wild type in mixed or single infections. Regarding to the *pfmdr1* gene, the emergence of the mutant 86Y was observed in the last decade in South American samples and occurrence of both, mutant and wild type, in African ones. The analysis of 1246 showed only the mutant 1246Y in South American samples and the wild type D1246 in samples from Africa. Regarding to *pfdhfr* gene, the frequency of mutants 51I and 108N was 100% in Brazilian samples. The mutant 59R was not observed in the period 1980-1990 and it was present in 22.6% in samples from 2000-2010. The mutant 437G of *pfdhps* gene was observed in 100% of Brazilian samples in all decades and the frequency of mutant 540E decreased in the period 2000-2010 when compared to 1980-1990. The sequence analysis of *pfATPase6* gene showed mutations previous described, but their role in artemisinin resistance is not well defined. Two novel mutations were observed in *pfAP2-μ* gene. No association between the polymorphisms studied and *in vivo* or *in vitro* responses to mefloquine, quinine and artemisinin derivatives was observed. This study enabled the

knowledge of *P. falciparum* genetic profile regarding to mutations related to resistance in samples collected over twenty-seven years, when the parasite was exposed to selective pressure of several therapeutic schemes adopted in Brazil.

Descriptors: 1.Malaria; 2.*Plasmodium falciparum*; 3.Drug resistance; 4.Antimalarials; 5.Genetic markers; 6.Genetic polymorphism.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. MALÁRIA: HISTÓRICO

A malária é uma doença infecciosa que surgiu na África, acometendo primeiramente os primatas antecessores ao homem. Desenvolveu-se juntamente com os seres humanos e sua dispersão pelo mundo, disseminando-se pela região Mediterrânea, a partir do vale do Nilo, e então pela Ásia e Europa, onde teve papel importante em diversas civilizações (BRUCE-CHWATT, 1965). Sintomas clássicos da malária, como o padrão febril e esplenomegalia, foram relatados por Nei Ching 2700 a.C., no antigo *Chinese Canon of Medicine* e posteriormente pelas civilizações Egípcia, Grega, Indiana, Romana, entre outras (RETIEF e CILLIERS, 2006). Documentos datados de 476 a 221 a.C. citam que a malária era causada pela picada de um mosquito, principalmente durante o final do verão e início do outono (SALLARES, 2002). Na Grécia Antiga, Hipócrates (460–377 a.C.) foi o primeiro médico a descrever o paroxismo da malária e seus diferentes aspectos clínicos de acordo com a periodicidade da febre (CUNHA e CUNHA, 2008). A malária teve papel determinante na evolução de diversas civilizações da península italiana. Durante o Império Romano, no início do século X a.C. a decadência da economia e também da agricultura facilitou a disseminação da malária. No século I a.C. casos da doença foram relatados na região que atualmente compreende o sudeste da Bélgica e Holanda (SALLARES, 2002). No início do século XVI, a malária disseminou-se a partir da região do Mediterrâneo até o nordeste da Europa. No século XVII ela atingiu a Finlândia, e no século seguinte foram registrados muitos óbitos no país (HULDEN et al., 2005). No leste

da França a malária era endêmica durante o século XIX, diminuindo a expectativa de vida (SÉRANDOUR et al., 2007). Na América do Norte, tornou-se endêmica após a vinda de escravos da África durante os séculos XVI e XVII e atingiu seu pico em 1875 (RUSSELL, 1968).

O ciclo da doença foi descrito no final do século XIX por Manson, e em 1880 Laveran descobriu o parasito no sangue humano, denominando-o inicialmente *Oscillaria malariae.*

2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA MALÁRIA

A malária é uma parasitose causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, que pertencem ao Filo Apicomplexa, transmitida na natureza pela picada de mosquitos infectados do gênero *Anopheles*, que possui cerca de 400 espécies diferentes, sendo somente 30 de relevância como vetor da doença. Também pode ser transmitida através de transfusão sanguínea, uso compartilhado de agulhas contaminadas e por via congênita no momento do parto. As espécies que infectam humanos são *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (DI SANTI e BOULOS, 1999). Este último foi recentemente descrito como a quinta espécie que acomete o homem, podendo causar infecções graves, segundo estudo que utilizou *nested* PCR para identificar as espécies de *Plasmodium* em amostras de sangue de pacientes na Malásia. Este estudo revelou a presença de DNA de *P. knowlesi* em 83,7% das amostras extraídas a partir de lâminas de gota espessa com diagnóstico de *P. malariae* (COX-SINGH et al., 2008). *P. vivax* e *P. falciparum* são consideradas as espécies de maior importância: malária por *P. falciparum* é responsável pelo maior número de óbitos e é predominante na África, *P. vivax* tem ampla

distribuição mundial, pois se desenvolve no vetor *Anopheles* em baixas temperaturas e sobrevive em altas altitudes e climas mais frios (WHO, 2013).

Os primeiros sintomas são pouco específicos e incluem mal-estar, dor de cabeça, dor muscular, fadiga e desconforto abdominal, seguidos de febre regular. Náusea, vômito e hipotensão ortostática são frequentes. Convulsões são associadas especificamente à malária causada por *P. falciparum* e podem ser seguidas de malária cerebral. Pode ocorrer aumento no tamanho do fígado, especialmente em crianças. Icterícia é mais comum em adultos. Em crianças que vivem em regiões de transmissão estável, infecções recorrentes podem causar anemia crônica e esplenomegalia. As manifestações de malária grave por *P. falciparum* variam com a idade. Anemia severa e hipoglicemia são mais comuns em crianças, enquanto edema pulmonar agudo, lesão renal aguda e icterícia são mais comuns em adultos. Malária cerebral e acidose ocorrem em todas as faixas etárias (WHITE et al., 2013). Mais recentemente foram relatados casos graves, incluindo óbitos, devido a infecções por *P. knowlesi* e *P. vivax* (COX-SINGH et al., 2008; SHARMA e KHANDURI, 2009). A malária causada por *P. falciparum* pode apresentar episódios de recrudescência, motivados por resistência do parasito ao antimalárico utilizado (BRUCE-CHWATT et al., 1981).

3. DIAGNÓSTICO

Tradicionalmente, o diagnóstico é realizado através do encontro do parasito no sangue periférico pelo método da gota espessa, que é considerado padrão ouro e consiste da coloração do sangue com Giemsa (ROSS, 1903) e visualização do parasito em microscópio óptico. Esta técnica requer profissional capacitado e infraestrutura laboratorial adequada.

Como alternativa, surgiram os testes rápidos que se baseiam na detecção de antígenos do *Plasmodium*, como a proteína rica em histidina de *P. falciparum* (*Pf*HRP-2), a aldolase, comum a todas as espécies de *Plasmodium* e a lactato desidrogenase (pLDH), que pode ser específica para *P. falciparum* ou *P. vivax/P. ovale/P. malariae*. Os testes rápidos imunocromatográficos consistem de uma fita de nitrocelulose que contém um ou mais anticorpos contra estes antígenos e permitem a detecção da espécie de *Plasmodium* (MURRAY et al., 2008).

Adicionalmente, diversos métodos moleculares foram desenvolvidos para o diagnóstico de *Plasmodium*, como a PCR convencional baseada na detecção de genes da subunidade menor do RNA ribossomal (SNOUNOU et al., 1993; RUBIO et al., 1999; KIMURA et al., 1995) e a PCR em tempo real, uma técnica rápida e acurada que permite o processamento de grande número de amostras (PERANDIN et al., 2004). A PCR tem alta sensibilidade e especificidade quando comparada com a gota espessa, uma vantagem na detecção de infecções mistas e de baixas parasitemias.

4. CICLO BIOLÓGICO DO *PLASMODIUM*

Os parasitos do gênero *Plasmodium* possuem um complexo ciclo de vida (Figura 1). Ao realizar o repasto sanguíneo, a fêmea infectada do mosquito *Anopheles* transmite os esporozoítos ao hospedeiro vertebrado. Através da corrente sanguínea os esporozoítos migram até o fígado onde atravessam as células de Kupffer através do vacúolo parasitóforo e penetram nos hepatócitos. Duas proteínas principais da superfície dos esporozoítos, a *circumsporozoite protein* (CSP) e a *thrombospondinrelated adhesive protein* (TRAP) ligam-se a

proteoglicanas de heparan sulfato da superfície dos hepatócitos durante a invasão (MILLER et al., 2002). Inicia-se assim o ciclo esquizogônico exo-eritrocítico. No interior dos hepatócitos um esporozoíto divide-se em milhares de merozoítos contidos em vesículas denominadas merossomos, que os transportam até o sinusóide hepático (STURM et al., 2006) e de onde são liberados para a corrente sanguínea (Figura 2). Parte dos parasitos da fase hepática das espécies de *P. ovale* e *P. vivax* desenvolvem-se para uma fase dormente, denominada hipnozoíto (KROTOSKI, 1989). Os merozoítos liberados na corrente circulatória invadem as hemácias, iniciando o ciclo eritrocítico. No interior dos eritrócitos os merozoítos reproduzem-se assexuadamente, formando trofozoítos e após esquizontes. Cada esquizonte pode originar de 6 a 32 merozoítos, de acordo com a espécie de *Plasmodium*. Quando liberados na corrente sanguínea os merozoítos invadem novas hemácias, dando continuidade ao ciclo. Os receptores para a invasão estão nos micronemas e nas roptrias. O ciclo eritrocítico é responsável pela patogenia e manifestações clínicas da malária (ALY et al., 2009). Alternativamente à reprodução assexuada, os parasitos podem se diferenciar nas formas sexuadas, os macro e microgametócitos. A fêmea do vetor ingere essas formas e no interior de seu intestino ocorre a formação dos gametas masculinos e femininos. Diversos fatores influenciam a gametocitogênese, como a queda na temperatura, o aumento de dióxido de carbono e metabólitos do mosquito. Os microgametas são formados a partir de um processo denominado exflagelação, após o que fertilizam o macrogameta e dão origem ao zigoto. Este se desenvolve em uma forma móvel, o oocineto, que migra para o interior das células epiteliais do intestino, evolui para oocisto e sofre múltiplos ciclos de replicação assexuada,

resultando na produção de esporozoítos. Com o rompimento do oocisto maduro, os esporozoítos são liberados na hemolinfa do mosquito e migram até as glândulas salivares. Ao realizar um novo repasto, o mosquito inocula esporozoítos no hospedeiro vertebrado, dando continuidade ao ciclo (MILLER et al., 2002; ALY et al., 2009).

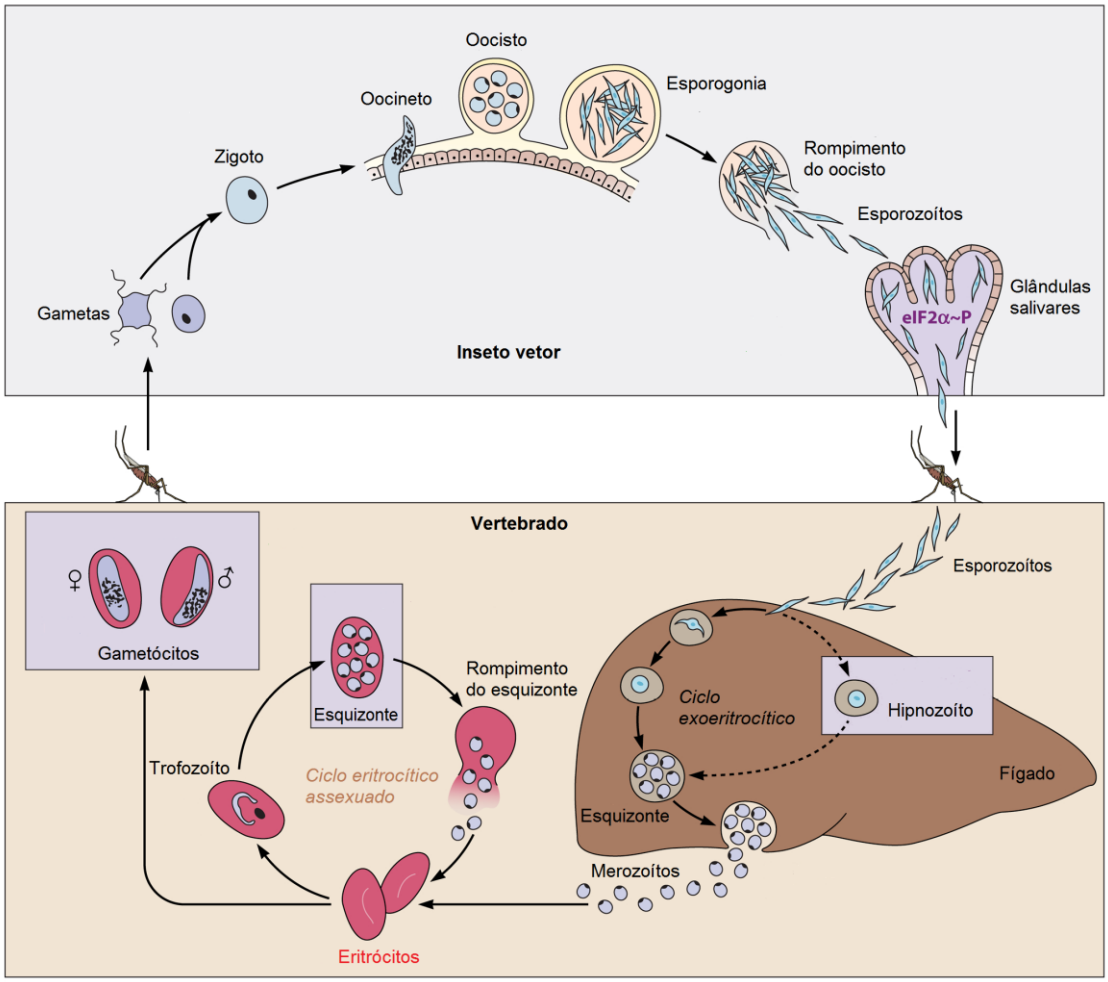
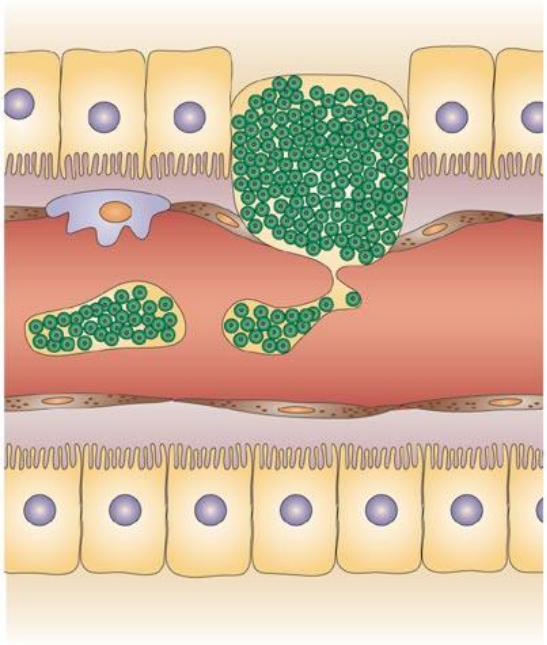


Figura 1 - Ciclo de vida do *Plasmodium*
FONTE: http://mappingignorance.org/2013/01/03/the-flick-of-a-switch-controls-the-fate-of-human-parasiteSParasites_figure2/



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

Figura 2 - Liberação dos merozoítos de *Plasmodium* na corrente sanguínea via formação de merossomos, dando início ao ciclo eritrocítico
FONTE: Prudêncio et al., 2006

5. EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA NO MUNDO

Estima-se que 3,4 bilhões de pessoas estejam sob-risco de contrair malária no mundo (Figura 3). Em 2013, a malária foi considerada endêmica em 104 países e territórios. Em 2012, a Organização Mundial de Saúde estimou cerca de 207 milhões de casos e 627.000 óbitos no mundo, com 77% dos óbitos ocorrendo em crianças abaixo dos cinco anos de idade. A maioria dos casos (80%) e dos óbitos (90%) ocorreu na África. Apesar destes dados, apenas 14% dos casos estimados em 2012 no mundo foi detectado pelos sistemas de saúde de informação. As taxas de detecção de casos foram menores em países com número de casos de malária mais elevado. A proporção de óbitos que são reportadas também é menor em países com elevados números de morte por malária. Observa-se, portanto, que os sistemas

de informação são mais fracos em locais onde o ônus da malária é maior (WHO, 2013).

As principais estratégias dos programas de controle integrado visam conter o avanço desta endemia através das seguintes intervenções: (I) controle vetorial através do uso de mosquiteiros tratados com inseticidas, borrifação intra-domiciliar e, em alguns locais, controle de larvas; (II) tratamento preventivo de gestantes e crianças; (III) diagnóstico precoce através da microscopia ou testes rápidos para cada caso suspeito; e (IV) terapêutica adequada de acordo com a espécie de *Plasmodium* e o status de resistência aos antimaláricos. O controle vetorial tem como objetivos reduzir o contato humano-vetor, protegendo os indivíduos de mosquitos infectados, e diminuir a intensidade de transmissão da malária através da redução da vida média da população de mosquitos. O objetivo da quimioterapia preventiva é prevenir a infecção e reduzir morbidade e mortalidade devido à malária. As terapias recomendadas pela OMS são: o tratamento preventivo intermitente de gestantes e crianças e a quimioprevenção sazonal da malária. A confirmação parasitológica através da microscopia ou de testes rápidos é recomendada em todos os pacientes com suspeita de malária antes do início do tratamento, sendo que a suspeita clínica sozinha somente deve ser considerada quando o diagnóstico parasitológico não é acessível. As ACTs (*artemisinin-based combination therapy*) são a recomendação da OMS para tratamento de casos não complicados de malária por *P. falciparum* (WHO, 2013).

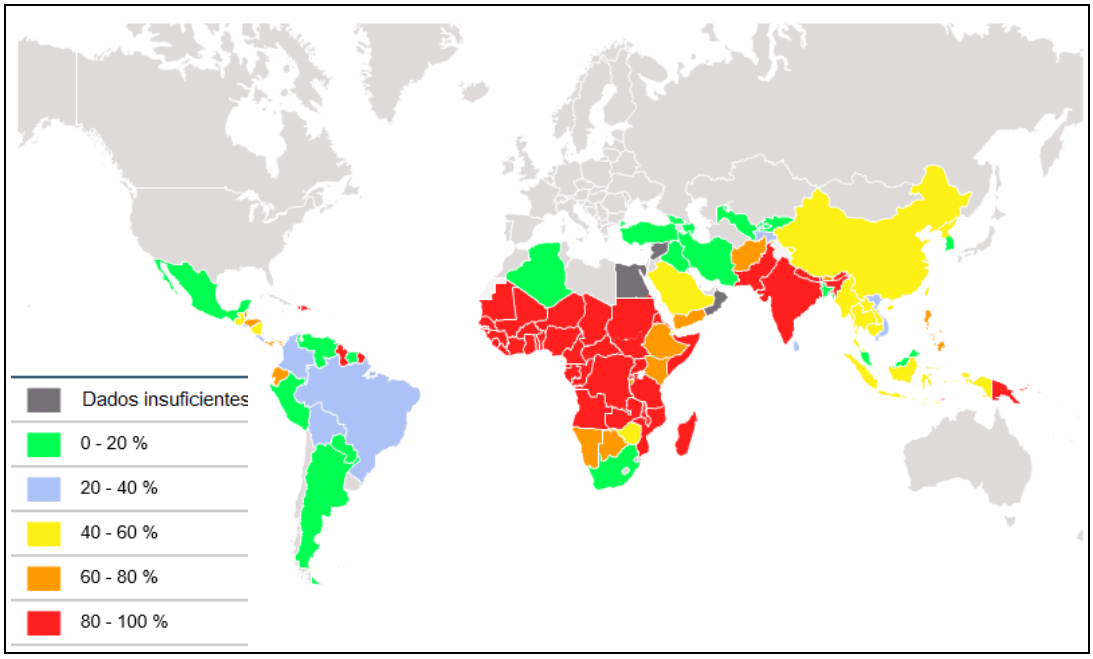


Figura 3 - População sob-risco de contrair malária no mundo, 2013, de acordo com o nível de endemicidade
FONTE: http://www.worldmalariareport.org/node/57

6. Epidemiologia da malária no Brasil

No Brasil, em 2013, foram notificados 167.525 casos de malária. No país considera-se endêmica para a doença a região da Amazônica Legal, composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Esta região foi responsável por 166.864 (99,6%) casos, sendo o estado do Amazonas responsável pelo maior número, com 73.996, seguido dos estados do Acre com 30.685 e Pará com 23.557. No triênio 2011-2013 observou-se uma redução no número de casos nesta região, como mostra a Figura 4.

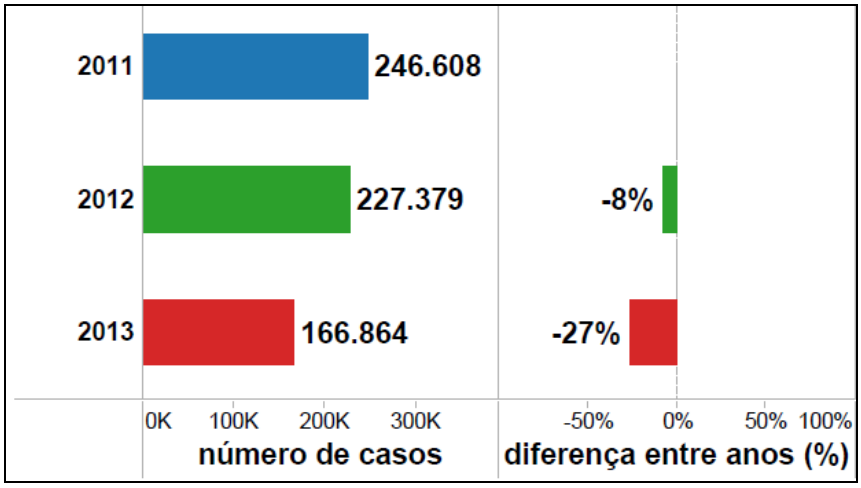


Figura 4 - Número de casos de malária notificados na Região Amazônica brasileira e diferença percentual entre 2011 e 2013
FONTE: SINAN/SVS – Ministério da Saúde

É possível observar que ao longo do ano, o período de maior transmissão ocorre logo após a estação chuvosa, quando o número de criadores do vetor aumenta. No país, a espécie de maior relevância na transmissão da doença é o *Anopheles darlingi,* que possui ampla distribuição em nosso território (Figura 5).

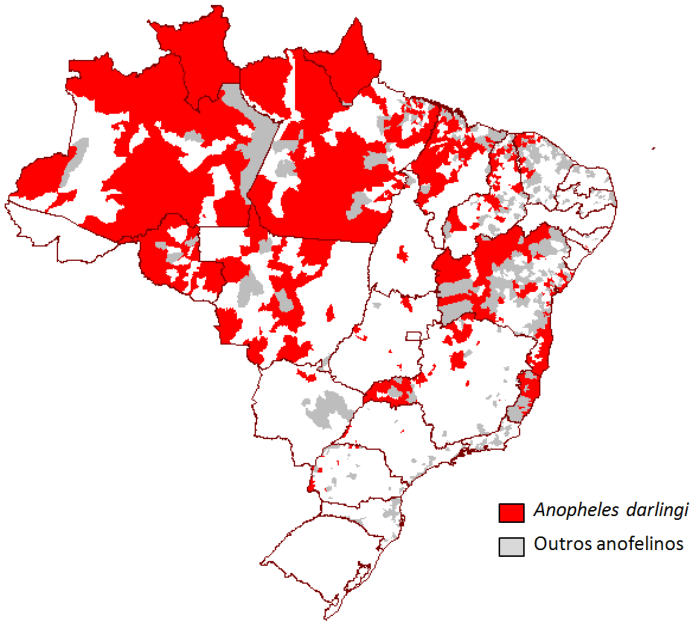


Figura 5 - Distribuição do vetor *Anopheles darlingi* no Brasil, 2012
FONTE: SVS/PNCM – Ministério da Saúde

Com relação à região Extra Amazônica, dos 661 casos notificados em 2013, 88 foram confirmados como casos autóctones, e os estados do Espírito Santo, São Paulo e Piauí foram responsáveis pelo maior número, contribuindo com 37, 16 e 14 casos, respectivamente (BRASIL, 2014). No país há transmissão de três espécies de *Plasmodium* e *P. vivax* é a espécie mais prevalente, contribuindo com 86,9% dos casos. *P. falciparum* e infecções associadas correspondem a 13,1% (BRASIL, 2012). *P. malariae* é espécie de ocorrência rara, provavelmente devido à dificuldade de diferenciação com *P. vivax* no exame diagnóstico da gota espessa. A redução nos casos de malária por *P. falciparum* em praticamente todos os estados pode em parte ser atribuída à mudança no tratamento de primeira escolha, substituindo o esquema terapêutico de quinino e doxiciclina por combinações com derivados da artemisinina (Figura 6). Dados do Programa Nacional de Controle da Malária mostram que 78% dos casos de *P. falciparum* foram tratados com ACTs (artemeter com lumefantrine ou artesunato com mefloquina) em 2011 (Figura 7). Com o objetivo de monitorar a resistência às drogas antimaláricas, foi criada em 2001 a Rede Amazônica de Vigilância da Resistência às Drogas Antimaláricas (Ravreda) com foco nos estudos sobre a eficácia dos tratamentos de primeira escolha e avaliação da resistência para *P. vivax* e *P. falciparum*, além do impacto do uso de tratamento combinado com derivados de artemisinina na transmissão da malária, o que indica a necessidade constante de monitoramento da resistência nas diferentes regiões brasileiras.

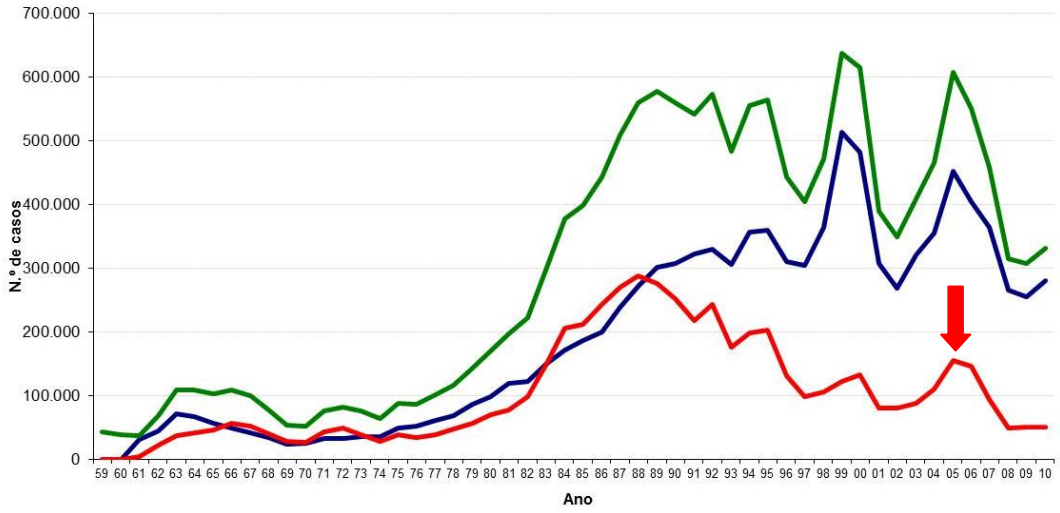


Figura 6 - Série histórica de casos de malária no Brasil, mostrando o total de casos (—), casos de *P. vivax* (—) e *P. falciparum* (—) . A seta indica a implantação do tratamento com ACTs (*artemisinin-based combination therapy*) e redução de casos de *P. falciparum*
FONTE: SISMAL e SIVEP-Malária

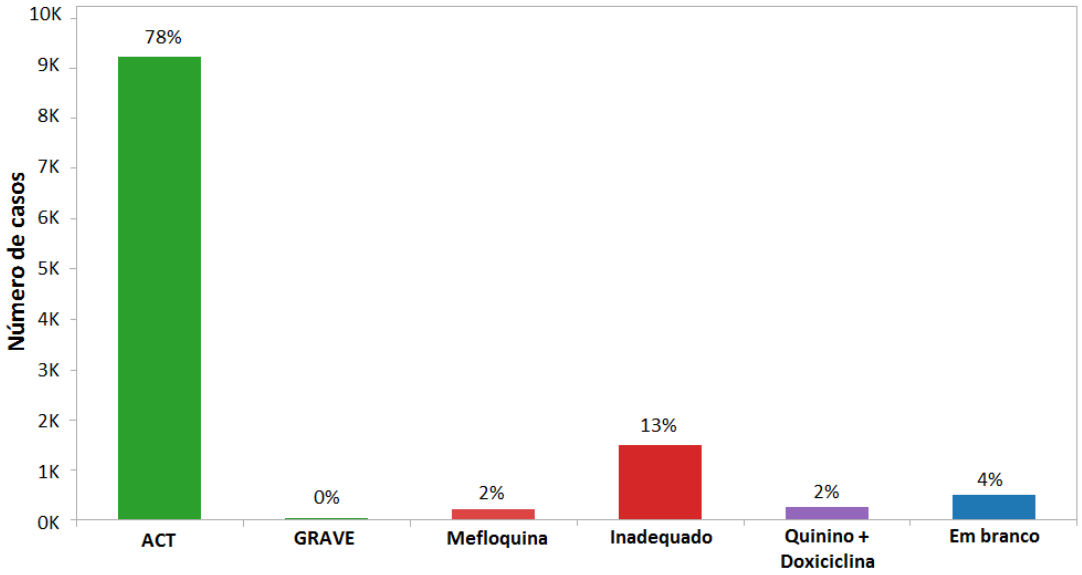


Figura 7 - Antimaláricos utilizados para tratamento de malária por *P. falciparum* no Brasil, em 2011. "Inadequado" inclui tratamento com cloroquina
FONTE: SVS/PNCM – Ministério da Saúde

7. TRATAMENTO E ANTIMALÁRICOS

O objetivo imediato do tratamento é abolir o ciclo de reprodução sanguínea do parasito, responsável pelas manifestações clínicas agudas e por

eventuais complicações, impedir as recidivas e eliminar os gametócitos. Os esquizonticidas teciduais atuam nas formas pré-eritrocíticas impedindo a invasão das hemácias, sendo fundamentais para a obtenção da cura radical. São empregados nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, que apresentam hipnozoítos no seu ciclo de vida. Os esquizonticidas sanguíneos agem nas formas eritrocíticas do parasito objetivando a cura clínica. Os gametocitocidas têm a função de eliminar os gametócitos, com objetivo de evitar a transmissão.

A cloroquina e a amodiaquina continuam sendo as drogas de escolha para tratar a fase eritrocítica do *P. vivax* e *P. ovale*, porém há relatos de *P. vivax* resistente na Papua Nova Guiné (RIECKMANN et al., 1989), na Indonésia (BAIRD et al., 1991), na Índia (KSHIRSAGAR et al., 2000), na Colômbia (SOTO et al., 2001) e no Brasil (SANTANA FILHO et al., 2007). Os medicamentos que atuam na fase exo-eritrocítica pertencem ao grupo dos 8-aminoquinoleínicos, cujo representante único disponível é a primaquina. É necessário destacar a possibilidade de falha terapêutica a despeito do esquema completo de primaquina, que varia de 7,5 a 24,5% no Brasil (BOULOS et al., 1991), ocasionando recaídas.

O tratamento da malária por *P. malariae*, a exemplo da malária por *P. falciparum*, se restringe ao emprego de medicamentos que atuem nas formas eritrocíticas, já que não existem hipnozoítos nestas duas espécies. O medicamento por excelência para *P. malariae* é a cloroquina, nas mesmas doses preconizadas para malária por *P. vivax* (WHO, 2010).

A partir de 1945 os 4-aminoquinoleínicos foram utilizados para tratamento de malária por *P. falciparum*, com excelentes resultados até o início dos anos 60, quando foram descritos casos de resistência. A alternativa foi

então o uso da associação de sulfadoxina e pirimetamina (SP), que rapidamente perdeu sua eficácia. No Brasil, para tratamento de malária por *P. falciparum* não grave, a associação de sulfato de quinino e tetraciclina, doxiciclina ou clindamicina foi considerada a melhor alternativa (DI SANTI e BOULOS, 1999), até que fosse adotada como tratamento de primeira linha a associação de derivados de artemisinina com outros antimaláricos, conforme orientação da OMS, com o objetivo de retardar o aparecimento de resistência (WHO, 2013). De acordo com a OMS, malária não complicada por *P. falciparum* deve ser tratada com ACTs. As cinco combinações recomendadas atualmente pela OMS são: arteméter mais lumefantrina, artesunato mais amodiaquina, artesunato mais mefloquina, artesunato mais SP e dihidroartemisinina mais piperaquina. A escolha do ACT deve basear-se na eficácia terapêutica da combinação de acordo com o país ou área em que se pretende usar. A Figura 8 apresenta os países em que são utilizados ACTs como primeira linha de tratamento para *P. falciparum*. A artemisinina e seus derivados não devem ser utilizados em monoterapia devido à baixa aderência ao tratamento que requer sete dias, o que resulta em clareamento parcial da parasitemia e contribuiu para o desenvolvimento de resistência (WHO, 2013). No Brasil as associações de arteméter mais lumefantrina ou artesunato mais mefloquina foram instituídas como tratamento de primeira linha para malária por *P. falciparum* não grave a partir de 2006. Para tratamento de malária grave, que exige rápida negativação da parasitemia, são preconizados os esquemas com derivados de artemisinina de uso endovenoso ou intramuscular, como o artesunato e artemeter. Um fato que merece destaque é a alta taxa de recrudescência observada com os esquemas que utilizam derivados de

artemisinina isoladamente, sendo indicado o tratamento sequencial com outra droga, como por exemplo, a clindamicina endovenosa. Na indisponibilidade dos derivados da artemisinina o esquema alternativo é a associação de cloridrato de quinino e clindamicina por via venosa (BRASIL, 2010). É fundamental a pesquisa contínua de novas drogas para tratamento da malária por *P. falciparum*, pois a resistência é um fenômeno dinâmico, que surge através da seleção de parasitos pela pressão exercida pelo antimalárico e dissemina-se rapidamente.

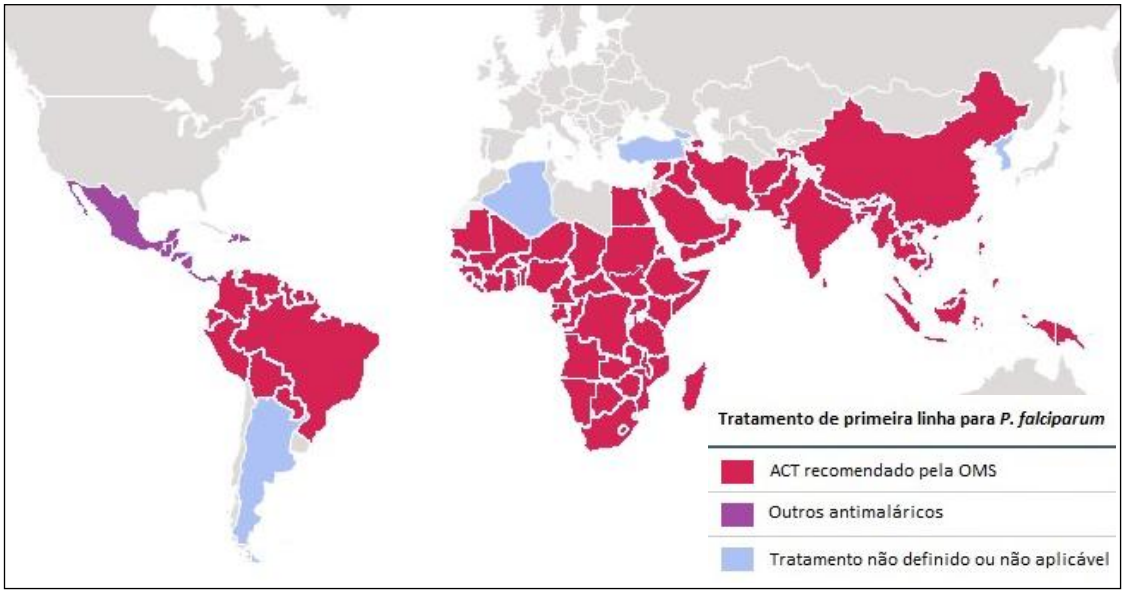


Figura 8 - Países em que as ACTs são recomendadas como primeira linha de tratamento para *P. falciparum*
FONTE: http://www.worldmalariareport.org/map?color=102

O quinino é o mais antigo composto utilizado para o tratamento de *P. falciparum*, tendo sido amplamente adotado por mais de 300 anos e substituído pela cloroquina na década de 1940 (BENNETT e DESFORGES, 1967). Relatos históricos reportam seu uso desde 1630, quando jesuítas no Peru utilizavam a

casca da *Cinchona* para tratamento de febre. O alcaloide extraído da casca desta planta foi isolado em 1820 e nomeado quinino (OKOMBO et al., 2011). Foi utilizado isoladamente na forma de sulfato e cloridrato, este último indicado para tratamento de infecções com maior gravidade. Seu uso associado a antibióticos como as tetraciclinas foi introduzido com a finalidade de diminuir a toxicidade e a disseminação de resistência. A estrutura química é formada por um grupo quinolínico ligado a um anel quinuclidínico, através de um grupo alcoólico secundário (ASHLEY et al., 2006). O modo de ação proposto para o quinino é pouco compreendido. Algumas evidências sugerem que o quinino compartilha características em comum com outros antimaláricos da mesma classe. Dessa forma, acredita-se que o quinino impeça a detoxificação do heme no vacúolo digestivo do parasito ocasionando sua morte (SANCHEZ et al., 2008).

A cloroquina é uma 4 – aminoquinoleína desenvolvida para substituir o quinino e inicialmente denominada Resochin. Acreditava-se que fosse altamente tóxica para uso clínico e por esse motivo foi ignorada durante uma década. Durante a Segunda Guerra Mundial esta droga foi reavaliada e comprovou-se segura em concentrações terapêuticas. Foi então renomeada como cloroquina e ensaios clínicos foram realizados em 1943 (LOEB et al., 1946). A partir de então foi utilizada durante muitos anos para tratamento da malária, devido à sua eficácia, disponibilidade e segurança, inclusive para gestantes. Na década de 1950, em uma ação na tentativa de erradicar a malária, foram distribuídas toneladas de cloroquina no Brasil para adição em sal de cozinha, fato que pode ter contribuído para surgimento de resistência a essa droga. Outros países também participaram deste projeto de adição de

cloroquina ao sal, entre eles Indonésia, Cambodia, Guiana, Gana, Iran, Tanzânia, Suriname, Guiana Francesa, Angola e Filipinas (PAYNE, 1988). A cloroquina possui meia vida de aproximadamente 60 dias, o que lhe confere um efeito quimioprofilático durante a fase de eliminação da droga e, por outro lado, pode selecionar parasitos resistentes devido à exposição de baixas concentrações da droga (PETERSEN et al., 2011). Há várias teorias propostas para o modo de ação da cloroquina, entre elas inibição de proteases e fosfolipases no vacúolo digestivo, aumento do pH nesta organela e inibição da polimerização do heme (SLATER, 1993). O mecanismo de ação amplamente aceito considera que a cloroquina acumula-se no vacúolo digestivo e liga-se a moléculas heme, produzidas pela digestão da hemoglobina pelo parasito. O heme é um intermediário tóxico que é destoxificado mediante polimerização, originando cristais de hemozoína. A ligação da cloroquina ao heme impede a polimerização, ocasionando a morte do parasito (ORJIH et al., 1994; OLLIARO, 2001).

A mefloquina é um 4 - quinolinometanol similar ao quinino, introduzida na década de 1970 tendo sido amplamente utilizada para tratamento e profilaxia, principalmente da malária por *P. falciparum*. Possui meia vida de 14 a 18 dias. O mecanismo de ação está relacionado com a formação de complexos tóxicos com o heme livre assim como o quinino e a cloroquina (OLLIARO, 2001). Adicionalmente, demonstrou-se que a mefloquina é capaz de inibir a importação de outros solutos para dentro do vacúolo digestivo e pode ter outros alvos como a proteína Pgh-1, por exemplo (RUBIO e COWMAN, 1996; ROHRBACH et al., 2006). A mefloquina tem sido utilizada como quimioprofilático

na Europa desde 1985 e nos Estados Unidos desde 1990 (SCHLAGENHAUF, 1999).

A pirimetamina e a sulfadoxina são drogas antifolato utilizadas no tratamento da malária. A pirimetamina liga-se à enzima dihidrofolato redutase (DHFR) do parasito, inibindo sua ação. Esta enzima cataliza a redução NADPH-dependente do ácido fólico para ácido dihidrofólico e ácido tetrahidrofólico, desempenhando um papel essencial no crescimento do parasito. O ácido tetrahidrofólico é um cofator necessário à biosíntese de timidilato, purinas e certos aminoácidos (FERONE et al., 1969; FERONE, 1977). Inibidores da DHFR mimetizam o anel piridínico do substrato natural da DHF e competem com o sítio ativo da enzima. A sulfadoxina inibe a enzima dihidropteroato sintetase (DHPS), competindo com o sítio ativo da DHPS o que impede a formação de dihidropteroato a partir de um derivado do pirofosfato (OLLIARO, 2001). A inibição das proteínas DHFR e DHPS do parasito na via de síntese do folato leva à diminuição dos níveis de tetrahidrofolato podendo inibir a divisão nuclear (MITA et al., 2009). A combinação SP, com o nome comercial Fansidar, foi introduzida nos anos 1970 após surgimento de parasitos resistentes à cloroquina. Sua meia vida é de cerca de quatro a cinco dias. O tratamento com SP era altamente eficaz e possuía boa aderência do paciente devido à sua utilização em dosagem única. Atualmente esta combinação é indicada para o tratamento interminente preventivo em gestantes (PETERSEN et al., 2011).

A artemisinina é um produto natural isolado a partir da planta *Artemisia annua* e tem sido utilizada na China como remédio fitoterápico há séculos (EASTMAN E FIDOCK, 2009). A artemisinina age sobre todas as formas

assexuadas e sexuadas sanguíneas de *P. falciparum* (TERKUILE et al., 1993; CHEN et al., 1994). Devido à sua baixa solubilidade, vários derivados semissintéticos são utilizados clinicamente como o arteméter, o artesunato e a dihidroartemisinina. O mecanismo de ação da artemisinina permanece incerto. A integridade da ponte endoperóxido é necessária para a atividade antimalárica. A alquilação íon-dependente pelo Fe^{++} parece representar o mecanismo de ação (HAYNES et al., 2007) e a proteína SERCA PfATPase6 (*sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium adenosine triphosphatase*) tem sido proposta como o alvo primário (ECKSTEIN-LUDWIG et al., 2003). As ACTs são preconizadas pela OMS como o tratamento de 1ª linha para *P. falciparum* não complicado em todas as regiões onde a malaria é endêmica, principalmente com o objetivo de conter o aparecimento de resistência aos antimaláricos (WHO, 2010). As famílias químicas e a esquematização dos alvos de ação para diferentes antimaláricos são apresentados no Quadro 1 e na Figura 9, respectivamente.

Família química	Antimaláricos
4-Aminoquinoleínas	Cloroquina, amodiaquina, piperaquina
Amino-álcoois	Quinino, mefloquina, lumefantrina
Sulfonamidas	Sulfadoxina
Diaminopirimidinas	Pirimetamina
8-Aminoquinolinas	Primaquina
Sesquirtepeno lactonas	Artemisinina, arteméter, artesunato, dihidroartemisinina
Antibióticos	Clindamicina, doxiciclina, tetraciclina

Quadro 1 - Principais antimaláricos utilizados no tratamento e respectivas famílias químicas
FONTE: Modificado a partir de WHO, Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000–2010; 2010

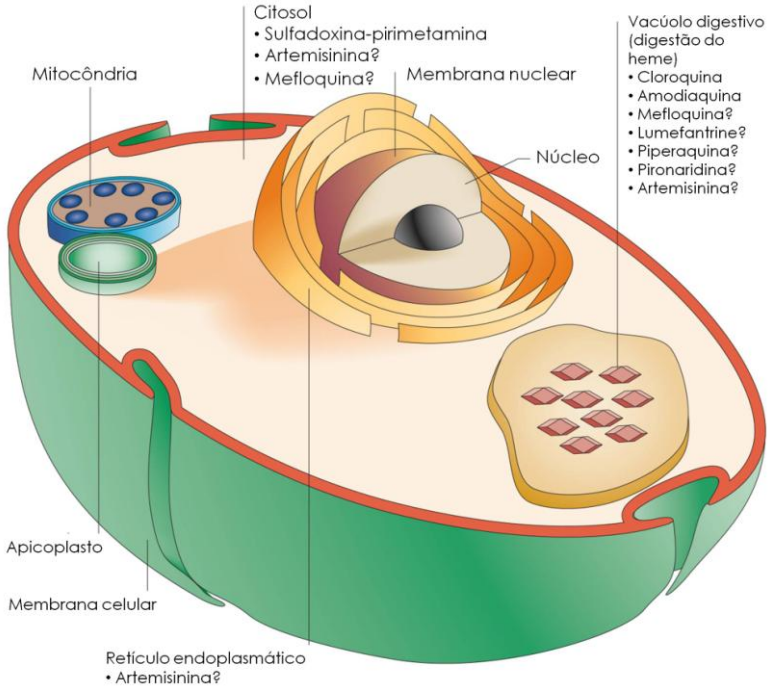


Figura 9 - Representação de forma sanguínea assexuada de *P. falciparum* e sítios-alvos propostos para vários antimaláricos
FONTE: Eastman RT e Fidock DA, 2009

8. RESISTÊNCIA

A resistência aos antimaláricos tem sido um dos principais obstáculos para o controle da malária. Dentre as cinco espécies que podem causar malária em humanos, a resistência já foi relatada em três: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*.

A resistência aos antimaláricos foi definida como a capacidade que os parasitos possuem de sobreviver ou multiplicar-se em doses iguais (resistência relativa) ou superiores (resistência completa) àquelas toleradas pelo hospedeiro, em condições de administração e absorção adequadas (WHO, 1967). Posteriormente, foi incluída a seguinte frase: “A forma da droga ativa contra o parasito deve ser capaz de ter acesso ao parasito ou ao eritrócito

infectado pelo período de tempo necessário para sua ação normal" (BRUCE-CHWATT et al., 1986). Esta nova definição considera que a farmacocinética dos antimaláricos é amplamente variada, portanto a definição de resistência é aperfeiçoada ao se considerar também o perfil de concentração da droga ativa. Um fator agravante é a resistência cruzada, que pode ocorrer entre drogas que pertencem à mesma família química ou que possuem o mesmo modo de ação. A resistência resulta em demora ou falha no clareamento parasitário de formas assexuadas no sangue, permitindo a produção de gametócitos que são responsáveis pela transmissão do genótipo mutante (WHO, 2010). A recrudescência caracteriza-se pelo reaparecimento da parasitemia, geralmente até um mês após o início do tratamento (WHO, 1973).

Falha terapêutica é definida como a inabilidade de clareamento da parasitemia ou desaparecimento de sintomas clínicos apesar da administração de antimalárico. Entretanto, a falha terapêutica não ocorre sempre devido à resistência, outros fatores podem contribuir principalmente a redução da concentração do fármaco. Dentre os fatores que podem colaborar para a ocorrência de falha terapêutica estão dosagem incorreta, baixa aderência do paciente ao tratamento, baixa qualidade da droga e interações medicamentosas. Mesmo após administração supervisionada do antimalárico, variações individuais na farmacocinética podem levar à falha terapêutica devido à baixa absorção ou rápida eliminação através de diarreia ou vômito. Estudos de eficácia terapêutica podem descartar a influência desses fatores, pois são conduzidos em ambiente controlado. Métodos como testes *in vitro* e análise molecular, quando disponíveis e validados, concomitantemente à avaliação da

concentração das drogas complementam os resultados de estudos de eficácia terapêutica (BASCO, 2007; WHO, 2010).

A avaliação *in vitro* da resistência aos antimaláricos tem sido realizada com base em diferentes metodologias: o microteste (RIECKMANN et al., 1968) constitui-se de microculturas do parasito, realizadas em placas pré-doseadas com o antimalárico a ser avaliado. A análise é realizada mediante observação microscópica do desenvolvimento ou da inibição do crescimento da fase de trofozoíto para esquizonte. Di Santi e colaboradores (1987) utilizaram este método em estudo de caracterização de cepas do Estado de Rondônia. Em 1979, Desjardins e colaboradores descreveram um método para medir a atividade antimalárica de drogas contra formas assexuadas sanguíneas de *P. falciparum* de cultivo contínuo. A inibição de incorporação pelos parasitos, de um precursor de DNA marcado com radioisótopo ([3^{H}] Hipoxantina), serviu como indicador da atividade antimalárica dos compostos. Em 1993 Makler e Hinrichs descreveram um teste para avaliar a resposta do *P. falciparum* a antimaláricos, denominado DELI (*doublesite enzyme-linked lactate dehydrogenase immunodetection assay*). Este teste é um ensaio enzimático que detecta a pLDH do *Plasmodium*, que utiliza a 3-acetyl piridina NAD como uma coenzima na reação que transforma lactato em piruvato. A formação deste produto é a base para detecção de *P. falciparum in vitro* e em amostras clínicas.

Quanto à resposta terapêutica *in vivo*, os parasitos podem ser classificados em:

S - Sensível: desaparecimento da parasitemia assexuada nos sete dias seguintes ao início do tratamento, sem recrudescência posterior;

RI - Resistente: desaparecimento da parasitemia assexuada como no caso anterior, porém seguido de recrudescência;

RII - Resistente: redução considerável da parasitemia assexuada, mas sem o completo desaparecimento;

RIII - Resistente: ausência de redução considerável da parasitemia assexuada (WHO, 1967).

Em 1996 a OMS elaborou uma classificação aplicável especificamente a áreas de alta endemicidade:

ETF - *Early Treatment Failure*: agravamento ou persistência dos sintomas clínicos com parasitemia nos três primeiros dias após o tratamento;

LTF - *Late Treatment Failure*: reaparecimento dos sintomas com parasitemia entre o quarto e o décimo quarto dia após o tratamento;

ACR - *Adequate Clinical Response*: ausência de parasitemia ou de sintomas clínicos no décimo quarto dia após o tratamento (WHO, 2001).

O acompanhamento parasitológico do paciente por sete dias não permite a diferenciação entre S e RI, o que só é possível com seguimento por 28 dias ou mais, para drogas com vida média longa, como a mefloquina.

Considera-se que o desenvolvimento de resistência aos antimaláricos ocorra em duas fases. Inicialmente, um evento genético produz uma mutação capaz de conferir resistência (mutação *de novo*), o que permite ao parasito sobreviver mesmo na presença da droga. Em uma segunda fase, os parasitos mutantes são selecionados e se multiplicam, levando ao surgimento de uma população parasitária que não é susceptível ao tratamento. O surgimento de mutações que levam à resistência é um evento espontâneo e raro, ocorrendo de forma aleatória independentemente da droga (WHO, 2010). A seleção de

parasitos resistentes ocorre provavelmente quando os mesmos são expostos a concentrações subterapêuticas das drogas (WHITE e PONGTAVORNPINYO, 2003), visto que uma concentração inadequada é capaz de erradicar somente os parasitos sensíveis. A população de parasitos resistente restante pode então ser transmitida a outros indivíduos. Após o surgimento de parasitos resistentes e sua seleção, é difícil prever a dispersão da resistência. Sabe-se que drogas de vida média longa podem contribuir para dispersão do mutante resistente, atuando com um filtro, pois previnem a infecção por parasitos sensíveis, mas não por resistentes.

Estudos epidemiológicos demonstram que o surgimento da resistência ocorre originalmente em locais de baixa transmissão. Como nestes locais as infecções são geralmente sintomáticas, um número maior de pessoas infectadas recebe tratamento, o que fornece mais oportunidade para seleção (ROPER et al., 2004). O mesmo não ocorre em áreas de alta transmissão, locais em que a maioria das infecções é assintomática e os indivíduos adquirem imunidade parcial e controlam a infecção (DYE e WILLIAMS, 1997). Além disso, visto que o sistema imune é capaz de matar os parasitos independentemente de seu fenótipo de resposta aos antimaláricos, há uma redução na probabilidade de sobrevivência destes em todos os estágios do ciclo, consequentemente diminuindo a transmissão. Este quadro torna áreas de alta endemicidade menos susceptíveis ao surgimento de resistência.

Dentre os fatores que influenciam o desenvolvimento de resistência aos antimaláricos estão: a frequência intrínseca com a qual mudanças genéticas ocorrem, o grau de resistência que a mutação confere, o custo de adaptação do mecanismo de resistência, a proporção de transmissão de parasitos

expostos à droga (pressão seletiva), o número de parasitos expostos à droga, as concentrações da droga às quais o parasito é exposto, a farmacocinética e farmacodinâmica dos antimaláricos, padrões de uso dos antimaláricos em indivíduos (dosagem, duração, aderência) e comunidade (qualidade, disponibilidade, distribuição), o perfil de imunidade do indivíduo e da comunidade, a presença simultânea de outros antimaláricos ou substâncias no sangue ao qual o parasito não é resistente e a intensidade de transmissão. (WHO, 2010). Considerando estes fatores e apesar da natureza aleatória do surgimento genético de resistência, é possível a adoção de algumas medidas no sentido de minimizar o risco, como por exemplo, prescrição correta do medicamento, aderência ao tratamento e fornecimento de regimes terapêuticos eficazes, principalmente em pacientes hiperparasitados (WHITE et al., 2009).

A origem de parasitos resistentes à cloroquina ocorreu em pelo menos seis regiões geográficas distintas (Figura 10). Na Ásia, a resistência foi relatada no final da década de 50, na fronteira da Tailândia com o Cambodia e disseminou-se pelo interior da Tailândia em 1959. Posteriormente atingiu países vizinhos, disseminando-se pela Malásia, Cambodia e Vietnam no início da década de 60 e após para todo o Sudeste Asiático (HARINASUTA et al., 1965; WHO 1973; 1984). Na América do Sul foi reportada na Colômbia e Venezuela em 1961 em pacientes com nível sérico adequado da droga (MOORE e LANIER, 1961). No Brasil, a resistência do *P. falciparum* à cloroquina foi detectada na década de 1960, em Rondônia (RODRIGUES DA SILVA, 1961) Hoje ela é útil apenas para o tratamento da malária causada por outras espécies de *Plasmodium*, que não o *P. falciparum* (BRASIL, 2010). Posteriormente, atingiu a Guiana em 1969, Suriname em 1972, Equador em 1976 e o Peru e a Bolívia

em 1980 (WHO, 1984). Quase todas as cepas africanas resistentes à cloroquina parecem ter sido originadas a partir de uma cepa do Sudeste Asiático. A resistência entrou na África no final da década de 1970, no Quênia e Tanzânia (CAMPBELL et al., 1979; FOGH et al., 1979), disseminando-se para o Leste, África Central. Atualmente é também descrita no Oeste do continente (PLOWE, 2009). Alguns estudos relatam reversão da resistência após descontinuação do uso da cloroquina. Em 1993, o Malaui foi o primeiro país do continente africano a substituir o tratamento de *P. falciparum* com cloroquina pela combinação SP. Kublin et al. (2003) relataram uma redução do genótipo resistente de 85% em 1992 para 13% em 2000, sugerindo um ressurgimento de parasitos sensíveis à cloroquina. O mesmo fenômeno foi observado em menor escala em Haina, na China, onde a retirada da droga ocorreu em 1979 (WANG et al., 2005). Mwai et al. (2009) também reportaram uma diminuição do genótipo resistente à cloroquina de 95% para 60% em isolados do Quênia. No Haiti, embora já tenha sido reportada a existência de alelos mutantes em genes relacionados à resistência (LONDONO et al., 2009), os parasitos continuam apresentando sensibilidade à cloroquina. Em estudo realizado entre 2010 e 2011, Neuberger et al. (2012) relataram não haver falha terapêutica em indivíduos tratados com cloroquina, embora não tenha sido possível realizar o seguimento completo do paciente. Adicionalmente, nenhum isolado de *P. falciparum* continha o haplótipo relacionado à resistência no gene *pfcrt*.

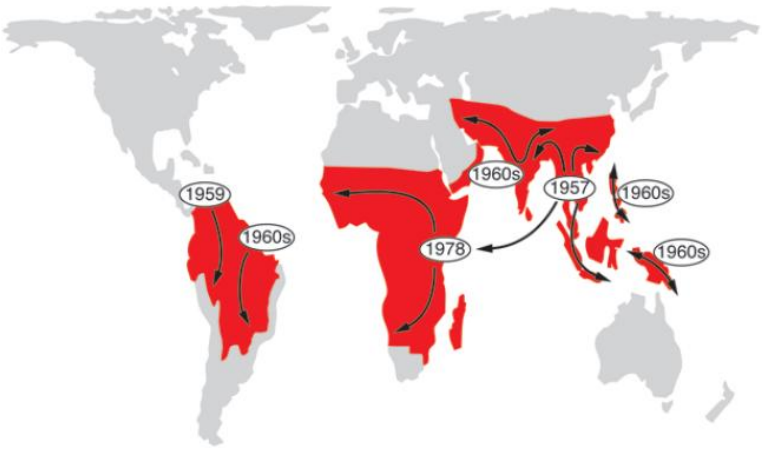


Figura 10 - Origem e dispersão de cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina
FONTE: Wellems et al., 2009

A resistência do *P. falciparum* ao quinino foi detectada no leste da Tailândia (MIGASENA et al., 1980) no início da década de 80. Na mesma época, Reacher e colaboradores (1981), mostraram cura em apenas 66% dos pacientes tratados com quinino por 7 a 10 dias, em casos de resistência à associação SP. No Brasil, os primeiros casos de resistência foram descritos em Xerém e Mantiquira, Rio de Janeiro (NEIVA, 1910). No Sudeste Asiático, na fronteira entre Tailândia e Cambodia, a falha terapêutica ao quinino é constantemente relatada (NA-BANGCHANG e CONGPUONG, 2007). Casos esporádicos de resistência ao quinino em monoterapia já foram reportados na Papua Nova Guiné (AL-YAMAN et al., 1994), Brasil (SEGURADO et al., 1997), Guiana Francesa (DEMAR e CARME, 2004) e África (JELINEK et al., 1995).

O primeiro caso de resistência à mefloquina foi descrito na fronteira da Tailândia com o Cambodia (BOUDREAU et al., 1982). Atualmente a mefloquina em monoterapia não é mais eficaz nesta região e na fronteira Tailândia-Myanmar. Posteriormente, foi descrita na Tanzânia (BYGBERG et al., 1983) e no

Brasil (BOULOS et al., 1986). Hoje a resistência à mefloquina está disseminada no Sudeste asiático, sendo descrita também em alguns países africanos e na Índia (MUCKENHAUPT, 1995; SHARMA, 1996).

A pirimetamina começou a ser utilizada em 1952, porém, já em 1953 a resistência do *P. falciparum* a este antimalárico foi descrita na África (AVERY-JONES, 1954 *apud* ONORI, 1984). Hoje, a distribuição da resistência à pirimetamina é praticamente idêntica à distribuição do *P. falciparum* e *P. vivax* (WERNSDORFER, 1982). A resistência do *P. falciparum* à associação SP foi descrita por Rumans e colaboradores em 1979, na Indonésia, por Hurwitz e colaboradores em 1981, na Tailândia e por De Geus e colaboradores em 1982, na Tanzânia. No Brasil, a resistência do *P. falciparum* à associação SP foi descrita em 1982, por Alencar e colaboradores, em um paciente que adquiriu malária no Estado de Rondônia. Também Alecrim e colaboradores (1982) estudaram o fenômeno em pacientes oriundos dos Estados de Pará, Amazonas, Rondônia e Mato Grosso, e encontraram 63,1% de resistência *in vivo*. Mais tarde, Boulos e colaboradores (1986) relataram 100% de falha terapêutica aos esquemas de SP em 54 pacientes atendidos no Laboratório de Malária da SUCEN. O uso da tripla combinação de mefloquina com SP mostrou resposta em nível de RI, em três de 46 pacientes.

Pouco tempo após a adoção das ACTs, relatos sugerem o aparecimento de casos de resistência do *P. falciparum* à combinação de artesunato com mefloquina, na fronteira do Cambodia com a Tailândia. Assim como ocorrido com o uso combinado de mefloquina e SP para tentar conter a resistência ao antifolato, o aparecimento de falha terapêutica com uso de mefloquina-artesunato pode estar relacionado com a resistência pré-existente à mefloquina

(WONGSRICHANALAI et al., 2004; WONGSRICHANALAI e MESHNICK, 2008). Casos de infecções por *P. falciparum* com susceptibilidade *in vivo* reduzida aos derivados de artemisinina foram relatados no Cambodia (NOEDL et al., 2008; DONDORP et al., 2009). Estudo longitudinal realizado na Tailândia entre 2001 e 2010 demonstrou um aumento no tempo de clareamento parasitário em pacientes tratados com artesunato em monoterapia ou em combinação com outros antimaláricos (PHYO et al., 2012). Segundo a OMS, a resistência de *P. falciparum* às artemisininas foi detectada em quatro países do Sudeste Asiático: Cambodia, Mianmar, Tailândia e Vietnam (WHO, 2013 a).

De acordo com a OMS, somente pacientes que atendem aos seguintes critérios são classificados como portadores de infecção resistente à artemisinina: (I) persistência de parasitos após sete dias de tratamento ou recrudescência dentro de 28 dias do início do tratamento com artemisinina em monoterapia, (II) concentração plasmática adequada de dihidroartemisinina, (III) demora no clareamento parasitário e (IV) reduzida sensibilidade *in vitro* à dihidroartemisinina (WHO, 2010).

9. GENES RELACIONADOS À RESISTÊNCIA

A caracterização de marcadores moleculares de resistência às drogas é um importante aspecto para o entendimento deste fenômeno. Ao identificar as associações entre mudanças genéticas e resistência, é possível confirmar a resistência através de técnicas moleculares. Estudos de marcadores moleculares têm várias vantagens em relação aos estudos *in vivo* e *in vitro*: muitos isolados podem ser estudados dentro de um curto período de tempo e as amostras podem ser coletadas, estocadas e transportadas de forma mais

fácil do que para testes *in vitro*. Além disso, o sangue pode ser coletado em papel filtro que pode ser estocado durante meses.

9.1 *pfcrt*

A resistência à cloroquina está ligada ao gene *pfcrt* (*P. falciparum chloroquine resistant transporter*), localizado no cromossomo 7 de *P. falciparum*, tendo sido descrito após cruzamentos entre parasitos sensíveis HB3 e resistentes Dd2 (WELLEMS et al., 1990; 1991). Este gene codifica a proteína *Pfcrt*, localizada na membrana do vacúolo digestivo do parasito (FIDOCK et al., 2000; COOPER et al., 2002; MARTIN e KIRK, 2004). A proteína PfCRT é formada por 424 aminoácidos e contém 10 domínios transmembrana (KUHN et al., 2010), como demonstra a Figura 11A. Dentre as vinte mutações pontuais detectadas no *pfcrt*, a substituição de lisina (Lys-AAA) por treonina (Thr-ACA) na posição 76 é encontrada nos parasitos resistentes e tem sido utilizada em estudos de campo como marcador molecular de resistência à cloroquina (FIDOCK et al., 2000; DJIMDE et al., 2001). A variedade de alelos polimórficos de *pfcrt* pode conferir diversos graus de resistência à cloroquina (SÁ et al., 2009). Experimentos com indução de resistência em parasitos sensíveis mostraram que o mutante resistente pode albergar duas outras mutações na posição 76: 76I ou 76N, entretanto estas mutações não são encontradas em amostras clínicas e são consideradas um genótipo deletério para o parasito adaptar-se em campo (COOPER et al., 2002; WELLEMS e PLOWE, 2001). O mecanismo de resistência à cloroquina ocorre através da troca de carga positiva para neutra devido à substituição de aminoácidos, que impede que a cloroquina seja retida dentro do vacúolo digestivo (COOPER et al., 2002;

FIDOCK et al., 2000; SIDHU et al., 2002). A resistência à cloroquina pode ser revertida por verapamil, um bloqueador do canal de cálcio, através do aumento da cloroquina dentro do vacúolo digestivo (MARTIN et al., 1987). A proteína mutante PfCRT parece interagir não somente com a cloroquina, mas também com outros antimaláricos (SANCHEZ et al., 2004; MARTIN et al., 2009) (Figura 11B). Estudo realizado em oocistos de *Xenopus laevis*, que expressavam em sua superfície a PfCRT mutante, demonstrou que o verapamil e antimaláricos do grupo dos quinolinos, como o quinino, eram capazes de inibir o transporte de cloroquina pela proteína mutante. Por outro lado, piperaquina e artemisinina não demonstraram interação com a proteína (MARTIN et al., 2009). Estes dados sugerem que PfCRT atue como transportadora de derivados quinolínicos e arilaminoalcóois (Figura 11B).

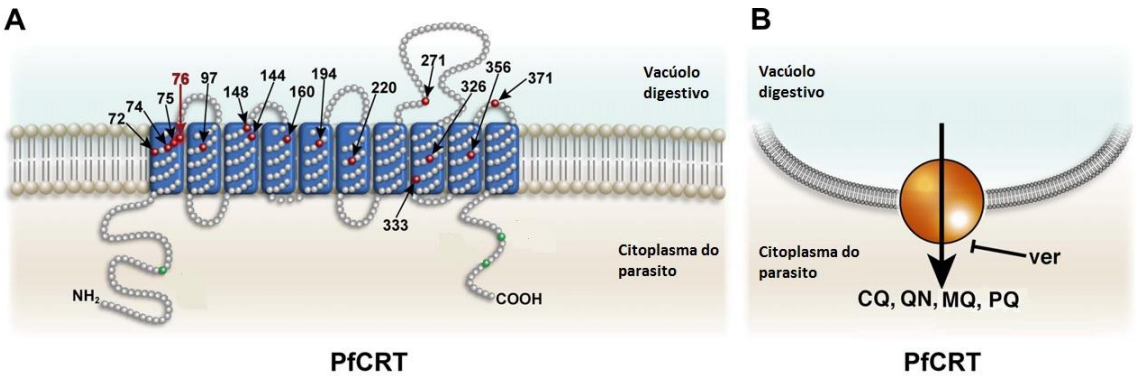


Figura 11 - Topologia e função da proteína PfCRT. (A) Modelo topológico de PfCRT. As setas pretas indicam aminoácidos polimórficos. A substituição de lisina por treonina encontrada em parasitos resistentes é indicada pela seta vermelha. (B) Substratos propostos de PfCRT. Esta proteína parece transportar drogas para fora do vacúolo digestivo onde são acumuladas. CQ, chloroquina; QN, quinino; MQ, mefloquina; PQ, primaquina. Verapamil (Ver) bloqueia o transporte de drogas mediado por PfCRT
FONTE: Modificado de Sanchez et al., 2010

Outros estudos também relatam associações entre mutações no gene *pfcrt* e a resposta ao quinino (COOPER et al., 2002, 2007; GRIFFIN et al., 2012) e

a outros antimaláricos como a mefloquina, por exemplo (SIDHU et al., 2002; SÁ et al., 2009).

O parasito que alberga mutações em genes associados à resistência à cloroquina possui um custo de adaptação (HAYWARD et al., 2005). Em alguns países em que a cloroquina foi retirada do tratamento, ocorreu o ressurgimento de parasitos sensíveis, sugerindo que o mutante possui uma desvantagem de adaptação em relação ao genótipo selvagem (SÁ et al., 2009).

9.2 *pfmdr1*

O gene *pfmdr1* (*P. falciparum multidrug resistant*) localizado no cromossomo 5 de *P. falciparum* tem sido associado à resposta de *P. falciparum* a diversos antimaláricos. Este gene codifica uma glicoproteína transmembrana homóloga 1 (Pgh1) localizada no vacúolo digestivo do parasito (COWMAN et al., 1991). Em células cancerígenas de mamíferos, a resistência a drogas frequentemente ocorre a partir de uma elevada expressão desta glicoproteína, que pertence à família de transportadores ABC e é capaz de expelir ativamente uma ampla gama de quimioterápicos com estrutura e funções diversos (HIGGINS, 2007). Estes transportadores ABC também estão relacionados a algumas doenças hereditárias e à susceptibilidade a medicamentos utilizados em outras doenças, incluindo a malária. São responsáveis pelo transporte de nutrientes e de agentes citotóxicos, reduzindo a acumulação destes últimos (PRADINES et al., 2005). Esta proteína parece estar associada à resposta à diversos antimaláricos. Dentre as mutações que foram associadas à resistência à cloroquina estão: N86Y, Y184F, S1034C, N1042D e D1246Y (WHO, 2010). Entretanto, o gene *pfmdr1* parece não conferir resistência à cloroquina, mas

sim exercer um importante papel com efeito modulador (ROEPE, 2009). Adicionalmente, o alelo selvagem N86 de *pfmdr1* é um potencial marcador de resistência *in vivo* à lumefantrina, como foi observado em Zanzibar, onde a seleção deste alelo ocorreu após tratamento com a combinação arteméter mais lumefantrina, e na Uganda, em que foi observada a seleção dos alelos N86, 184F e D1246 após tratamento com a mesma combinação (SISOWATH et al., 2005; DOKOMAJILAR et al., 2006). Rohrbach et al. (2006) em trabalho utilizando o fluoróforo Fluo-4 demonstraram que a proteína PfDMR1 era capaz de transportá-lo para dentro do vacúolo digestivo do parasito. Este fenótipo ocorria somente em formas polimórficas de PfDMR1 que são associadas a respostas alteradas a drogas. Observou-se que na presença de mefloquina, halofantrina, quinino ou artemisinina, uma diminuição significante deste fluoróforo ocorria em clones de *P. falciparum* que albergam a PfDMR1 mutante, demonstrando uma competição destes antimaláricos pelo transporte por PfMDR1. A perda na capacidade de importar a droga é uma vantagem para o parasito se a droga tem como alvo o vacúolo digestivo, como parece ser o caso da cloroquina e do quinino (FITCH, 2004). Deste modo, as variantes de PfMDR1 que seriam selecionadas são aquelas que não contribuem para o acúmulo de droga e, consequentemente, para citotoxicidade para esta organela. Por outro lado, se uma droga não tem como alvo o vacúolo digestivo, então sua importação para dentro do vacúolo através de PfMDR1 pode ser mais vantajoso, pois mantém a droga em um compartimento onde é menos prejudicial ao parasito. Relatos de que a artemisinina e a mefloquina tem como alvo fatores citoplasmáticos são consistentes com esse último modelo (RUBIO e COWMAN, 1996; ECKSTEIN-LUDWIG et al., 2003).

A amplificação do número de cópias do *pfmdr1* foi relacionada à diminuição da sensibilidade à mefloquina e associa-se também a um valor maior de CI_{50} para antimaláricos do grupo dos aril-amino metanóis, como quinino e halofantrina (COWMAN et al., 1994). Sidhu e colaboradores (2006) também associaram o aumento no número de cópias do *pfmdr1* com resistência *in vitro* aos derivados de artemisinina, quinino e lumefantrina. Estudos realizados na região do Cambodia e da Tailândia mostraram que o aumento no número de cópias deste gene é responsável pela resistência à mefloquina e aumenta o risco de falha terapêutica ao artesunato mais mefloquina e arteméter mais lumefantrina (PRICE et al., 2004; 2006). Entretanto, alguns autores postularam que a amplificação do *pfmdr1* não é obrigatória para o aumento da resistência à mefloquina e sugerem que outros genes estariam envolvidos (JEFFRESS e FIELDS, 2005; LIM et al., 1996; RITCHIE et al., 1996).

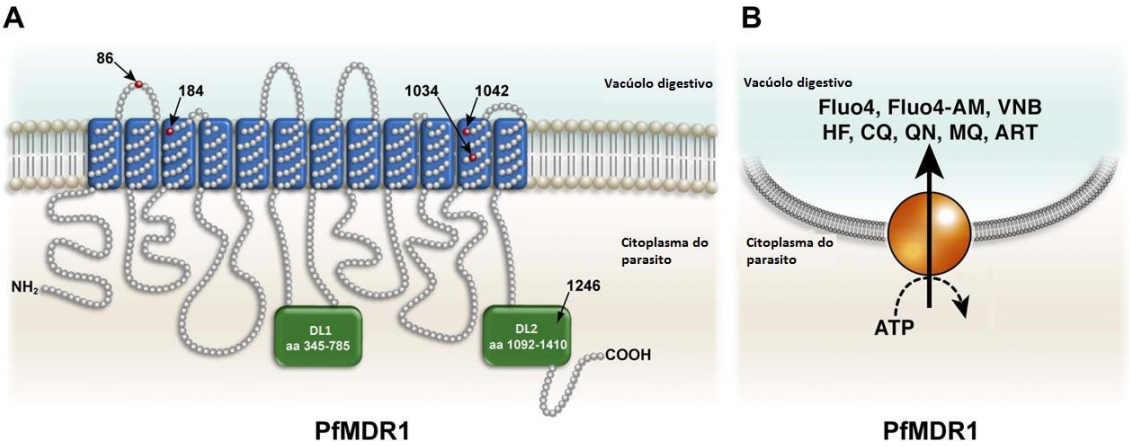


Figura 12 - Topologia e função da proteína PfMDR1. (A) Modelo topológico de PfMDR1. Setas em preto indicam aminoácidos polimórficos associados à resposta alterada de *P. falciparum* a antimaláricos. DL, domínio ligante. (B) Substratos propostos de PfMDR1. PfMDR1 parece bombear compostos, incluindo fluorocromos (Fluo-4, Fluo-4 AM) para dentro do vacúolo digestivo. CQ, cloroquina; QN, quinino; MQ, mefloquina; HF, halofantrina; ART, artemisinina
FONTE: Modificado de Sanchez et al., 2010

9.3 *pfmrp* E *pfnhe*

As mutações H191Y e S437A no gene *pfmrp* (*P. falciparum multidrug resistance-associated gene*), foram relacionadas a elevados valores de CI_{50} para o quinino. Este gene codifica a proteína PfMRP membro da subfamília C de transportadores ABC e expressa em todas as fases do *Plasmodium*. Acredita-se que esta proteína atue como uma bomba molecular, expelindo drogas e metabólitos para fora do parasito (RAJ et al., 2009). Outro gene associado à resposta ao quinino é o *pfnhe-1* (NaH *exchanger*), localizado no cromossomo 13 de *P. falciparum*, que codifica a proteína responsável pela troca Na^+/H^+ (FERDIG et al., 2004; BENNETT et al., 2007).

9.4 *pfdhfr* E *pfdhps*

O gene *pfdhfr* que codifica a proteína DHFR-TS foi relacionado com a resistência à pirimetamina por Peterson e colaboradores (1988) que mostraram sua localização no cromossomo 4 de *P. falciparum.* A análise da sequência revelou a mutação pontual S108N, codificando para asparagina (Asn-AAC) em lugar de serina (Ser-AGC). O estudo foi realizado em cepas e clones de regiões geográficas distintas, e os resultados mostraram que os parasitos sensíveis à pirimetamina continham treonina (Thr-ACC) ou serina (Ser-AGC) na posição 108 e todos os resistentes ao antimalárico continham a mutação 108N. Um clone altamente resistente à pirimetamina apresentou mutações adicionais N51I, com substituição de asparagina (Asn-AAT) por isoleucina (Ile-ATT), e C59R com substituição de cisteína (Cys-TGT) por arginina (Arg-CGT). Estas mutações pontuais e a I164L reforçam a resistência de *P. falciparum* aos antifolatos e o nível de resistência aumenta conforme o número de mutações

(BASCO e RINGWALD, 2000). Estudo realizado com amostras clínicas coletadas em nosso laboratório, procedentes de pacientes da Região Amazônica e utilizando PCR específico para a mutação 108N, revelou que esta estava presente em 90% dos isolados (PETERSON et al., 1991). Estes resultados foram consistentes com as falhas *in vivo* reportadas anteriormente com a associação pirimetamina/sulfadoxina (BOULOS et al., 1986).

Foi relatada em parasitos da América do Sul uma inserção repetitiva de cinco aminoácidos (GKKNE) entre os códons 30 e 31, denominada *Bolivia repeat*. A inserção desta repetição é encontrada em associação com a I164L e leva à falha terapêutica (BACON et al., 2009b).

Parasitos com as mutações A437G, substituição de alanina (Ala-GCT) por glicina (Gly-GGT), e K540E, substituição de lisina (Lys-AAA) por ácido glutâmico (Glu-GAA) no gene *pfdhps* apresentam fenótipo de resistência à sulfadoxina. As mutações A581G e A613T/S também podem contribuir para este fenótipo (HYDE, 2007). De acordo com alguns autores (BWIJO et al., 2003; KUBLIN et al., 2002), a dupla mutação em *pfdhps* (A437G e K540E) associada à tripla (N51I/C59R/S108N) no gene *pfdhfr* é considerada um marcador molecular para falha à combinação SP. Adicionalmente, as mutações quíntuplas podem criar condições necessárias para o surgimento da mutação I164L em *pfdhfr* e A581G em *pfdhps* (LYNCH et al., 2008). Mutações acumulativas em *pfdhfr* aumentam o tempo de clareamento parasitário e o risco de desenvolvimento de gametócitos. Embora SP permaneça eficaz em alguns países, o surgimento de uma ou duas mutações pode aumentar a transmissão de malária e dispersão da resistência (MENDEZ et al., 2002).

No Brasil, Vasconcelos et al. (2000) encontraram alto grau de homogeneidade em amostras de municípios de Mato Grosso com relação a à mutações nos genes *pfdhfr* e *pfdhps*, relacionados à resistência à SP, distintamente de Porto Velho. Gama et al. (2009) constataram que dentre sete haplótipos de Porto Velho e Paragominas, seis eram associados com resistência à pirimetamina. Com relação à *pfdhps* foram encontrados três haplótipos com as mutações 437G, 540E e 581G relacionados à resistência à sulfadoxina.

9.5 *pfATPase6* e *pfAP2-μ*

A diminuição da sensibilidade à artemisinina foi relacionada à substituição de serina (Ser-AGT) por asparagina (Asn-AAT) na posição 769 do gene *pfATPase6*, que codifica a proteína SERCA. Estudo realizado em amostras provenientes da Guiana Francesa sugere que esta mutação relaciona-se a diferentes graus de resposta *in vitro* do *P. falciparum* aos derivados de artemisinina (JAMBOU et al., 2005). Entretanto, estudos de campo realizados com amostras de Camarões e da China não confirmam a hipótese desta proteína como alvo das artemisininas (ZHANG et al., 2008; TAHAR et al., 2009).

Utilizando técnica de ressequenciamento do genoma completo, estudo realizado com a linhagem AS-ART de *P. chabaudi,* resistente aos derivados de artemisinina, revelou o SNP I568T no gene *AP2-μ*. Este gene codifica a cadeia mu (μ) do complexo adaptador AP2 que está envolvido, em outros organismos, no processo de endocitose. No gene ortólogo de *P. falciparum*, esta mutação ocorre na posição 592 (HENRIQUES et al., 2013). Estes dados sugerem um

caráter multigênico da resistência à artemisinina, como ocorre com os compostos quinoleínicos.

A avaliação *in vivo* da resistência deve ser criteriosa, visto que alterações nos esquemas de cura ou diferenças individuais de absorção, metabolismo e excreção das drogas, podem ser responsáveis por uma resposta inadequada. Portanto, o uso de marcadores moleculares é proposto como um mecanismo de monitoramento do genótipo de resistência.

Para que os órgãos responsáveis pelo controle da malária tenham capacitação para enfrentar o problema da resistência do *P. falciparum* aos diversos antimaláricos, faz-se necessário o conhecimento da epidemiologia da resistência, isto é, onde foram identificados os primeiros casos de falha de resposta à terapêutica utilizada, e como se deu a dispersão da resistência para outras regiões. Desta maneira torna-se possível, mediante o mapeamento das regiões-problema, a adoção de medidas profiláticas e terapêuticas alternativas. Os testes moleculares realizados simultaneamente à avaliação *in vivo* da sensibilidade do *P. falciparum* a antimaláricos possibilitam o mapeamento da resistência e de sua progressão. O surgimento de uma única cepa de *P. falciparum* resistente é suficiente para que os órgãos responsáveis pelo controle da endemia reconsiderem as recomendações terapêuticas, principalmente para os indivíduos não imunes (SPENCER, 1985).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. GERAL

Analisar o perfil genético relacionado à resposta de *P. falciparum* a antimaláricos ao longo de 27 anos, nos quais o parasito foi submetido à pressão seletiva de diferentes antimaláricos.

2. ESPECÍFICOS

2.1 Verificar a frequência de mutações nos genes de *P. falciparum* relacionados à resistência, nomeadamente, *pfcrt*, *pfmdr1*, *pfdhfr*, *pfdhps, pfATPase6* e *pfAP2-µ;*

2.2 Investigar a existência de associação entre o perfil genético e a resposta *in vivo* e *in vitro* aos antimaláricos.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

As coletas de amostras realizadas a partir do começo do estudo foram efetuadas em três unidades de saúde: (I) Hospital Municipal de Santarém, Pará; (II) Serviço de Endemias do Município de Alenquer, Pará (Figura 13) e (III) Laboratório de Malária/SUCEN localizado no Ambulatório dos Viajantes/HCFMUSP, São Paulo. Os ensaios laboratoriais foram realizados no Núcleo de Estudos em Malária/SUCEN localizado no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo/USP, São Paulo, Brasil e no Instituto de Higiene e Medicina Tropical/UNL, Lisboa, Portugal.

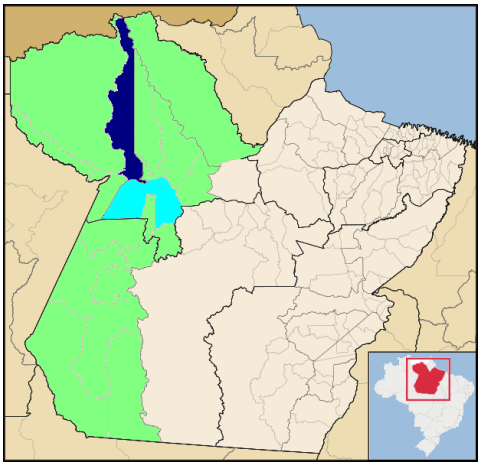


Figura 13 - Mapa do Estado do Pará destacando em azul escuro o município de Alenquer e em azul claro Santarém, que pertencem ao 9º Centro Regional de Saúde de Santarém (área em verde)
FONTE: http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Para_MesoMicroMunicip.svg

2. AMOSTRAS

Foram estudadas amostras retrospectivas de *P. falciparum,* provenientes do Biorrepositório do Núcleo de Estudos em Malária/SUCEN/IMTSP e amostras prospectivas, coletadas a partir do início do estudo de pacientes atendidos nas unidades de saúde participantes.

2.1 AMOSTRAS RETROSPECTIVAS

O painel de amostras retrospectivas foi composto por amostras de *P. falciparum* criopreservadas em nitrogênio líquido, integrantes do Biorrepositório do Núcleo de Estudos em Malária/SUCEN/IMTSP. Após descongelamento, 50 µL de cada amostra foram colocados em papel filtro Whatman 3® (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), em duplicatas e guardados em temperatura ambiente até o momento do uso. As amostras retrospectivas são representativas das seguintes décadas: 1980, 1990 e 2000.

2.2 AMOSTRAS PROSPECTIVAS

O painel de amostras prospectivas foi composto por amostras de sangue coletadas de pacientes com exame de gota espessa positivo para *P. falciparum*. Os pacientes foram convidados a participar do estudo mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I). As amostras foram colhidas em duplicatas através de punção digital em papel filtro Whatman 3® e cartão FTA® Elute (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia), conforme mostra a Figura 14, antes do início de tratamento e mantidas em temperatura ambiente até o momento do uso. A cada retorno do paciente para verificação de cura, mais uma amostra foi coletada para confirmação

molecular da parasitemia. Com relação às datas de coleta, este grupo abrange isolados coletados em 2010 e 2011.

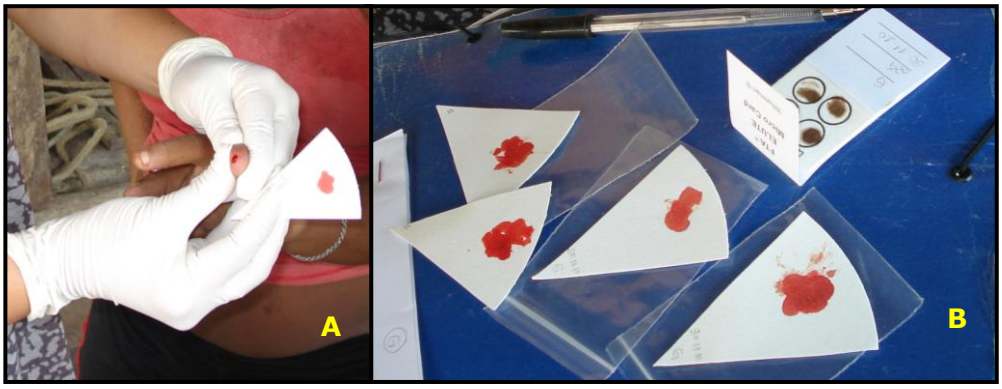


Figura 14 - Coleta de amostras. (A) coleta em papel filtro através de punção digital. (B) papel filtro e cartão FTA® Elute com amostras de sangue coletadas.

3. ASPECTOS ÉTICOS DO ESTUDO

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo de Pesquisa nº 0493/10) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde (Parecer Nº 206/2012 – Anexo II).

Foi obtida anuência do 9º Centro Regional de Saúde de Santarém (Anexo III) para que a coleta de amostras de pacientes atendidos em unidades de saúde desta região fosse realizada.

Este estudo foi realizado de acordo com as normas da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

4. SEGUIMENTO DOS PACIENTES

Quando confirmada a infecção por *P. falciparum*, o paciente foi orientado a retornar nos dias 3, 7, 14, 28, 42 e 56 após o início do tratamento para

realização de exame de verificação de cura, através do exame da gota espessa, conforme orientação do Ministério da Saúde.

5. IDENTIFICAÇÃO MICROSCÓPICA DA ESPÉCIE DE *Plasmodium*

O exame de gota espessa consistiu da coleta de sangue fresco do paciente por punção digital ou venosa. O sangue foi colocado em lâmina de vidro formando dois quadrados com cerca de 1,0 cm^2 e seco a temperatura ambiente ou em estufa. Para coloração, a lâmina foi mergulhada em azul de metileno que possui a função de corante e lisa os eritrócitos. Em seguida, a lâmina foi corada com Giemsa durante 7 minutos e lavada em água destilada por imersão. A lâmina foi então visualizada em microscópio óptico para a busca de parasitos em objetiva de 100x. O cálculo da parasitemia foi realizado mediante contagem do número de parasitos em 100 leucócitos e obtido o número por milímetro cúbico de sangue.

6. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA ESPÉCIE DE *Plasmodium*

6.1 EXTRAÇÃO DE DNA DE PAPEL FILTRO

O DNA das amostras em papel filtro Whatman 3® foi extraído de acordo com protocolo de Plowe et al., 1995, através do método de extração com Chelex® 100 (Bio-Rad™, Hercules, CA, USA).

Resumidamente, um pedaço de papel de filtro contendo a amostra de sangue foi incubado com 1,0 mL de saponina 0,5% em 1x PBS durante uma hora e 30 minutos a 37 ºC. Após incubação, a solução foi descartada e realizadas lavagens com PBS e nova incubação a 4 ºC, durante 30 minutos. A solução de lavagem foi descartada e 50 µL de Chelex® 100 a 20% foram

adicionados. As amostras foram fortemente homogeneizadas e incubadas a 100 ºC durante 10 minutos, com uma homogeneização no meio e no término da incubação. Duas centrifugações (10.000 x g/2 minutos) foram realizadas, a primeira para separar o papel filtro e a segunda para eliminar os resíduos de Chelex® em suspensão na amostra de DNA. Todas as amostras foram estocadas a -20 ºC.

6.2 EXTRAÇÃO DE DNA DE CARTÃO FTA® ELUTE

As coletas de amostras de sangue realizadas no estado do Pará foram feitas, adicionalmente ao papel filtro, em cartão FTA® Elute. A extração de DNA a partir deste cartão foi realizada conforme as indicações do fabricante. Resumidamente, um disco de 3,0 mm foi removido com o auxílio de um perfurador a partir do centro da mancha de sangue e transferido para um tubo de 1,5 mL. Foram adicionados 500 µL de água estéril ao tubo e fortemente homogeneizado durante cinco segundos. Após, o disco foi removido para um tubo de 0,5 mL contendo 30 µL de água estéril e centrifugado rapidamente por 10 segundos. O tubo foi transferido para bloco quente à 95 °C por 15 a 30 minutos, homogeneizado ao final da incubação e centrifugado por 30 segundos para separar a matriz do eluato, que contém o DNA. O disco foi removido e o DNA estocado a -20 °C até o momento do uso.

6.3 *NESTED* PCR

A confirmação de infecção única por *P. falciparum* foi realizada através da *nested* PCR, que consiste de duas reações de amplificação de fragmentos de DNA. Na primeira reação foram usados *primers* gênero-específicos, rPLU1

e rPLU5, que amplificam um fragmento de 1600 a 1700 pb e têm como alvo o gene que codifica a menor subunidade do ácido ribonucléico ribossomal (ssrRNA) 18S. Na segunda reação foram utilizados *primers* espécie-específicos (Tabela 1), que amplificam fragmentos de tamanhos diferentes para cada espécie de *Plasmodium*. O volume de reação foi de 25 µL em 2 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8,3 (HCl), 125 µM de dNTPs, 250 nM de cada *primer* e 0,4 U de *Taq* DNA polimerase (CALDERARO et al., 2007; SINGH et al., 1999; SNOUNOU et al., 1993).

Tabela 1 - *Primers* e condições de PCR utilizados na identificação molecular da espécie de *Plasmodium*

Primer	**Sequência 5' → 3'**	**Tamanho (pb)**	**Condições da PCR**
1ª reação			95 °C, 5' 58 °C, 2' 72 °C, 2' 94 °C, 1' } 25 ciclos 58 °C, 2' 72 °C, 5'
rPLU1	TCAAAGATTAAGCCATGCAAGTGA	1640	
rPLU5	CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC		
P. falciparum			95 °C, 5' 58 °C, 2' 72 °C, 2' 94 °C, 1' } 30 ciclos 58 °C, 2' 72 °C, 5'
rFAL1	TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT	205	
rFAL2	ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC		
P. vivax			
rVIV1	CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC	117	
rVIV2	ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA		
P. malariae			
rMAL1	ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC	144	
rMAl2	AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA		
P. ovale			
rOVA1	ATCTCTTTTGCTATTTTTTAGTATTGGAGA	787	
rOVA2	GGAAAAGGACACATTAATTGTATCCTAGTG		
P. ovale variante			
rOVA1v	ATCTCCTTTACTTTTTGTACTGGAGA	780	
rOVA2v	GGAAAAGGACACTATAATGTATCCTAATA		

6.4 ELETROFORESE

Os fragmentos obtidos após PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, preparado em 1x TBE. Foram adicionados 2 µL de *loading dye* e 1 µL de GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA) diluído 20x a 10 µL do produto de PCR para aplicação no gel. Um marcador de peso molecular de 100 pb foi usado. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal contendo 1x TBE durante 60 minutos, a 90 Vcm^{-1}. Os fragmentos foram visualizados através de luz UV em equipamento transiluminador (Loccus Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil).

7. ANÁLISE DE POLIMORFISMOS RELACIONADOS À RESISTÊNCIA ATRAVÉS DE TÉCNICAS MOLECULARES

7.1 GENES

Neste estudo foram analisados genes relacionados à resposta de *P. falciparum* à cloroquina, quinino, mefloquina, SP e derivados de artemisinina. A Tabela 2 indica os genes analisados neste estudo, sua localização cromossômica, bem como o polimorfismo pesquisado e a técnica utilizada.

Tabela 2 - Genes de *P. falciparum* relacionados à resistência a antimaláricos analisados neste estudo

Gene	Cromossomo	Polimorfismo	Técnica
pfcrt	7	SNP K76T	PCR-RFLP
pfmdr1	5	SNP N86Y	PCR-RFLP
		SNP D1246Y	PCR-RFLP
		Nº cópias	qPCR tempo real
pfdhfr	4	SNP N51I	PCR-RFLP
		SNP C59R	PCR-RFLP
		SNP S108N	PCR-RFLP
pfdhps	8	SNP A437G	PCR-RFLP
		SNP K540E	PCR-RFLP
pfATPase6	1	SNP S769N	PCR-RFLP
		SNPs	Sequenciamento
pfAP2-μ	12	SNPs	Sequenciamento

7.2 PCR-RFLP

Esta técnica consiste de amplificação de um fragmento do gene através da PCR, seguida por digestão com enzimas de restrição (LOPES et al., 2002; FERREIRA et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2008, MENDES et al., 2013), que reconhecem palíndromos originados ou eliminados devido a um polimorfismo. Os *primers* utilizados nas reações de amplificação estão descritos na Tabela 3. Visto que não há sítio de restrição no local em que ocorre a mutação S769N no gene *pfATPase6*, utilizou-se *primers* desenhados através do software PIRA-PCR (FERREIRA et al., 2008). Neste caso, uma base nitrogenada é inserida no *primer* na região da mutação de modo a criar um sítio para uma enzima de

restrição. Como controle para análise dos polimorfismos foi utilizado DNA dos clones 3D7 (genótipo *pfcrt* K76, *pfmdr1* N86, D1246, *pfdhfr* N51, C59, S108, *pfdhps* 437G, K540), Hb3 (genótipo *pfcrt* K76, *pfdhps* A437) e Dd2 (genótipo *pfcrt* 76T, *pfmdr1* 86Y, *pfdhfr* 51I, 59R, 108N).

O volume das reações para o códon 76 do gene *pfcrt* foi 50 µL em 1x tampão de PCR, 2 mM $MgCl_2$, 0,2 µM de cada *primer*, 0,2 mM dNTPs, 0,625 U de *Taq* DNA polimerase e 2 µL de DNA molde.

Para os códons 86 e 1246 do gene *pfmdr1* o volume de reação foi 20 µL em 1x tampão de PCR, 2,5mM $MgCl_2$, 1 µM de cada *primer*, 0,2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* DNA polimerase e 1 µL de DNA.

Para análise dos códons 51, 59 e 108 do gene *pfdhps* e 437 e 540 do gene *pfdhfr* foi realizada *nested* PCR com volume de reação de 20 µL em 1x tampão de PCR, 2,5mM $MgCl_2$, 1 µM de cada *primer*, 0,2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* DNA polimerase e 1 µL de DNA. As mesmas concentrações foram utilizadas na segunda PCR, porém com 0,5 µL do produto da primeira reação como *template*.

O volume das reações de amplificação para o códon 769 do gene *pfATPase6* foi de 25 µL em 1x tampão de PCR, 2,5 mM $MgCl_2$, 0,5 µM de cada *primer*, 0,2 mM dNTPs, 1,25 U de *Taq* DNA polimerase e 1 µL de DNA.

Após amplificação dos fragmentos por PCR, foram realizadas digestões enzimáticas em volume final de 20 µL com 0,2 µL de enzima, 2 µL de tampão e 10 µL do produto amplificado. As temperaturas de incubação utilizadas para cada enzima foram definidas de acordo com as instruções do fabricante. As enzimas e as condições de restrição encontram-se na Tabela 4.

Tabela 3 - *Primers* e condições de PCR para amplificação de fragmentos dos genes, *pfcrt*, *pfmdr1*, *pfdhfr*, *pfdhps* e *pfATPase6*

Gene	Códon	*Primer*	Sequência 5' → 3'	Condições PCR	
pfcrt	76	pfcrt76A	GCGCGCGCATGGCTCACGTTTAGGTGGAG	95 °C, 5'	1x
				92 °C, 30"	
				45 °C, 30"	45x
				65 °C, 45"	
		pfrcrt76B	GGGCCCGGCGGATGTTACAAAACTATAGTTACC	72 °C, 15'	1x
pfmdr1	86	pfmdr186OF	ATGGGTAAAGAGCAGAAAGAG	94 °C, 3'	1x
				94 °C, 45"	
				52 °C, 45"	45x
				72 °C, 1'	
		pfmdr186R	CGTACCAATTCCTGAACTCAC	72 °C, 5'	1x
	1246	pfmdr11246F	CTACAGCAATCGTTGGAGAAA	94 °C, 3'	1x
				94 °C, 45"	
				55 °C, 30"	35x
				72 °C, 45"	
		pfmdr11246R	GCTCTAGCTATAGCTATTCTC	72 °C, 10'	1x
pfdhfr	1ª reação	dhfrexF	TTTATGATGGAACAAGTCTGC	92 °C, 3'	1x
				92 °C, 30"	
				50 °C, 30"	45x
				72 °C, 1'	
		dhfrexR	AGTATATACATCGCTAACAGA	72 °C, 3'	1x
	2ª reação 51	dhfr51F	TTTATGATGGAACAAGTCTGCGACGTT	92 °C, 3'	1x
		dhfr51R	GATTCATTCACATATGTTGTAACTGCAC	92 °C, 1'	
	2ª reação 59	dhfr59 F	GAAATGTATTTCCCTAGATATGgAATATT	55 °C, 1'	45x
		dhfr59 R	TTAATT TCCCAAGTAAAACTATTAGATCTTC	72 °C, 1'	
	2ª reação 108	dhfr108F	TTTATGATGGAACAAGTCTGCGACGTT	72 °C, 3'	1x
		dhfr108R	AAATCCTTGATAAACAACGGAACCTTTTA		
pfdhps	1ª reação	dhpsF	AACCTAAACGTGCTGTTCAA	94 °C, 3'	1x
				94 °C, 1'	
				45 °C, 1'	40x
				72 °C, 1'	
		dhpsR	AATTGTGTGATTTGTCCACAA	72 °C, 3'	1x
	2ª reação 437	dhps437F	TGCTAGTGTTATAGATATAGGATGAGCATC	94 °C, 3'	1x
				94 °C, 1'	
		dhps437R	CTATAACGAGGTATTGCATTTAATGCAAGAA	45 °C, 1'	40x
	2ª reação 540	dhps540F	TGCTAGTGTTATAGATATAGGTGGAGAAAGC	72 °C, 1'	
		dhps540R	CTATAACGAGGTATTCCATTTAATACAAGAA	72 °C, 5'	1x

Tabela 3 (continuação) **-** *Primers* e condições de PCR para amplificação de fragmentos dos genes, *pfcrt*, *pfmdr1*, *pfdhfr*, *pfdhps* e *pfATPase6*

Gene	Códon	*Primer*	Sequência 5' → 3'	Condições PCR	
pfATPase6	769	pfATP6769SF	ACTTAGCTTTGCTTATAAAAACTTAA	94 °C, 3'	1x
				94 °C, 45"	
				54 °C, 45"	40x
				72 °C, 45"	
		pfATP6769SR	AATTATCCTTTTCATCATCTCC	72 °C, 3'	1x

Tabela 4 - Enzimas de restrição e tamanho dos fragmentos obtidos após incubação para análise de polimorfismos pontuais nos genes *pfcrt, pfmdr1, pfdhfr, pfdhps* e *pfATPase6*

Gene	Códon	Tamanho do fragmento pós-PCR (pb)	Enzimas de restrição e temperatura de incubação	Tamanho dos fragmentos pós- incubação (pb)
pfcrt	76	206	*ApoI* - 50 ºC	144 + 62 - selvagem 206 - mutante
pfmdr1	86	504	*ApoI* - 50 ºC	255 + 249 - selvagem 504 - mutante
	1246	508	*Eco321* - 37 ºC	268 + 240 - mutante 508 - selvagem
pfdhfr	51	206	*TasI* - 65 ºC	153 + 53 - selvagem 206 - mutante
	59	326	*PdmI* - 37 ºC	189 + 137 - selvagem 163 + 137 + 26 - mutante
	108	522	*AluI - 37 ºC*	326 + 196 - selvagem 522 mutante
pfdhps	437	438	*HpyF10VI* - 37 ºC	387 + 32 + 19 - selvagem 419 + 19 - mutante
	540	438	*BsegI* - 55 ºC	438 - selvagem 354 + 84 - mutante
pfATPase6	769	272	*BspTI* - 37 ºC	250 + 22 - selvagem 272 - mutante

7.3 ELETROFORESE

Um volume de 10 µL dos produtos da digestão foi aplicado em gel de agarose 2% 1x TBE, corado com brometo de etídio para análise do resultado

da PCR-RFLP dos genes *pfcrt*, *pfmdr1*, *pfdhfr* e *pfdhps*. Após corrida de 60 minutos a 110 Vcm^{-1}, o gel foi visualizado através de luz UV e fotografado em transiluminador UVIDOC (Uvitec®, Cambridge, UK).

Um volume de 15 µL dos produtos da digestão foi aplicado em gel de agarose 2,5% 1x TBE, juntamente com 2 µL de *loading dye*, para análise do códon 769 do gene *pfATPase6*. Após corrida de 90 minutos a 140 Vcm^{-1}, o gel foi corado em solução de GelRed 3x em NaCl 0,1 M e visualizado através de luz UV em transiluminador (Loccus Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil).

7.4 PCR TEMPO REAL

A análise do número de cópias do gene *pfmdr1* foi realizada através da PCR quantitativa em tempo real com *SYBR Green I*, em placas de 96 poços. O volume de reação foi de 20 µL em 1x iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad™, Hercules, CA, USA), 300 nM de cada *primer* (Tabela 5) e 2 µL de DNA. As reações foram efetuadas no aparelho iCycler iQ Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio Rad™, Hercules, CA, USA), utilizando o programa pré-definido de ciclagem: 10 minutos de incubação inicial a 95 ºC seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 ºC e 1 minuto a 60 ºC. Curva de *melting* foi obtida com um ciclo de 10 minutos a 95 ºC.

Há dois métodos para quantificação da expressão gênica através de PCR em tempo real. O método de quantificação relativa quantifica a expressão gênica através do sinal de PCR do alvo transcrito em um grupo controle tratado em relação ao da amostra do grupo controle não tratado, por exemplo. A quantificação absoluta é mais acurada, porém requer elaboração de curva padrão para cada gene estudado, que deve ser corrida em cada experimento,

aumentando os custos e diminuindo o rendimento da reação. Foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de quantificação relativa adaptado para estimar o número de cópias de *pfmdr1*. Este método requer dois pré-requisitos principais. O primeiro é a existência de pelo menos um calibrador com número de cópias conhecido de cada um dos genes estudados. Neste caso foi utilizado DNA dos clones de *P. falciparum* 3D7, que possui uma cópia do gene *pfmdr1* e Dd2, que possui quatro. O segundo requisito é a necessidade de um gene *house keeping* com número de cópias constante em todas as amostras para normalização dos dados. Para este propósito foi utilizado o gene *pfβactin1.* As amostras foram ensaiadas em triplicata para os dois genes e o Ct (*cycle threshold*) de cada poço foi registrado. Foram calculados a média e o desvio padrão dos três Cts e o valor da média era aceito caso o desvio padrão fosse menor que 0,38. Todas as amostras cujas triplicatas apresentaram desvio padrão maior que 0,38 foram ensaiadas novamente. Os resultados foram expressos em N-vezes em relação ao número de cópias de *pfmdr1* em *P. falciparum* 3D7. Nos casos em que o valor de N-vezes estava entre 0,7 e 1,3, aceitou-se que a amostra em questão continha uma cópia de *pfmdr1*. (FERREIRA et al., 2006; CHAIJAROENKUL et al., 2010).

Tabela 5 - Sequências dos p*rimers* utilizados na PCR em tempo real para quantificação relativa do número de cópias do gene *pfmdr1* e tamanho do fragmento obtido

Gene	*Primers*	Sequência 5'→ 3'	Tamanho do fragmento (pb)
pfβactina1	senso antisenso	CGGATCAGGTAATGTAAAAGC CCTGGATTCTTTGGTCTTCC	90
pfmdr1	senso antisenso	CAAGTGAGTTCAGGAATTGGTAC GCCTCTTCTATAATGGACATGG	230

7.5 SEQUENCIAMENTO

Foram selecionadas 19 amostras para sequenciamento dos genes *pfATPase6* (3996 pb) e *pfAP2-μ* (1866 pb). Para esta finalidade, foram amplificados fragmentos sobrepostos de forma que cada gene completo fosse sequenciado. Para o gene *pfATPase6* foram amplificados cinco fragmentos sobrepostos e para o gene *pfAP2- μ* três (Figuras 15 e 16).

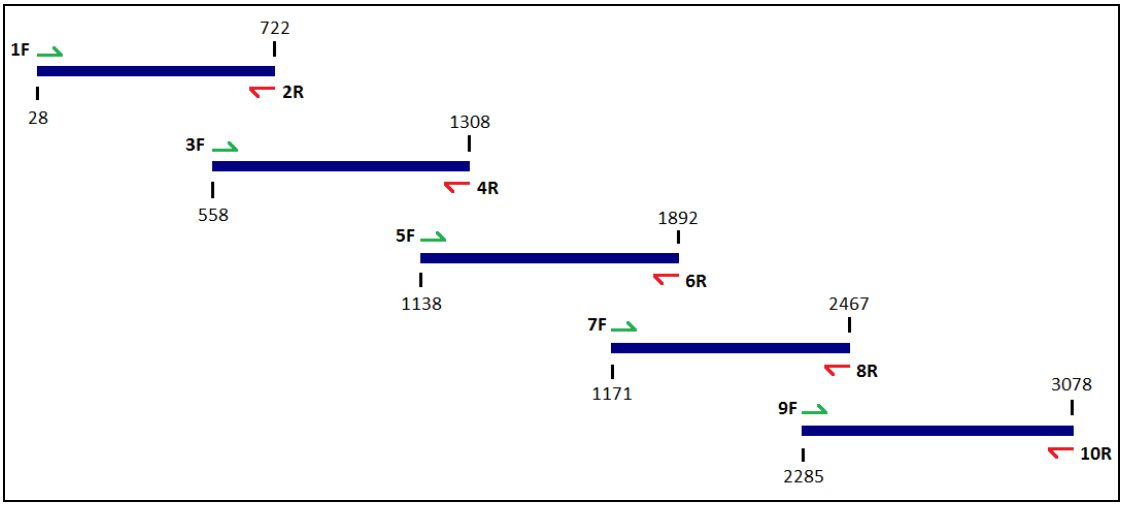


Figura 15 - Ilustração esquemática dos fragmentos (em azul) amplificados por PCR para sequenciamento do gene *pfATPase6*, indicando a posição de início e término de cada fragmento no gene. As setas em verde indicam *primers* senso e em vermelho os *primers* antisenso.

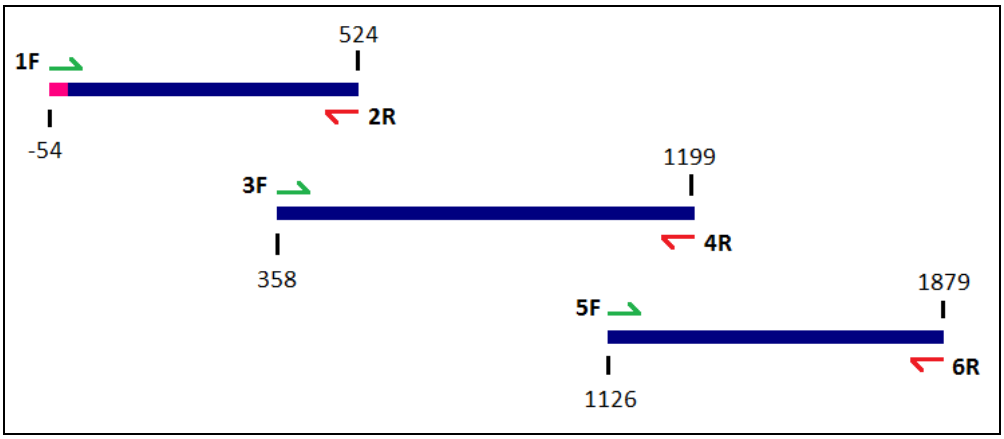


Figura 16 - Ilustração esquemática dos fragmentos (em azul) amplificados por PCR para sequenciamento do gene *pfAP2-μ*, indicando a posição de início e término de cada fragmento no gene. As setas em verde indicam *primers* senso e em vermelho os *primers* antisenso. O *primer* 1F hibridiza em local anterior ao início do gene (fragmento em rosa).

O volume das reações de amplificação dos fragmentos do gene *pfATPase6* foi de 25 µL em 1x tampão de PCR, 2,5 mM $MgCl_2$, 0,5 µM de cada *primer* (Tabela 6), 0,2 mM dNTPs, 0,05 U/µL de *Taq* DNA polimerase e 1 µL de DNA.

Tabela 6 - *Primers*, tamanho dos fragmentos e condições de PCR utilizados para amplificação de cinco fragmentos sobrepostos do gene *pfATPase6*

	Primers	**Sequência 5' →3'**	**Tamanho (pb)**	**Condições PCR**	
Fragmento 1	1F	CATACGATGTTGAGGATGTAC	694	94 ºC, 3' 94 °C, 30" 53 °C, 45" 72 °C, 60" 72 °C, 10'	40 ciclos
	2R	GACCTATTTCAGTCTTCATACC			
Fragmento 2	3F	GAGAATCCTGTTCAGTTGAC	750	94 ºC, 3' 94 °C, 30" 52 °C, 45" 72 °C, 60" 72 °C, 10'	40 ciclos
	4R	ATCCTTCTTCTCCATCATCC			
Fragmento 3	5F	ACCGTGTTTCATTTGTTTAGAG	754	94 ºC, 3' 94 °C, 30" 53 °C, 45" 72 °C, 60" 72 °C, 10'	40 ciclos
	6R	CCATTTGTTGTTGCCTGAGC			
Fragmento 4	7F	AATCACCAAGGGGTATCAAC	696	94 ºC, 3' 94 °C, 30" 52 °C, 45" 72 °C, 60" 72 °C, 10'	40 ciclos
	8R	ACGTATACCAGCCATATGG			
Fragmento 5	9F	TTCAAAATATGGGAAAAAGAGCA	793	94 ºC, 3' 94 °C, 30" 53 °C, 45" 72 °C, 60" 72 °C, 10'	40 ciclos
	10R	TGTTGCTGGTAATCCGTCAG			

O volume das reações de amplificação do primeiro e último fragmentos do gene *pfAP2-μ* foi de 50 µL em 1x tampão de PCR, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 µM de cada *primer* (Tabela 7), 0,2 mM de dNTPs, 1,25 U de *Taq* DNA polimerase e 1,0 µL de DNA. O fragmento intermediário do gene *pfAP2-μ* foi amplificado através de *nested* PCR nas condições a seguir: 25 µL de volume total em 1x tampão de PCR, 4 mM de $MgCl_2$, 0,2 µM de cada *primer*, 0,4 mM de dNTPs, 1 U de *Taq* DNA polimerase e 5 µL de DNA na primeira reação. A segunda reação foi realizada com as mesmas concentrações e 5 µL do produto da primeira. Nas amostras em que não foi possível a amplificação do segundo fragmento como par de *primers* PfClR-3F e PfClR-4R, outro *primer* (PfClR-3Fn) foi desenhado e utilizado (FERREIRA et al., 2007; HENRIQUES et al., 2013)

O produto da PCR foi submetido à purificação com QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante e quantificado com Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) em gel de agarose 2% em 1x TBE. Este método de quantificação baseia-se na intensidade da banda do produto purificado em comparação com o marcador de peso molecular fornecido.

O produto purificado foi encaminhado para o serviço de sequenciamento do Centro de Estudos do Genoma Humano/USP e cada amostra foi sequenciada nos sentidos senso e antisenso.

Tabela 7 - *Primers,* tamanho dos fragmentos e condições de PCR utilizados para amplificação de fragmentos sobrepostos do gene *pfAP2-µ*

	Primers		**Sequência 5' → 3'**	**Tamanho (pb)**	**Condições PCR**	
Fragmento 1	PfClR-1F		GTTAACACGATTAGCGTCATTTG	578	94 ºC, 3' 94 °C, 30" 53 °C, 45" 72 °C, 60" 72 °C, 10'	35 ciclos
	PfClR-2R		GTCCTATTATGTATATGTGGATC			
Fragmento 2	1ª reação	F	AAGACTGTCAAATGTAAAAGACCC	2247	94 ºC, 3' 94 °C, 30" 50 °C, 30" 68 °C, 60" 68 °C, 15'	30 ciclos
		R	CTCATGTAAAACAAAAAGTGAGG			
	PfClR-3F		GATATCCACAAACATTAGAAGTG	841	94 ºC, 3' 94 °C, 30" 52 °C, 30" 68 °C, 45" 68 °C, 15'	40 ciclos
	PfClR-3Fn		TGGATATCCACAAACATTAGAAG			
	PfClR-4R		CCATCTGGTGGTGTGAAGG			
Fragmento 3	PfClR-5F		GCATATTTCATCATTGTGTTACC	753	94 ºC, 3' 94 °C, 30" 53 °C, 45" 72 °C, 60" 72 °C, 10'	35 ciclos
	PfClR-6R		ACACCCGATTGAACTATTTATAC			

Para análise das sequências do gene *pfATPase6* foi utilizado o programa de bioinformática CLC Genomic Workbench (CLC Bio, Qiagen, Hilden, Alemanha). A análise das sequências do gene *pfAP2- µ* foi realizada em programa *online* (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/). Utilizou-se como referência para composição dos *contigs* as sequências de cada um dos genes do clone de referência 3D7 depositadas no banco de dados *PlasmoDB:* PF3D7_0106300 para *pfATPase6* e PF3D7_1218300 para *pfAP2- µ*.

8. TESTES *IN VITRO*

Foram realizados testes de sensibilidade *in vitro* à cloroquina, quinino e mefloquina para estabelecimento de concentração mínima inibitória (CMI). Os isolados foram expostos a diferentes concentrações das drogas, por 72 horas, em microplacas pré-doseadas fornecidas pela OMS e mantidos em *candle jar* em estufa a 37 ºC. As concentrações utilizadas foram 10, 20, 40, 57, 80, 160 e 320 nM para cloroquina; 40, 80, 160, 640, 1280 e 2560 nM para quinino e 5, 10, 20, 40, 57, 80 e 160 nM para mefloquina. A avaliação da resposta aos antimaláricos foi realizada através da contagem do número de esquizontes/200 parasitos em lâminas coradas com Giemsa, usando como controle microculturas realizadas nas mesmas condições, porém sem adição da droga. Os isolados de referência Palo Alto e K1 foram utilizados como controle para resposta sensível e resistente à cloroquina, respectivamente (DI SANTI et al, 1988).

9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados relacionados às amostras e resultados dos testes moleculares foram inseridos em tabela do Excel 2007. Os estudos de associação foram realizados em programa estatístico *GraphPad QuickCalcs* disponível *online* (http://www.graphpad.com/quickcalcs/). O Teste Exato de Fisher foi aplicado para busca de associações entre as respostas *in vivo* ou *in vitro* aos antimaláricos e a presença de mutações nos genes estudados. As associações foram consideradas estatisticamente significantes se $p<0,05$.

RESULTADOS

1. AMOSTRAGEM

Foram selecionadas 84 amostras retrospectivas sorteadas através da ferramenta “Aleatório” do Excel 2007.

Com relação às amostras prospectivas foram coletadas: (I) 32 amostras de sangue de pacientes atendidos no Hospital Municipal de Santarém, PA; (II) nove amostras de sangue de pacientes atendidos pelo Serviço de Endemias do Município de Alenquer, PA, e (III) 12 amostras de sangue de pacientes atendidos no Laboratório de Malária/SUCEN localizado no Ambulatório dos Viajantes/HCFMUSP.

Foram excluídas duas amostras retrospectivas, três coletadas em Santarém e duas coletadas em Alenquer devido ao resultado negativo da PCR para identificação da espécie de *Plasmodium*. Desta forma, a amostragem final que foi analisada para a genotipagem dos polimorfismos relacionados à resistência foi de 130 amostras. A Tabela 8 mostra a origem das amostras e as décadas em que foram coletadas.

Tabela 8 - Década de coleta, número de amostra por década e por local de origem das amostras analisadas neste estudo

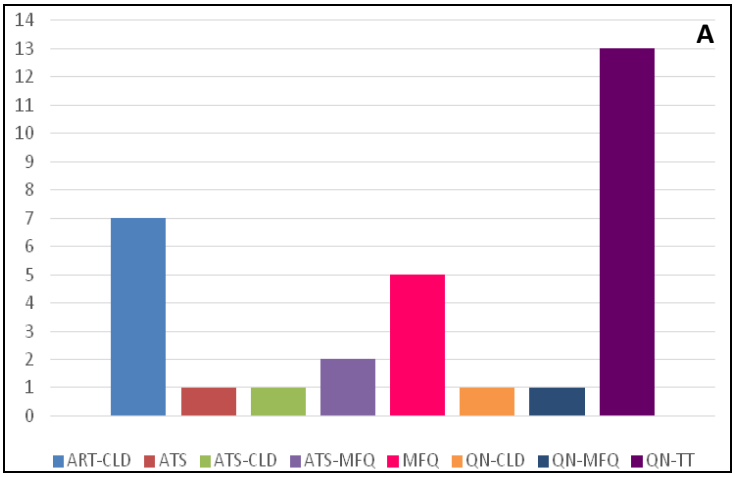
Década de coleta	Número de amostras/ década	Local de origem	Número de amostras/local
1980	27	Brasil, PA	5
		Brasil, RO	11
		Brasil, RR	3
		Brasil, MT	6
		Brasil, Amazônia Legal	1
		Indonésia	1
1990	39	Brasil, PA	3
		Brasil, RO	4
		Brasil, MT	31
		Angola	1
2000	16	Brasil, RO	3
		Brasil, AP	1
		Angola	5
		Malawi	2
		Moçambique	1
		Nigéria	2
		Serra Leoa	2
2010	48	Brasil, AC	1
		Brasil, PA	27
		Angola	3
		Costa do Marfim	2
		Gana	1
		Moçambique	1
		Nigéria	2
		Haiti	1
		Guiana Francesa	1
		Guiana	7
		Suriname	1
		Indonésia	1
TOTAL		**130**	

2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA ESPÉCIE DE *Plasmodium*

A PCR para confirmação de infecção única por *P. falciparum* obteve resultado positivo em 130 amostras. Não foi possível amplificação de duas amostras retrospectivas: uma amostra coletada na década de 1990 e outra de 2000, três amostras coletadas no Hospital Municipal de Santarém e duas amostras coletadas no município de Alenquer em 2011, devido à baixa parasitemia ou a problemas relacionados à extração de DNA. Estas seis amostras com resultado negativo para *P. falciparum* foram excluídas das análises realizadas posteriormente dos polimorfismos relacionados à reposta aos antimaláricos.

3. ACOMPANHAMENTO DOS PACIENTES

Do total de amostras analisadas neste estudo, 49 eram provenientes de pacientes em que foi possível realizar o seguimento de pelo menos 28 dias para acompanhamento da resposta ao tratamento. Destes, 31 apresentaram resposta sensível ao antimalárico utilizado sem ocorrência de recrudescência no período de seguimento e 18 apresentaram recrudescência. A Figura 17 mostra o número de amostras de pacientes que recrudesceram e que responderam adequadamente a cada tratamento.



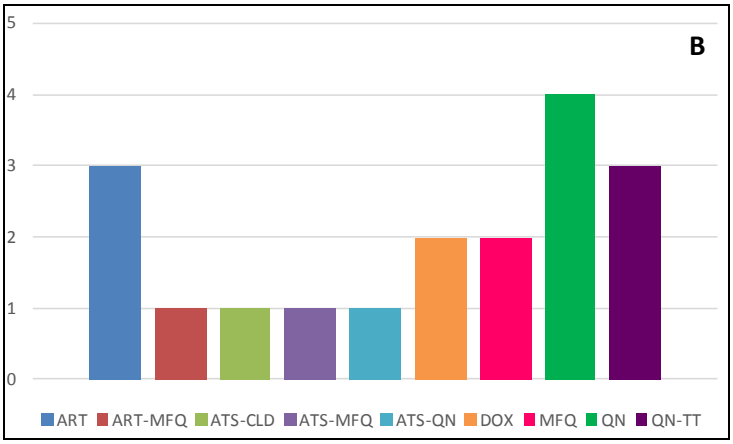


Figura 17 - Número de pacientes que responderam adequadamente ao tratamento (A) e número de pacientes que apresentaram recrudescência (B) durante o período de acompanhamento. ART, artemeter; ART-MFQ, artemeter e mefloquina; ATS-CLD, artesunato e clindamicina; ATS-MFQ, artesunato mais mefloquina; ATS-QN, artesunato e quinino; DOX, doxiciclina; MFQ, mefloquina; QN, quinino; QN-TT, quinino e tetraciclina; QN-MFQ, quinino e mefloquina.

4. GENOTIPAGEM

4.1. *pfcrt* – CÓDON 76

Ao todo foram analisadas 129 amostras para o códon 76 do gene *pfcrt*, não sendo possível a amplificação de uma amostra para este gene. Como controle para a mutação foi utilizado o clone Dd2, que não possui sítio de restrição para *ApoI* e o clone Hb3, como controle para o genótipo selvagem, que possui restrição para a enzima. Todas as amostras brasileiras apresentaram a mutação K76T ao longo dos 27 anos, conforme é possível observar na Figura 18. Todas as amostras dos demais países da América do Sul também apresentaram a mutação K76T. Com relação aos isolados provenientes de países africanos, coletados nas décadas de 1990, 2000 e 2010, o genótipo selvagem K76 foi encontrado em 31,8% das amostras, o mutante 76Y em 45,5% e misto K+Y em 22,7%. Serra Leoa, Malaui, Moçambique e Gana são os países que apresentaram o genótipo selvagem K76. O isolado do Haiti continha o genótipo selvagem K76. As duas amostras da Indonésia apresentaram a mutação K76T. A distribuição geográfica do mutante 76T ao longo das quatro décadas de estudo pode ser visualizada na Figura 19.

4.2. *pfmdr1* – CÓDONS 86 E 1246

Com relação ao códon 86, o genótipo selvagem foi detectado em 100% das amostras brasileiras da década de 1980, 95% em 1990 e 100% em 2000. Na década de 2010, esta porcentagem caiu para 71,4% e todos os isolados mutantes eram do estado do Pará (Figura 18). Resultado semelhante foi

encontrado nas amostras da Guiana coletadas na década de 2010, com 43% apresentando a mutação N86Y. As amostras da Guiana Francesa e do Suriname apresentaram o genótipo selvagem N86. Nos isolados africanos, o genótipo selvagem foi encontrado em 63,6% das amostras, o mutante em 27,3% e misto em 9,0%.

Todas as amostras de países sul-americanos apresentaram a mutação D1246Y em todas as décadas, assim como os dois isolados da Indonésia. Com relação aos países africanos, todas as amostras apresentaram o genótipo selvagem D1246, com exceção de uma amostra do Malaui, que apresentou a mutação 1246Y. O isolado do Haiti apresentou o alelo selvagem nas duas posições. A distribuição geográfica das mutações no gene *pfmdr1* ao longo das quatro décadas de coleta é representada na Figura 19.

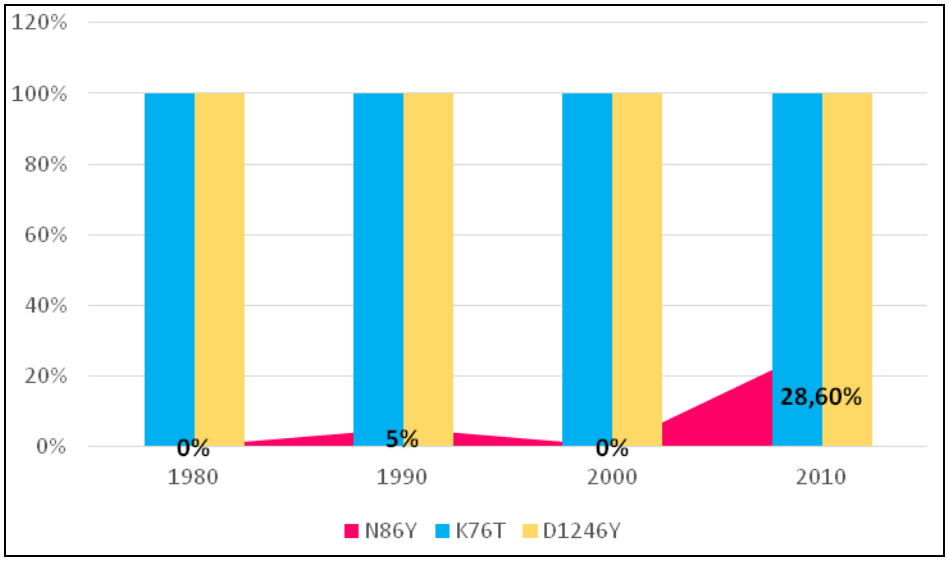


Figura 18 - Distribuição das mutações em *pfcrt* e *pfmdr1* em amostras brasileiras ao longo das décadas de 1980 a 2010: detecção de K76T e D1246Y em todos os isolados e surgimento de N86Y na última década

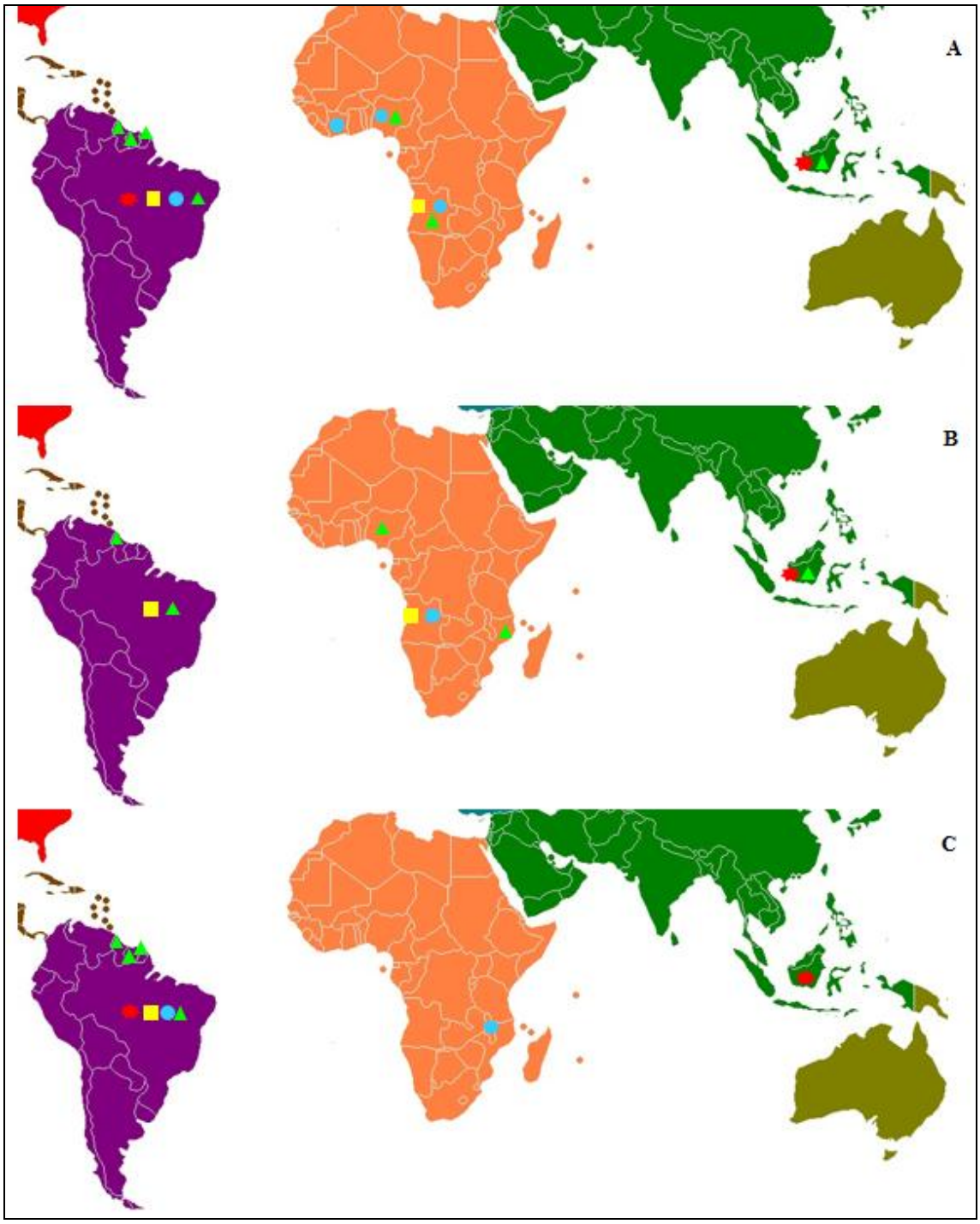


Figura 19 - Distribuição geográfica das mutações *pfcrt* K76T (A), *pfmdr1* N86Y (B) e D1246Y (C) ao longo das quatro décadas estudadas: 1980 (✸), 1990 (■), 2000 (●) e 2010 (▲)

4.3. *pfdhfr* – códons 51, 59 e 108 e *pfdhps* – códons 437 e 540

Foram analisadas 96 amostras brasileiras para os códons 51, 59 e 108 do gene *pfdhr*, através da PCR-RFLP. Considerando o período 1980-1990, foram analisadas 64 amostras e 100% apresentaram as mutações N51I e S108N. Na posição 59, todas as amostras apresentaram o genótipo selvagem C59. Com relação ao período 2000-2010, foram analisadas 32 amostras do Brasil, exceto para a posição 59, em que não foi possível amplificar uma amostra. Neste período, 81,25% das amostras apresentaram a mutação N51I e 18,75% genótipo misto N+I. Para o códon 59, 77,4% das amostras continham o genótipo selvagem C59, 16,1% misto C+R e 6,5% o mutante C59R. Todos os isolados deste período apresentaram a mutação S108N. Estes resultados são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Frequência de genótipos selvagem (s), mutante (mt) e misto nos códons 51, 59 e 108 do gene *pfdhfr* em amostras brasileiras dos períodos 1980-1990 e 2000-2010

Período	51			59			108	
	s N	mt I	misto N+I	s C	mt R	misto C+R	s S	mt N
1980-1990	0%	100%	0%	100%	0%	0%	0%	100%
2000-2010	0%	81,25%	18,75%	77,40%	6,50%	16,10%	0%	100%

Com relação aos códons 437 e 540 do gene *pfdhps*, foram analisadas 96 amostras brasileiras. Considerando o período de 1980-1990, as 64 amostras apresentaram a mutação A437G. No códon 540, 93,7% apresentaram a mutação K540E, 4,6% o genótipo selvagem K540 e 1,7% misto K+E. No período 2000-2010, a mutação A437G manteve-se presente em 100%

das amostras. Para o códon 540, 75% foram mutantes K540E e 25% selvagem K540. Estes dados são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Frequência de genótipos selvagem (s) e mutante (mt) nos códons 437 e 540 do gene *pfdhps* em amostras brasileiras dos períodos 1980-1990 e 2000-2010

Período	437		540	
	s A	mt G	s K	mt E
1980-1990	0%	100%	4,60%	95,40%
2000-2010	0%	100%	25%	75%

Com relação às amostras dos outros países sul-americanos todas apresentaram o genótipo selvagem nas posições 51 e 59 de *pfdhfr*, exceto uma amostra da Guiana Francesa que apresentou genótipo misto I+N na posição 51 e uma amostra da Guiana que apresentou genótipo misto C+R na posição 59. Todos os isolados apresentaram o mutante 108N. Na análise do gene *pfdhps* todas as amostras apresentaram os mutante 437G e 540E, exceto uma amostra em que não foi possível a amplificação na posição 437.

O isolado do Haiti apresentou genótipo misto I+N na posição 51 e selvagem nas posições 59 e 108 de *pfdhfr*. Com relação ao gene *pfdhps*, apresentou alelos selvagens nas duas posições: 437 e 540.

Com relação às amostras da Indonésia, o isolado da década de 1980 apresentou genótipo selvagem em todas as posições de *pfdhfr*. No gene *pfdhps* continha o alelo mutante para o códon 437 e selvagem para 540. O isolado da década de 2010 apresentou genótipo misto I+N na posição 51 de

pfdhfr e selvagem nas posições 59 e 108. No gene *pfdhps* este isolado apresentou genótipo mutante no códon 437 e selvagem no códon 540.

Adicionalmente, foi analisada a ocorrência de quíntuplas mutações nas posições 51, 59 e 108 de *pfdhfr* e 437 e 540 de *pfdhps*, considerado um marcador de resistência à combina SP. Nas amostras brasileiras do período 1980-1990, o quíntuplo mutante não foi encontrado, 95,3% das amostras apresentaram mutação quádrupla (ICNGE) e 4,7% mutação tripla (ICNGK). No período 2000-2010, foi detectada mutação quíntupla IRNGE em 12,9% das amostras e quádrupla em 61,3% (ICNGE) e 9,7% (IRNGK). Também foram detectadas mutações triplas (ICNGK) em 16,1% das amostras (Figura 20).

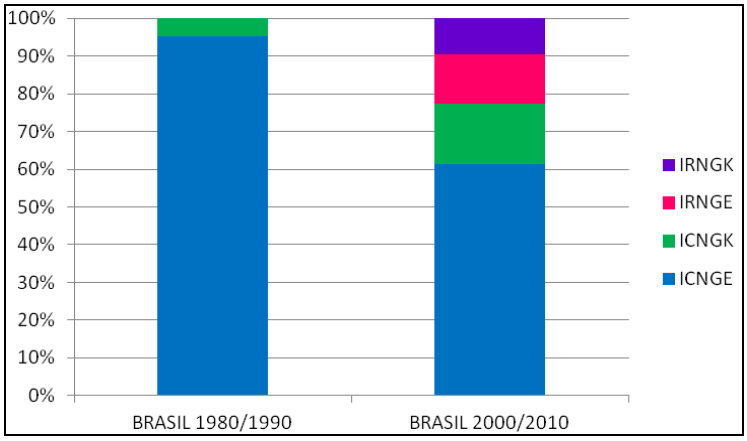


Figura 20 - Distribuição das frequências de mutações quíntupla (IRNGE), quádruplas (ICNGE e IRNGK) e tripla (ICNGK) nos genes *pfdhfr* e *pfdhps,* em isolados brasileiros de *Plasmodium falciparum* em dois diferentes períodos

Nas amostras africanas o quíntuplo mutante IRNGE foi observado em 9,1% das amostras. O quádruplo mutante IRNGK foi detectado em 31,8% e o ICNGE em 4,5%. Três combinações de mutação tripla foram observadas:

ICNGK (36,4%), IRNAK (13,7%) e NRNGK (4,5%). Estes resultados são apresentados na Figura 21.

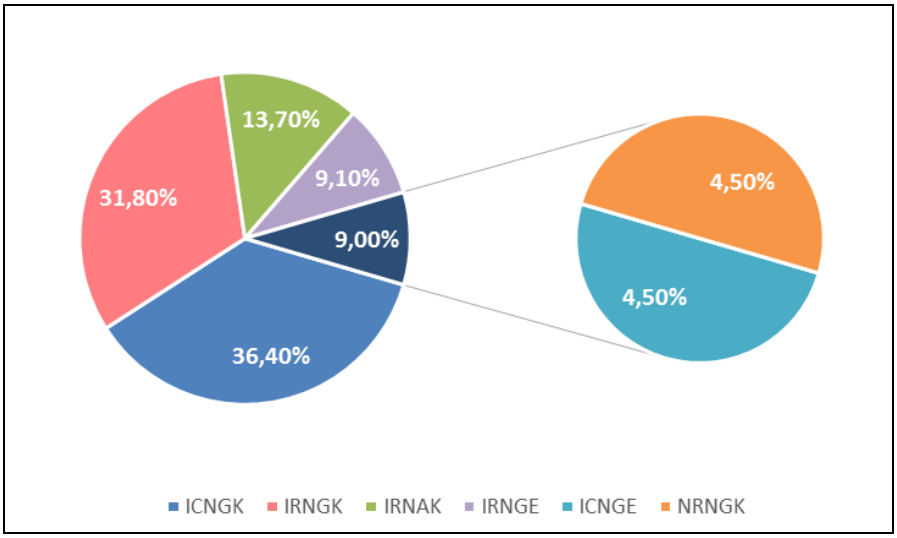


Figura 21 - Distribuição das frequências de mutações quíntupla (IRNGE), quádruplas (IRNGK e ICNGE) e triplas (ICNGK, IRNAK e NRNGK) nos genes *pfdhfr* e *pfdhps,* em isolados africanos de *Plasmodium falciparum* coletados no período de 2000 a 2011

4.4. *pfATPAase6* – CÓDON 769

No total, 118 amostras foram ensaiadas para verificação de polimorfismo no códon 769, conforme protocolo descrito anteriormente. Nenhuma amostra apresentou a mutação S769N, como exemplificado na Figura 22. Como controle positivo para o polimorfismo foi utilizada uma amostra pós-PCR não submetida à incubação para restrição com *BspTI*, visto que o mutante não apresenta sítio de reconhecimento da enzima.

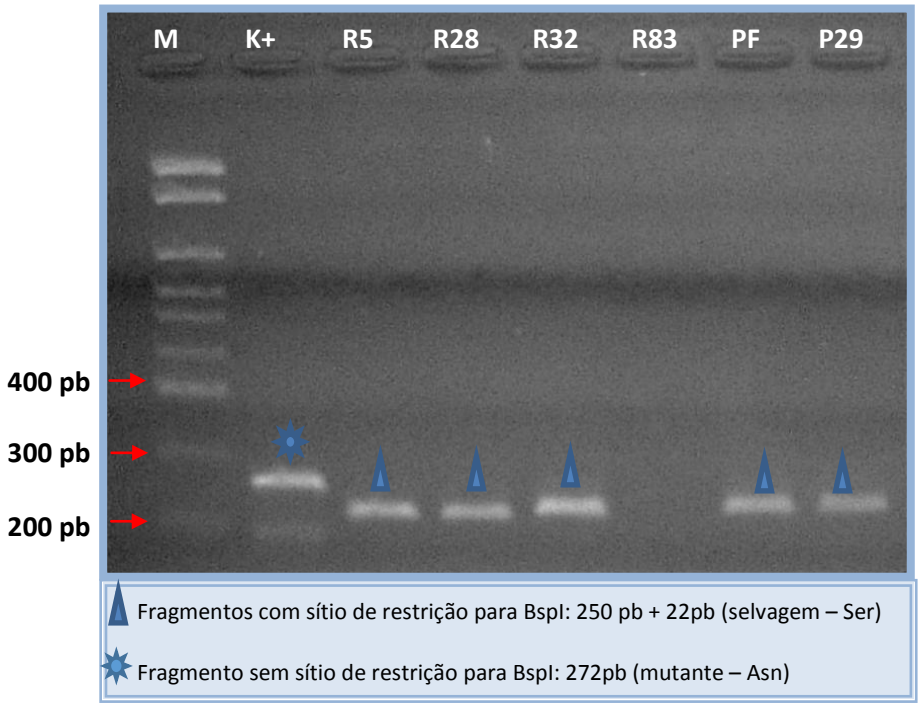


Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose, de amostras de *P. falciparum* submetidas à PCR-RFLP para análise de polimorfismo no códon 769 do gene *pfATPase6*. K+, amostra não digerida; M, *ladder* 100pb.

5. NÚMERO DE CÓPIAS DE *pfmdr1*

Foram analisados 98 isolados provenientes de países da América do Sul. Na década de 1980, 56.5% continham uma cópia do gene *pfmdr1*, em 1990 66,5%, em 2000 25% e em 2010 60%. Com relação aos isolados africanos, em 1990 somente uma amostra foi analisada e continha um cópia do gene. Amostras com uma cópia das décadas de 2000 e 2010 representam, respectivamente, 58% e 75%. A amostra proveniente do Haiti continha uma cópia do gene e as duas amostras da Indonésia apresentaram duas cópias.

6. FENOTIPAGEM POR MICROTESTES *IN VITRO*

Foram realizados testes de sensibilidade *in vitro* em 21 amostras de *P. falciparum* para a cloroquina, 19 para o quinino e 22 para a mefloquina. Todos

os isolados testados para a cloroquina mostraram fenótipo resistente com CMI ≥ 80 nM. Com relação aos isolados testados para o quinino, apenas uma (5,2%) mostrou resposta resistente com CMI ≥ 2560 nM. Nos testes realizados com mefloquina, 27,3% dos isolados apresentaram fenótipo resistente com CMI ≥ 160 nM.

7. RESPOSTA *IN VITRO* À CLOROQUINA *VERSUS* ANÁLISE MOLECULAR DE *pfcrt*

A análise molecular de todos os isolados resistentes *in vitro* à cloroquina demonstrou que 100% albergavam a mutação K76T no gene *pfcrt*.

8. RESPOSTA *IN VITRO* AO QUININO E À MEFLOQUINA *VERSUS* ANÁLISE MOLECULAR DE *pfmdr1*

Foram testadas 19 amostras para avaliação da resposta *in vitro* ao quinino e apenas uma (5,2%) mostrou fenótipo resistente com CMI > 2560 nM. Esta amostra continha o genótipo selvagem no códon 86 e mutante no 1246. Por outro lado, todas as amostras sensíveis apresentaram o mesmo perfil molecular. Com relação aos testes de sensibilidade à mefloquina, foram ensaiadas 22 amostras e 27,3% apresentaram fenótipo resistentes, com CMI > 160 nM. O genótipo selvagem no códon 86 e mutante no 1246 foram observados em todas as amostras resistentes. Uma amostra sensível continha a mutação N86Y.

9. RESPOSTA *IN VIVO* AO QUININO E À MEFLOQUINA *VERSUS* ANÁLISE MOLECULAR DE *pfmdr1*

Com relação ao tratamento *in vivo*, 30,4% dos pacientes com seguimento de 28 dias ou mais apresentaram recrudescência ao quinino, 30% à mefloquina e 66,6% a derivados de artemisinina em monoterapia. A porcentagem de mutações N86Y e D1246Y encontradas nas amostras recrudescentes para o quinino, mefloquina e derivados de ART foi respectivamente: 0% e 100%, 0% e 66%, 14,3% e 85,7%. Isolados de pacientes que apresentaram cura sem recrudescências nos 28 dias de seguimento continham as mutações N86Y e D1246Y nas seguintes porcentagens de 0% e 93,75% para quinino, 9% e 100% para mefloquina e 0% e 44% para derivados de ART.

10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Não foram encontradas associações entre a resposta *in vivo* ao quinino e mutações nos códons 86 e 1246 do gene *pfmdr1* (p=1,000) e número de cópias deste gene (p=0,657). Também não foi encontrada associação entre a resposta *in vivo* à mefloquina e mutações nos códons 86 (p=1,000), 1246 (p=0,214) e número de cópias (p=1,000). Da mesma forma, mutações nos códons 86 e 1246 e variações no número de cópias não foram associadas com resposta aos derivados de artemisinina com p=0,438, 0,145 e 0,615 respectivamente. Não houve associação estatisticamente significante entre a resposta *in vivo* ao quinino e mefloquina com mutações nos códons 86 e 1246 de *pfmdr1* (p=1,000) nem entre número de cópias e resposta *in vitro* à mefloquina (p=0,3498) ou quinino (p=1,000).

11. SEQUENCIAMENTO DOS GENES *pfATPase6* E *pfAP2-µ*

Para sequenciamento do gene *pfATPase6* foram selecionadas 19 amostras: seis sensíveis ao tratamento com derivados de artemisinina, seis recrudescentes a este tratamento e sete provenientes de locais com alta pressão seletiva para desenvolvimento de resistência devido ao uso indiscriminado deste antimalárico. A Tabela 11 mostra polimorfismos encontrados nas amostras sequenciadas. O polimorfismo mais frequente (73,7%) nas amostras foi a substituição T → A no nucleotídeo 2694, que leva à mutação sinônima I898I. Este polimorfismo foi encontrado em amostras da América do Sul, incluindo o Brasil, África e Haiti, em isolados sensíveis e recrudescentes aos derivados de artemisinina. Outras mutações encontradas em amostras brasileiras foram: R37K, L402V, A630S e G639D. Estas amostras eram provenientes de pacientes que recrudesceram ao tratamento com derivados de artemisinina e foram coletadas em décadas anteriores à adoção dos ACTs no Brasil. As demais mutações observadas foram: E431K, N569K, G632E e H747Y. Estas mutações ocorreram em amostras sensíveis ao tratamento com derivados de artemisinina e provenientes de países africanos e do Haiti.

Para o sequenciamento do gene *pfAP2-µ* foram selecionadas 19 amostras: cinco sensíveis ao tratamento com derivados de artemisinina, seis recrudescentes a este tratamento, quatro provenientes de locais com alta pressão seletiva para desenvolvimento de resistência devido ao uso indiscriminado deste antimalárico, uma amostra que respondeu ao tratamento com mefloquina e uma ao quinino e duas amostras recrudescentes à mefloquina. O SNP de maior frequência (47,4%) foi G → T no nucleotídeo 381,

que resulta na mutação sinônima V127V, não ocorrendo mudança no aminoácido. Outro SNP que resulta em mutação sinônima observado em somente uma amostra foi T → G no nucleotídeo 1434, que resulta em S478S. Duas amostras sensíveis ao tratamento *in vivo* com derivados de artemisinina apresentaram deleção de uma asparagina a partir do códon 234. Uma amostra apresentou deleção de duas asparaginas a partir do códon 234. Duas amostras apresentaram uma inserção de duas asparaginas no códon 234. Uma amostra apresentou inserção de uma asparagina no códon 234. Uma amostra, recrudescente a derivados de artemisinina, apresentou a mutação W250R. Uma amostra apresentou a mutação D3Y. A Tabela 12 mostra os polimorfismos encontrados nas amostras submetidas ao sequenciamento.

Tabela 11 - Polimorfismos observados nas amostras em que foi realizado o sequenciamento do gene *pfATPase6*, resposta *in vivo*, origem e década de coleta das amostras. Em verde, amostras de pacientes que apresentaram recrudescência ao tratamento com derivados de artemisinina; em vermelho, amostras de pacientes que responderam adequadamente ao tratamento; em azul, amostras provenientes de lugar com alta pressão seletiva de antimaláricos e sem acompanhamento.

Amostra	Resposta *in vivo*	Origem	Década	R37K	L402V	E431K	N569K	A630S	G632E	G639D	H747Y	I898I
R17	R ART	Rondônia	1980					X				X
R26	R ATS + QN	Amazônia	1980									X
R28	R ART	Roraima	1980		X							
R32	R ATS + MF	Pará	1990									X
R59	R ART	Mato Grosso	1990		X							X
R85	R ATS + CLIND	Pará	1990	X						X		
R63	S ATS	Mato Grosso	1990									X
R71	S ART	Nigéria	2000			X	X					X
R72	S ART	Serra Leoa	2000		X							
R74	S ART	Malawi	2000								X	X
R86	S ART	Rondônia	2000									X
R73	S ATS	Haiti	2010						X			X
P1	Ø	Pará	2010									X
P5	Ø	Guiana Francesa	2010							X		
P9	Ø	Guiana	2010									X
P10	Ø	Guiana	2010									X
P26	Ø	Guiana Francesa	2010									X
P27	Ø	Guiana	2010	X						X		
P33	Ø	Suriname	2010									X

Tabela 12 - Polimorfismos observados nas amostras em que foi realizado o sequenciamento do gene *pfAP2-μ*, resposta *in vivo*, origem e década de coleta das amostras. Em verde, amostras de pacientes que apresentaram recrudescência ao tratamento com derivados de artemisinina; em vermelho, amostras de pacientes que responderam adequadamente ao tratamento; em azul, amostras provenientes de lugar com alta pressão seletiva de antimaláricos; em amarelo, amostras de pacientes que recrudesceram ao tratamento com mefloquina; em cinza, amostras de pacientes que responderam adequadamente ao tratamento com mefloquina e quinino.

Amostra	Resposta *in vivo*	Origem	Década	D3Y	V127V	Inserção 234 +N	Inserção 234 +NN	Deleção 234 -NN	Deleção 234 -N	W250R	S478S
R17	R ART	Rondônia	1980		X						
R26	R ATS + QN	Amazônia	1980		X						
R28	R ART	Roraima	1980		X					X	
R32	R ATS + MF	Pará	1990		X						
R59	R ART	Mato Grosso	1990								
R85	R ATS+CLIND	Pará	1990								
R63	S ATS	Mato Grosso	1900		X						
R71	S ART	Nigéria	2000								
R72	S ART	Serra Leoa	2000						X		
R73	S ATS	Haiti	2010								
P6s	S ART	Indonésia	2010						X		
P1	Ø	Pará	2010		X						
P9	Ø	Guiana	2010					X			
P27	Ø	Guiana	2010				X				
P33	Ø	Suriname	2010		X						
R5	R MF	Rondônia	1980		X						
R78	R MF	Moçambique	2000			X					X
R25	S MF	Rondônia	1980	X			X				
R60	S QN	Mato Grosso	1990		X						

DISCUSSÃO

1. ANÁLISE DO GENE *pfcrt* E RESPOSTA *IN VITRO* À CLOROQUINA

Neste estudo, a análise do gene *pfcrt* mostrou que todas as amostras da América do Sul continham a mutação K76T, fortemente associada à resistência à cloroquina por diversos autores. Em estudo realizado na Colômbia, Restrepo et al. (2008) analisaram códon do gene *pfcrt* através de PCR-RFLP e observaram a presença da mutação K76T em todas as amostras. Outra investigação, realizada em amostras da Guiana Francesa, mostrou fixação do haplótipo resistente de *pfcrt* SMNVT, que inclui a mutação K76T (LEGRAND et al., 2012). Apesar do pouco número de amostras estudas, Gbotosho et al. (2012) também observaram o haplótipo SMNVT em todas as amostras brasileiras analisadas. Adhin et al. (2013) observaram prevalência de 100% de K76T em amostras coletadas no Suriname em uma coorte *baseline* em 2005 e também em amostras coletadas em 2010. A avaliação de mutações no gene *pfcrt* é essencial para o monitoramento de mudanças no perfil molecular que podem levar à reversão da resistência à cloroquina após a retirada da droga, como ocorreu no Malaui. Neste país, a ausência de pressão da droga levou ao retorno de genótipos sensíveis à cloroquina na população parasitária (LAUFER et al., 2010). Fenômeno semelhante foi relatado no Quênia com reversão substancial do fenótipo selvagem/sensível de *P. falciparum* (MANG'ERA et al., 2012). Com relação às amostras provenientes de países africanos, os resultados deste estudo confirmam esta tendência, visto que isolados do Malaui, Moçambique, Serra Leoa e Gana apresentaram o genótipo selvagem K76. Isolados de Angola e da Costa do Marfim apresentaram infecções mistas K+T e mutantes. Na África, *P. falciparum* representa a maioria das infecções de malária em humanos e a retirada da cloroquina após introdução de ACTs

descontinuou a pressão seletiva no parasito. Entretanto, não é esperado que a reversão do genótipo e de sensibilidade ocorra em países da América do Sul, visto que a prevalência de outras espécies de *Plasmodium*, com *P. vivax*, é alta nesta região, levando ao uso ininterrupto da cloroquina. Dessa forma, a pressão seletiva é contínua, resultando na fixação da mutação. Além disso, é importante considerar que a cloroquina é amplamente utilizada para o tratamento de doenças reumáticas e lúpus eritematoso, aumentando a pressão da droga no genoma de *P. falciparum* (RASTER et al., 2011). Embora apenas uma amostra do Haiti tenha sido estudada, o resultado encontrado concorda com trabalho de Elbadry et al. (2013) que observaram ocorrência somente do haplótipo selvagem CVMNK em isolados deste país.

Com relação aos isolados brasileiros, considerando que a análise de *pfcrt* mostrou a presença da mutação em todos os isolados testados *in vitro* para cloroquina coletados em número representativo de estados da região Amazônica, podemos concluir que este marcador molecular é uma ferramenta adequada para caracterização de parasitos resistente à cloroquina.

Com relação ao genótipo mutante encontrado em todos os isolados brasileiros, resultados similares foram reportados por Vieira e colaboradores (2004) e por Viana e colaboradores (2006). Estudo realizado com amostras de Rondônia e Pará sugeriu que o encontro de um haplótipo sensível à cloroquina pudesse estar relacionado com reversão da resistência a este antimalárico (GAMA et al., 2009). Embora esta 4-aminoquinoleína tenha sido substituída por outros esquemas terapêuticos para *P. falciparum* na segunda metade da década de 80, continua a ser preconizada para o tratamento de *P. vivax* no Brasil, que responde por 87% das espécies diagnosticadas. Este fato pode ter

contribuído para que esta mutação tenha se fixado no genoma parasitário pela pressão exercida com a continuidade do uso deste antimalárico para *P. vivax*. Nossos resultados apontam para esta última hipótese, visto que isolados coletados em período recente apresentaram o genótipo K76T, marcador molecular para resistência à cloroquina.

2. ANÁLISE DO GENE *pfmdr1* E RESPOSTAS *IN VITRO* E *IN VIVO* AO QUININO E À MEFLOQUINA

A dispersão da resistência à cloroquina no Sudeste Asiático, América do Sul e África contribuiu para o aumento de óbitos devido à malária na década de 1980 (TRAPE, 2001). Adicionalmente, o surgimento da resistência à SP e à mefloquina ou quinino em monoterapia, levou à mudança da primeira linha de tratamento para as ACTs em todo o mundo (EGAN e KASCHULA, 2007) com associação dos derivados de artemisinina com mefloquina ou lumefantrina. O gene *pfmdr1* parece estar envolvido com a resposta à cloroquina, mefloquina e artemisininas: de acordo com Duraisingh et al. (2000), estudo com amostras de Gambia revelaram que o mutante 86Y estava associado com aumento da resistência à cloroquina e ao quinino e aumento da sensibilidade à mefloquina e artemisininas. Por outro lado, Rason et al. (2007) não encontraram associação entre a resposta à cloroquina ou quinino e a mutação N86Y em isolados do Madagascar. De fato, o papel de *pfmdr1* na resposta aos antimaláricos é controverso: Bustamante et a.l (2012) encontraram um aumento de CI_{50} para o artemeter em isolados da Nigéria com a mutação N86Y. A amplificação de *pfmdr1*, com aumento na expressão do transportador de membrana no vacúolo digestivo, parece estar associado com diminuição à

susceptibilidade à mefloquina (PRICE et al., 2004) e lumefantrina (PRICE et al., 2006).

Neste trabalho, o genótipo *pfmdr1* N86 foi detectado em quase todas as amostras das décadas de 1980, 1990 e 2000. Estes resultados concordam com Adhin et al. (2013), que não encontraram parasitos mutantes neste códon em uma coorte de 2005 e de 2010 no Suriname. Resultado semelhante foi reportado por Bacon et al. (2009) em amostras do Peru de dois períodos diferentes (1999 e 2006 a 2007) com todos os isolados mostrando o genótipo selvagem N86. O trabalho de Griffing et al. (2010) concorda com a prevalência de N86 em países americanos. No nosso estudo, embora não tenha sido observada a associação entre a mutação N86Y e falha na resposta terapêutica *in vivo* aos derivados de artemisinina, é importante notar que a substituição de asparagina por tirosina na posição 86 ocorreu em amostras resistentes a este tratamento, mas não em isolados resistentes ao quinino e à mefloquina. Ainda, o mutante 86Y foi detectado na última década em 28,6% das amostras brasileiras, todas coletadas no estado do Pará. Além disso, 43% dos isolados da Guiana, país que faz fronteira com o Brasil, apresentaram o mutante 86Y. Considerando a introdução das ACTs na metade da década de 2000, podemos sugerir que o surgimento desta mutação pode estar relacionado à pressão exercida pelos derivados de artemisinina no genoma de *P. falciparum*.

Todas as amostras de países sulamericanos continham a mutação D1246Y em *pfmdr1* em todas as décadas estudadas. Estes resultados concordam com outros estudos realizados na América do Sul em que a análise deste códon revelou somente parasitos mutantes (ADHIN et al., 2013; GRIFFING et al., 2010). Por outro lado, Bacon et al. (2009a) detectaram o genótipo

selvagem em número significativo de amostras do Peru. Com relação aos isolados de países africanos, exceto um proveniente do Malaui, todos continham o genótipo selvagem D1246. A prevalência do genótipo selvagem também foi observada em Gana, onde o haplótipo N86F184-D1246 teve significante aumento após introdução das ACTs (DUAH et al., 2013). Este haplótipo parece ser selecionado pela combinação artemeter-lumefantrina. Estes resultados podem ser explicados pelo diferentes níveis de endemicidade entre América do Sul e a África, onde *P. falciparum* é a espécie mais prevalente e, portanto, submetida à alta pressão pelas ACTs.

Não foi encontrada associação estatisticamente significante entre as mutações nos códons 86 e 1246 nem número de cópias em *pfmdr1* com as respostas *in vivo* ou *in vitro* ao quinino e à mefloquina ou resposta *in vivo* aos derivados de artemisinina. Entretanto, a literatura apresenta resultados controversos quanto ao papel de *pfmdr1* na resposta aos antimaláricos em diferentes regiões geográficas. A mutação 86Y foi associada com resistência ao quinino e aumento da susceptibilidade à mefloquina e ao artesunato em Gambia (DURAISINGH et al., 2000), em desacordo com Phompradit et al. (2011), que associaram esta mutação a um aumento na sensibilidade ao quinino em isolados da fronteira Thai-Mianmar. A sensibilidade ao quinino não foi associada à amplificação no número de cópias de *pfmdr1* por Anderson et al. (2005). Diferentemente, Sidhu et al. (2006) enfatizaram que o número de cópias de *pfmdr1* está relacionado à resposta de *P. falciparum* ao quinino.

Com relação à genotipagem de *pfmdr1*, nossos resultados mostram a necessidade de contínuo monitoramento, visto que foi detectado o surgimento da mutação N86Y em região com alta taxa de migração entre países vizinhos

em que *P. falciparum* é prevalente. Este fato resulta em alto nível de pressão das ACTs na população parasitária, contribuindo para seleção de parasitos.

3. ANÁLISE DOS GENES *pfdhfr* E *pfdhps*

Os resultados da análise do gene *pfdhfr* em amostras de países sul americanos neste estudo revelaram ausência do mutante 59R, exceto em uma amostra da Guiana, que apresentou genótipo misto C+R. Foi observada alta frequência de isolados mutantes nas posições 51 e 108. Com relação ao gene *pfhdps* também foi observada alta frequência de mutantes nos códons 437 e 540 nas amostras da América do Sul. Estes resultados concordam com relatos anteriores que não encontraram o mutante 59R em amostras do Peru (BACON et al., 2009b) e da Colômbia (HERNÁNDEZ et al., 2013). Por outro lado, nas amostras africanas o mutante 59R estava presente em 45,4% das amostras em três haplótipos distintos e o selvagem K540 foi observado na maioria das amostras em quatro haplótipos diferentes. Estudo realizado em Gana também relata alta frequência do mutante 59R e do selvagem K540, com significante presença de triplo (IRN) e quádruplo (IRNG) mutantes (DUAH et al., 2012). Estudo realizado por Plowe et al. (1997) também mostrou diferentes haplótipos em amostras da América do Sul e da África, com uma menor prevalência da mutação 59R em isolados da Bolívia em relação aos africanos. Em contraste com o presente estudo, o códon selvagem K540 foi encontrado em todos os haplótipos de amostras coletadas na Colômbia. Este trabalho relatou uma frequência de 35% do haplótipo selvagem em amostras coletadas na localidade de Tumaco, na Colômbia, e sugere que uma redução significante na frequência de mutações possa ocorrer nos próximos anos neste local (HERNÁNDEZ et al.,

2013). No Brasil, o tratamento com SP foi retirado na década de 1980. No presente estudo, observou-se o surgimento do alelo selvagem para o códon 51 de *pfdhfr* em amostras coletadas a partir da década de 2000, assim como um aumento do alelo selvagem para o códon 540 de *pfhps*. Estudo realizado na Venezuela após oito anos da retirada do tratamento com SP mostrou que as mutações relacionadas à resistência à SP estavam fixadas na população, sugerindo que em locais com baixo fluxo gênico, a fixação de parasitos resistentes é estável mesmo após retirada da pressão seletiva exercida pelo tratamento (McCollum et al., 2007). No Peru, em estudo realizado após quatro anos da retirada do tratamento com SP, houve uma redução significativa de 47% para 16,9% do haplótipo mutante em *pfdhfr*, assim como no gene *pfdhps*, em que 83,8% dos isolados contrinham alelos selvagens. Diferentemente do quadro reportado para a Venezuela, estes autores acreditam que no Peru, os alelos mutantes não tenham se fixado e, portanto, são substituídos por alelos selvagens ainda presentes na população e que não carregam o custo adaptativo do mutante (Zhou et al., 2008). No presente estudo, embora a diferença entre a frequência de alelos selvagens em *pfdhfr* e *pfdhps* nas amostras sul-americanas mais recentes em relação às amostras das décadas de 1980 e 1990 não seja estatisticamente significativa, o contínuo monitoramento destes marcadores pode indicar no futuro a reversão de mutações que conferem resistência à SP.

4. ANÁLISE DO GENE *pfatpase6*

A mutação S769N não foi encontrada em nenhuma amostra neste estudo. Esta mutação foi associada a elevados valores de CI_{50} em amostras da Guiana Francesa (JAMBOU et al., 2005) e também foi observada em estudo realizado no Irã com amostras coletadas entre 2003 e 2010, em que a frequência desta mutação foi de 2,6% das amostras quatro anos após a introdução dos ACTs nesta região (ZAKERI et al., 2012). Estudo realizado com amostras de viajantes detectou as mutações A623E e S769N em 39% das amostras de oito países africanos. Observou-se aumento significativo da resistência *in vitro* ao artemeter nas amostras com mutações na *pfATPase6* (PILLAI et al., 2012). Por outro lado, trabalhos realizados em diversos países não observaram a presença da mutação neste códon. Na China, esta mutação não foi observada em nenhuma amostra coletada entre 2006 e 2007 nas províncias de Hainan e Yunnan (ZHANG et al, 2008). Este polimorfismo também não foi observado em estudos conduzidos na Tanzânia, Brasil, Niger e em países do Sudeste Asiático (MUGITTU et al., 2006; IBRAHIM et al., 2009; MIAO et al., 2013). Cui et al. (2012), utilizando linhagens selvagens e mutante para este códon, demonstraram que a mutação S769N não afetava a resposta dos parasitos ao artemeter, ao artesunato e à dihidroartemisinina. Estes resultados divergentes apontam para a necessidade de esclarecimento quanto ao papel desta mutação na resistência aos derivados de artemisinina.

Com relação ao sequenciamento do gene *pfATPase6*, o polimorfismo encontrado com maior frequência foi o T2694A, que leva à mutação sinônima I898I. Este polimosrfismo foi observado em amostras provenientes do Brasill, Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Haiti, Malaui e Nigéria. Esta mutação já

havia sido relatada anteriormente em amostras do Brasil, Guiana Francesa, Guiné Equatorial e Senegal (BRASIL et al., 2012; GARDNER et al., 2011). As outras mutações encontradas em amostras do Brasil, R37K, L402V, A630S e G639D, também já foram observadas anteriormente em outros trabalhos. R37K foi observada em amostras do Brasil (BRASIL et al., 2012) e Venezuela (TANABE et al., 2011); L402V foi relatada em amostras do Brasil (GAMA et al., 2010), Níger (MENEGON et al., 2008), Guiana Francesa, Senegal (JAMBOU et al., 2010), e Tailândia (MIAO et al., 2013); A630S foi observada no Brasil (GAMA et al., 2010) e em Angola (MENEGON et al., 2008); G639D foi reportada na Venezuela (TANABE et al., 2011), no Brasil (JAMBOU et al., 2010) e na Tailândia (Miao et al., 2013). Um isolado brasileiro recrudescente ao tratamento com derivados de artemisinina apresentou as mutações R37K e G639D. A mutação E431K, associada a elevados valores de CI_{50} em amostras do Senegal (JAMBOU et al., 2005), não foi encontrada em isolados brasileiros, mas estava presente em uma amostra proveniente da Nigéria. No trabalho de ZAKERI et al. (2012) esta mutação foi encontrada em isolados do Irã coletados antes e após o início do tratamento com ACTs. Também já foi observada em isolados do Mianmar e do Vietnam. Adicionalmente, a amostra proveniente da Nigéria também apresentou a mutação N569K. Esta mutação havia sido descrito anteriormente em amostras do Vietnam, Tailândia (MIAO et al., 2013), Guiné Equatorial (JAMBOU et al., 2010) e Zanzibar (DAHLSTROM et al., 2008). Entretanto, a amostra que albergava estas duas mutações, E431K e N569K, apresentou resposta sensível *in vivo* ao tratamento com derivados de artemisinina. As mutações G632E e H747Y, observadas neste trabalho em isolados da Nigéria e do Malaui, respectivamente, não haviam sido relatadas anteriormente nestes

países. A mutação L402V foi a única compartilhada em comum por isolados da América do Sul e da África analisados neste estudo.

Todos os SNPs encontrados neste estudo foram reportados por Tanabe et al. (2011) em trabalho conduzido com 656 sequências de *pfATPase6* de isolados de diversas origens no mundo, que não haviam sido expostos às ACTs. Este trabalho demonstrou que a África era o local com maior número de SNPs restritos a este continente e que a América do Sul compartilhava 70% de SNPs com a África.

Estes resultados concordam com o que foi observado no presente estudo, visto que as mutações detectadas aqui também foram observadas em amostras coletadas anteriormente à adoção das ACTs para tratamento de *P. falciparum* e, portanto, não surgiram devido à pressão exercida pelo medicamento, pois já estavam presentes na população parasitária.

5. SEQUENCIAMENTO DO GENE *pfap2-μ*

O gene *pfAP2-μ* foi associado a diversos graus de resposta aos derivados de artemisinina. Os resultados de sequenciamento revelaram frequência de 47,9% do SNP G381I que leva à mutação sinônima V127V. Todas as amostras que apresentaram esta mutação eram provenientes da América do Sul. Nenhuma amostra africana apresentou esta mutação. Estes resultados concordam com estudo anterior que revelou a presença deste polimorfismo em 87,5% dos isolados coletados no Brasil, mas não em isolados africanos coletados em Ruanda e em São Tomé e Príncipe, sugerindo que esta mutação parece ser característica de isolados brasileiros (HENRIQUES et al., 2013). Três novas mutações foram encontradas neste estudo: duas mutações

não sinônimas, D3Y e W250R, e uma sinônima S478S. A mutação W250R foi encontrada em isolado recrudescente ao tratamento com derivados de artemisinina e sua implicação precisa ser investigada. Ao contrário do estudo de Henriques et al. (2013) que relatou maior grau de polimorfismo em amostras africanas do que em brasileiras, neste estudo, embora em pequena amostragem, isolados africanos foram menos polimórficos. As mutações S160N e F437L, associadas a elevados valores de CI_{50} em amostras de Ruanda, não foram encontradas em nenhum isolado neste estudo.

A clatrina é uma proteína que atua como revestimento de vesículas. O gene *pfAP2-μ* codifica um adaptador de clatrina, que é uma subunidade do adaptador AP2 responsável pela endocitose. Acredita-se que a entrada da hemoglobina no vacúolo digestivo do parasito seja mediada por vesículas ligadas à membrana revestidas por clatrina. O complexo AP2 conecta proteínas carregadoras e lipídeos à clatrina em locais específicos da vesícula, assim como liga proteínas acessórias que regulam a montagem e desmontagem do revestimento. Consequentemente, mutações neste adaptador podem alterar sua especificidade de ligação afetando o transporte de hemoglobina pelas vesículas revestidas com clatrina para dentro do vacúolo digestivo. Propõe-se que os derivados trioxanos de artemisinina acumulam-se rapidamente no vacúolo digestivo e são ativados por heme associado a lipídios neutros. Dentro do vacúolo, as vesículas de hemoglobina revestidas com clatrina são digeridas, liberando aminoácidos, componentes lipídicos (fosfolipídios) e heme. Os fosfolipídios são degradados e seus componentes são reconstituídos para formar lipídios neutros associados ao heme. Os autores propõem que mutações no gene *pfAP2-μ* podem prejudicar o transporte de hemoglobina para

dentro do vacúolo digestivo via vesículas revestidas por clatrina. Utilizando vias alternativas de captação de hemoglobina, o parasito pode ter acesso a hemoglobina sem liberar dos fosfolipídios, necessários para ativação da artemisinina, consequentemente modulando a resposta à ART (HENRIQUES et al., 2013; EDELING et al., 2004).

Desde a metade do século XX, os antimaláricos têm desempenhado papel fundamental no controle da malária. Juntamente com os antipiréticos, estão entre os medicamentos mais utilizados na região tropical. Entretanto, seu uso extensivo exerceu grande pressão seletiva nos parasitos, favorecendo o surgimento e disseminação de resistência. Adicionalmente, o uso incorreto dos medicamentos, baixa aderência ao tratamento e disseminação de antimaláricos falsos favorece a seleção de parasitos resistentes. Acredita-se que os efeitos da resistência na mortalidade e morbidade sejam subestimados, mas sabe-se que contribuiu para o aumento da malária em todo o mundo. Diagnóstico precoce e tratamento de malária com antimaláricos adequados são os principais pilares dos programas de controle da doença. Para que seja possível o desenvolvimento de políticas de tratamento eficazes é crucial a capacidade de prever e monitorar o surgimento de resistência. O monitoramento *in vivo* é amplamente utilizado, entretanto requer uma boa logística e suporte financeiro para sua realização. Fatores como reinfecção, farmacocinética e imunidade do hospedeiro podem influenciar a interpretação dos resultados. O uso de marcadores moleculares e sua associação à falha terapêutica representa um avanço para o monitoramento da resistência. Esta abordagem pode fornecer dados importantes sobre a população parasitária de cada local ao caracterizar genotipicamente os parasitos quanto à resposta aos antimaláricos.

Adicionalmente, pode detectar o retorno do genótipo selvagem após a retirada do medicamento, como ocorreu com a cloroquina no Malaui. Desta forma, marcadores moleculares podem auxiliar a adoção de políticas de tratamento adequadas e capazes de retardar o surgimento e disseminação da resistência.

Este estudo, com análise de marcadores relacionados à resistência a diversos antimaláricos em amostras coletadas ao longo de 27 anos, em que o parasito foi submetido à pressão de diferentes esquemas terapêuticos adotados no Brasil, permitiu a caracterização do perfil genético de *P. falciparum* com relação às mutações associadas à resistência.

CONCLUSÕES

- ✓ A mutação K76T em *pfcrt* apresentou frequência de 100% em amostras brasileiras ao longo das décadas estudadas. Amostras africanas apresentaram genótipos selvagem, mutante e misto para este marcador.
- ✓ A mutação N86Y em *pfmdr1* apresentou frequência de 0% nas três primeiras décadas e de 29,7% na década de 2010 em amostras de países da América do Sul. A mutação D1246Y esteve presente em 100% das amostras sul-americanas em todas as décadas analisadas e em 0% das amostras africanas. O selvagem D1246 foi observado em todas as amostras de países africanos, exceto em uma do Malaui.
- ✓ A análise de ocorrência de mutações quíntuplas em *pfdhfr* e *pfdhps* revelou que: (I) a mutação quádrupla ICNGE foi a mais frequente em amostras brasileiras em todos os períodos analisados e (II) a mutação IRNGK foi a mais frequente nas amostras africanas.
- ✓ Mutações no gene *pfATPase6* estavam presentes em amostras anteriores e posteriores ao início do tratamento com ACTs no Brasil.
- ✓ Foi observada associação entre a mutação K76T em *pfcrt* e a reposta *in vitro* resistente à cloroquina.
- ✓ Não foi observada associação entre as respostas *in vitro* e *in vivo* ao quinino, mefloquina e derivados de artemisinina e mutações nos genes analisados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adhin MR, Labadie-Bracho M, Bretas G. Molecular surveillance as monitoring tool for drug-resistant *Plasmodium falciparum* in Suriname. *Am J Trop Med Hyg* 2013; 89:311-6.

Alecrim MGC, Alecrim WD, Albuquerque BC, Dourado HV, Wanssa MC. Resistência do *Plasmodium falciparum* na Amazônia Brasileira à associação sulfadoxina+pirimetamina. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1982; 24:44-7.

Alencar FH, Ferraroni JJ, Shrimpton R. Resistência do *Plasmodium falciparum* ao Fansidar, quinina e tetraciclina. *Rev Saúde Pública* 1982; 16: 299-302.

Aly AS, Vaughan AM, Kappe SH. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annu Rev Microbiol* 2009; 63:195-221.

Al-Yaman F, Genton B, Mokela D, Alpers MP. Resistance of *Plasmodium falciparum in vivo* to 3 days' treatment with quinine and single-dose Fansidar. *P N G Med* J 1994; 37:54-6.

Anderson TJ, Nair S, Qin H, Singlam S, Brockman A, Paiphun L, Nosten F. Are transporter genes other than the chloroquine resistance locus (*pfcrt*) and multidrug resistance gene (*pfmdr1*) associated with antimalarial drug resistance? *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:2180-8.

Ashley E, McGready R, Proux S, Nosten F. Malaria. *Travel Med Infect Dis* 2006; 4:159-73.

Avery-Jones S, 1954 *apud* Onori E. The problem of *Plasmodium falciparum* resistance in Africa South of the Sahara. *Bull WHO* 1984; 62:55-62.

Bacon DJ, McCollum AM, Griffing SM, Salas C, Soberon V, Santolalla M, Haley R, Tsukayama P, Lucas C, Escalante AA, Udhayakumar V. Dynamics of malaria drug resistance patterns in the Amazon basin region following changes in Peruvian national treatment policy for uncomplicated malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 2009a; 53:2042-51.

Bacon DJ, Tang D, Salas C, Roncal N, Lucas C, Gerena L, Tapia L, Llanos-Cuentas AA, Garcia C, Solari L, Kyle D, Magill AJ.. Effects of point mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropterate synthase genes on clinical outcomes and *in vitro* susceptibility to sulfadoxine and pyrimethamine. PLoS One 2009b; 4:e6762.

Baird JK, Basri H, Purnomo BMJ, Subianto B, Patchen LC, Hoffman SL. Resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax* in Irian Jaya, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 44:547-52.

Basco LK. Field application of *in vitro* assays for the sensitivity of human malaria parasites to antimalarial drugs. Geneva: World Health Organization; 2007.

Basco LK, Ringwald P. Molecular epidemiology of malaria in Yaounde, Cameroon. VI. Sequence variations in the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase–thymidylate synthase gene and *in vitro* resistance to pyrimethamine and cycloguanil. *Am J of Tropl Med Hyg* 2000; 62:271–6.

Bennett JM, Desforges JF. Quinine-induced haemolysis: mechanism of action. *Brit J Haemat* 1967; 13:706-12.

Bennett TN, Patel J, Ferdig MT, Roepe PD. *Plasmodium falciparum* Na^+/H^+ exchanger activity and quinine resistance. *Mol Biochem Parasitol* 2007; 153: 48-58.

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

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

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 LW, Areas AL, Melo GC, Oliveira CM, Alecrim MG, Lacerda MV, O'Brien C, Oelemann WM, Zalis MG. *Pfatp6* molecular profile of *Plasmodium falciparum* isolates in the western Brazilian Amazon. *Malar J* 2012; 11:111.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral do Programa Nacional de Controle da Malária. Guia Prático de Tratamento da Malária no Brasil. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília DF, 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sivep-Malária e Datasus (acesso em 17 de setembro de 2012; disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivoSPdf/boletim_malaria_2010_2011.pdf

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. SINAN (acesso em 22 de fevereiro de 2014; disponível em http://public.tableausoftware.com/views/RotinaExtra/1_Serie_ano?:embed=y#1

Bruce-Chwatt L J. Paleogenesis and Paleo-Epidemiology of Primate Malaria. *Bull WHO* 1965; 32:363-87.

Bruce-Chwatt LJ, Back RH, Canfield CJ, Clyde DF, Peters W, Wernsdorfer WH. *Chemotherapy of Malaria*., 2n. ed. Geneva: WHO; 1981.

Bruce-Chwatt LJ, Black RH, Canfield CJ, Clyde DF, Peters W, Wernsdorfer WH. *Chemotherapy of malaria*. revised 2nd ed. Geneva: WHO; 1986.

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.

Bwijo B, Kaneko A, Takechi M, Zungu IL, Moriyama Y, Lum JK, Tsukahara T, Mita T, Takahashi N, Bergqvist Y, Björkman A, Kobayakawa T. High prevalence of quintuple mutant dhps/dhfr genes in *Plasmodium falciparum* infections seven years after introduction of sulfadoxine and pyrimethamine as first line treatment in Malawi. *Acta Trop* 2003; 85:363-73.

Bygberg IC, Schapira A, Flachs H, Gomme G, Jepsen S. Mefloquine resistance of *falciparum* malaria from Tanzania enhanced by treatment. *Lancet* 1983; 1:774-5.

Calderaro A, Piccolo G, Perandin F, Gorrini C, Peruzzi S, Zuelli C, Ricci L, Manca N, Dettori G, Chezzi C, Snounou G. Genetic polymorphisms influence *Plasmodium ovale* PCR detection accuracy. *J Clin Microbiol* 2007; 45:1624-7.

Campbell CC, Chin W, Collins WE, Teutsch SM, Moss DM. Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* from East Africa: cultivation and drug sensitivity of the Tanzanian I/CDC strain from an American tourist. *Lancet* 1979; 2:1151-4.

Chaijaroenkul W, Wisedpanichkij R, Na-Bangchang K. Monitoring of *in vitro* susceptibilities and molecular markers of resistance of *Plasmodium falciparum* isolates from Thai-Myanmar border to chloroquine, quinine, mefloquine and artesunate. *Acta Trop* 2010; 113:190-4.

Chen PQ, Li GQ, Guo XB, He KR, Fu YX, Fu LC, Song YZ. The infectivity of gametocytes of *Plasmodium falciparum* from patients treated with artemisinin. *Chin Med J* 1994; 107:709-11.

Cooper RA, Ferdig MT, Su XZ, Ursos LM, Mu J, Nomura T, Fujioka H, Fidock DA, Roepe PD, Wellems TE. Alternative mutations at position 76 of the vacuolar transmembrane protein *Pfcrt* are associated with chloroquine resistance and unique stereospecific quinine and quinidine responses in *Plasmodium falciparum*. *Mol Pharmacol* 2002; 61:35-42.

Cooper RA, Lane KD, Deng B, Mu J, Patel JJ, Wellems TE, Su X, Ferdig MT. Mutations in transmembrane domains 1, 4 and 9 of the *Plasmodium*

falciparum chloroquine resistance transporter alter susceptibility to chloroquine, quinine and quinidine. *Mol Microbiol* 2007;63:270-82. Erratum in: *Mol Microbiol* 2007; 64:1139.

Cowman AF, Galatis D, Thompson JK. Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the *pfmdr1* gene and crossresistance to halofantrine and quinine. *PNAS USA* 1994; 91:1143-7.

Cowman AF, Karcz S, Galatis D, Culvenor JG. A P-glycoprotein homologue of *Plasmodium falciparum* is localized on the digestive vacuole. *J Cell Biol* 1991; 113:1033-42.

Cox-Singh J, Davis TME, Lee KS, Shamsul SSG, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B. *P. knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *CID* 2008; 46:165-71.

Cui L, Wang Z, Jiang H, Parker D, Wang H, Su XZ, Cui L: Lack of association of the S769N mutation in *Plasmodium falciparum* SERCA (PfATP6) with resistance to artemisinins. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:2546.

Cunha CB, Cunha BA. Brief history of the clinical diagnosis of malaria: from Hippocrates to Osler. *J Vector Borne Dis* 2008; 45:194-9.

Dahlstrom S, Veiga MI, Ferreira P, Martensson A, Kaneko A, Andersson B, Bjorkman A, Gil JP: Diversity of the sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase orthologue of *Plasmodium falciparum* (PfATP6). *Infect Genet Evol* 2008; 8:340-5.

De Geus A, Meuwissen JHE, Rijn AV. A case of Fansidar resistant *Plasmodium falciparum* from Tanzania. *Trop Geogr Med* 1982; 34:261-78.

Demar M, Carme B. *Plasmodium falciparum in vivo* resistance to quinine: description of two RIII responses in French Guiana. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 70:125-7.

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

Di Santi SM, Boulos M. Protozoários – Malária. *In:* Cimerman B, Cimerman S. *Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais*. São Paulo: Atheneu; 1999. 139-55.

Di Santi SM, Boulos M, Vasconcelos MA, Oliveira S, Couto A, Rosário VE. Caracterização de cepas de *Plasmodium falciparum* do Estado de Rondônia, Brasil, utilizando microtestes de sensibilidade aos antimaláricos, tipificação enzimática e anticorpos monoclonais. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1987; 20:142-7.

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.

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

Dokomajilar C, Nsobya SL, Greenhouse B, Rosenthal PJ, Dorsey G. Selection of *Plasmodium falciparum pfmdr1* alleles following therapy with artemether–lumefantrine in an area of Uganda where malaria is highly endemic. Antimicr Agents Chemother, 2006; 50:1893–5.

Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, Lwin KM, Ariey 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.

Duah NO, Matrevi SA, de Souza DK, Binnah DD, Tamakloe MM, Opoku VS, Onwona CO, Narh CA, Quashie NB, Abuaku B, Duplessis C, Kronmann KC, Koram KA. Increased *pfmdr1* gene copy number and the decline in *pfcrt* and *pfmdr1* resistance alleles in Ghanaian *Plasmodium falciparum* isolates after the change of anti-malarial drug treatment policy. *Malar J* 2013; 12:377.

Duah NO, Quashie NB, Abuaku BK, Sebeny PJ, Kronmann KC, Koram KA. Surveillance of molecular markers of *Plasmodium falciparum* resistance to sulphadoxine-pyrimethamine 5 years after the change of malaria treatment policy in Ghana. *Am J Trop Med Hyg*.2012; 87:996-1003.

Duraisingh MT, Jones P, Sambou I, von Seidlein L, Pinder M, Warhurst DC. The tyrosine-86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 108:13-23.

Dye C, Williams BG. Multigenic drug resistance among inbred malaria parasites. *Proceedings Biol Sci* 1997; 264:61-7.

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 AS, Krishna S. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2003; 424:957-61.

Edeling MA, Smith C, Owen D. Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2006; 7:32-44;

Egan TJ, Kaschula CH. Strategies to reverse drug resistance in malaria. *Curr Opin Infect Dis* 2007; 20:598-604.

Elbadry MA, Existe A, Victor YS, Memnon G, Fukuda M, Dame JB, Yowell CA, Okech BA. Survey of *Plasmodium falciparum* multidrug resistance-1 and chloroquine resistance transporter alleles in Haiti. *Malar J* 2013; 12:426.

Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, Deng B, Joy DA, Su XZ, Wellems TE. Dissecting the loci of low-level quinine resistance in malaria parasites. *Mol Microbiol* 2004; 52:985-97.

Ferone R, Burchall JJ, Hitchings GH. *Plasmodium berghei* dihidrofolate reductase. Isolation, properties and inhibition by antifolates. *Mol Pharmacol* 1969; 5:49-59.

Ferone R. Folate metabolism in malaria. *Bull WHO* 1977; 55:291-8.

Ferreira ID, Lopes D, Martinelli A, Ferreira C, do Rosário VE, Cravo P. *In vitro* assessment of artesunate, artemether and amodiaquine susceptibility and molecular analysis of putative resistance associated mutations of *Plasmodium falciparum* from São Tomé and Príncipe. *Trop Med Int Health* 2007; 12:353-62.

Ferreira ID, Martinelli A, Rodrigues LA, do Carmo EL, do Rosário VE, Póvoa MM, Cravo P. *Plasmodium falciparum* from Pará state (Brazil) shows satisfactory *in vitro* response to artemisinin derivatives and absence of the S769N mutation in the SERCA-type PfATPase6. *Trop Med Int Health* 2008; 13:199-207.

Ferreira ID, Rosário VE, Cravo PV. Real-time quantitative with SYBR Green I detection for estimating copy numbers of nine drug resistance candidate genes in *Plasmodium falciparum. Malar J* 2006; 18:1-6.

Fidock AD, Nomura T, Talley KA, Cooper AR, Dzekunov MS, Ferdig TM, Ursos ML, Sidhu AB, Naude B, Deitsch WK, Su ZX, Wootton CJ, Roepe DP, Wellems TE. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein *Pfcrt* and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* 2000; 6:861-71.

Figueiredo P, Benchimol C, Lopes D, Bernardino L, do Rosário VE, Varandas L, Nogueira F. Prevalence of *pfmdr1*, *pfcrt*, *pfdhfr* and *pf*dhps mutations associated with drug resistance, in Luanda, Angola. *Malar J* 2008; 17:236-42.

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

Fogh S, Jepsen S, Effersoe P. Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1979; 73:228-9.

Gama BE, de Oliveira NK, Zalis MG, de Souza JM, Santos F, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz Mde F. Chloroquine and sulphadoxine-pyrimethamine sensitivity of *Plasmodium falciparum* parasites in a Brazilian endemic area. *Malar J* 2009; 8:156.

Gama BE, de Oliveira NK, de Souza JM, Santos F, de Carvalho LJ, Melo YF, Rosenthal PJ, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz Mde F. Brazilian *Plasmodium falciparum* isolates: investigation of candidate polymorphisms for artemisinin resistance before introduction of artemisinin-based combination therapy. *Malar J* 2010; 9:355.

Gardner KB, Sinha I, Bustamante LY, Day NP, White NJ, Woodrow CJ. Protein-based signatures of functional evolution in *Plasmodium falciparum BMC Evol Biol* 2011; 11:257.

Gbotosho GO, Folarin OA, Bustamante C, da Silva LH, Mesquita E, Sowunmi A, Zalis MG, Oduola AM, Happi CT. Different patterns of *pfcrt* and *pfmdr1* polymorphisms in *P. falciparum* isolates from Nigeria and Brazil: the potential role of antimalarial drug selection pressure. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 86:211-3.

Griffin CE, Hoke JM, Samarakoon U, Duan J, Mu J, Ferdig MT, Warhurst DC, Cooper RA. Mutation in the *Plasmodium falciparum* CRT protein determines the stereospecific activity of antimalarial cinchona alkaloids. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:5356-64.

Griffing S, Syphard L, Sridaran S, McCollum AM, Mixson-Hayden T, Vinayak S, Villegas L, Barnwell JW, Escalante AA, Udhayakumar V. *Pfmdr1* amplification and fixation of *pfcrt* chloroquine resistance alleles in *Plasmodium falciparum* in Venezuela. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:1572-9.

Harinasuta T, Suntharasamai P, Viravan C. Chloroquine-resistant *falciparum* malaria in Thailand. *Lancet* 1965; 2:657-60.

Haynes RK, Chan WC, Lung CM, Uhlemann AC, Eckstein U, Taramelli D, Parapini S, Monti D, Krishna S. The Fe^{2+}-mediated decomposition, *Pf*ATP6 binding, and antimalarial activities of artemisone and other artemisinins: the unlikelihood of C-centered radicals as bioactive intermediates. *Chem Med Chem* 2007; 2:1480-97.

Hayward R, Saliba KJ, Kirk K. *Pfmdr1* mutations associated with chloroquine resistance incur a fitness cost in *Plasmodium falciparum*. Mol Microbiol 2005; 55:1285–95.

Henriques G, Martinelli A, Rodrigues L, Modrzynska K, Fawcett R, Houston DR, Borges ST, d'Alessandro U, Tinto H, Karema C, Hunt P, Cravo P. Artemisinin resistance in rodent malaria – mutation in the AP2 adaptor μ-

chain suggests involvement of endocytosis and membrane protein trafficking. *Mal J* 2013; 12:118.

Hernández DC, Guerra AP, Cucunubá ZM, Nicholls RS, Barrera SM. Haplotypes associated with resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* in two malaria endemic locations in Colombia. Infect Genet Evol 2013; 18:183-90.

Higgins CF. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* 2007; 446:749-57.

Hulden L, Hulden L, Heliovaara K. Endemic malaria: an 'indoor' disease in northern Europe. Historical data analysed. *Malar J* 2005; 4:19.

Hurwitz ES, Johnson D, Campbell CC. Resistance of *Plasmodium falciparum* malaria to sulfadoxine-pyrimethamine (Fansidar) in refugee camps in Thailand. *Lancet* 1981; i: 1968-70.

Hyde JE. Drug-resistant malaria—an insight. Fed Europ Biochem Soc J 2007; 274:4688-98.

Ibrahim ML, Khim N, Adam HH, Ariey F, Duchemin JB. Polymorphism of *PfATPase* in Niger: detection of three new point mutations. *Malar J* 2009; 8:28.

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 SERCAtype *Pf*ATPase6. *Lancet* 2005; 366:1960-3.

Jambou R, Martinelli A, Pinto J, Gribaldo S, Legrand E, Niang M, Kim N, Pharath L, Volnay B, Ekala MT, Bouchier C, Fandeur T, Berzosa P, Benito A, Ferreira ID, Ferreira C, Vieira PP, Alecrim Md, Mercereau-Puijalon O, Cravo P. Geographic structuring of the *Plasmodium falciparum* sarco(endo)plasmic reticulum Ca2+ ATPase (PfSERCA) gene diversity. *PLoS One* 2010; 5:e9424.

Jeffress M, Fields S. Identification of putative *Plasmodium falciparum* mefloquine resistance genes. *Mol Biochem Parasitol* 2005; 139:133-9.

Jelinek T, Schelbert P, Löscher T, Eichenlaub D. Quinine resistant *falciparum* malaria acquired in east Africa. *Trop Med Parasitol* 1995; 46:38-40.

Kimura M, Miyake H, Kim HS, Tanabe M, Arai M, Kawai S, Yamane A, Wataya Y. Species-specific PCR detection of malaria parasites by microtiter plate hybridization: clinical study with malaria patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2342-6.

Krotoski WA. The hypnozoite and malarial relapse. *Prog Clin Parasitol* 1989; 1: 1-19.

Kshirsagar NA, Gogtay NJ, Rojgor D, Dalvi SS, Wakde M. An unusual case of multidrug-resistant *Plasmodium vivax* malaria in Mumbai (Bombay), India. *Ann Trop Med Parasitol* 2000; 94:189-90.

Kublin JG, Cortese JF, Njunju EM, Mukadam RA, Wirima JJ, Kazembe PN, Djimdé AA, Kouriba B, Taylor TE, Plowe CV. Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *J Infect Dis* 2003; 187:1870-5.

Kublin JG, Dzinjalamala FK, Kamwendo DD, Malkin EM, Cortese JF, Martino LM, Mukadam RA, Rogerson SJ, Lescano AG, Molyneux ME, Winstanley PA, Chimpeni P, Taylor TE, Plowe CV. Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria *J Infect Dis* 2002; 185:380-8.

Kuhn Y, Sanchez CP, Ayoub D, Saridaki T, van Dorsselaer A, Lanzer M. Trafficking of the phosphoprotein *Pfcrt* to the digestive vacuolar membrane in *Plasmodium falciparum*. *Traffic* 2010; 11:236–49.

Laufer MK, Takala-Harrison S, Dzinjalamala FK, Stine OC, Taylor TE, Plowe CV. Return of chloroquine-susceptible *falciparum* malaria in Malawi was a reexpansion of diverse susceptible parasites. *J Infect Dis* 2010; 202:801-8.

Legrand E, Yrinesi J, Ekala MT, Péneau J, Volney B, Berger F, Bouchier C, Bertani S, Musset L, Meynard JB, Mercereau-Puijalon O . Discordant temporal evolution of *Pfcrt* and *Pfmdr1* genotypes and *Plasmodium falciparum in vitro* drug susceptibility to 4-aminoquinolines after drug policy change in French Guiana. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:1382-9.

Lim AS, Galatis D, Cowman AF. *Plasmodium falciparum*: Amplification and overexpression of *Pfmdr1* is not necessary for increased mefloquine resistance. *Exp Parasitol* 1996; 83:295-303.

Loeb RF, Clark WM, Coatney GR, Coggeshall LT, Dilvaide FR, Dochez AR, Hakansson EG, Marshall EK, Marvel CS, McCoy OR, Sapero JJ, Sebrell WH, Schannon JA, Carden GA. Activity of a new antimalarial agent (SN 7618). *JAMA* 1946; 130:1069-70.

Londono BL, Eisele TP, Keating J, Bennett A, Chattopadhyay C, Heyliger G, Mack B, Rawson I, Vely JF, Désinor O, Krogstad DJ. Chloroquine-resistant haplotype *Plasmodium falciparum* parasites, Haiti. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:735-40.

Lopes D, Rungsihirunrat K, Nogueira F, Seugorn A, Gil JP, Rosário VE, Cravo P. Molecular characterisation of drug-resistant *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Mal J* 2002; 14:1-12.

Lynch C, Pearce R, Pota H, Cox J, Abeku TA, Rwakimari J, Naidoo I, Tibenderana J, Roper C. Emergence of a dhfr mutation conferring high-level drug resistance in *Plasmodium falciparum* populations from southwest Uganda. *JID* 2008; 197:1598-604.

Makler MT, Hinrichs DJ. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48:205-10.

Mang'era CM, Mbai FN, Omedo IA, Mireji PO, Omar SA. Changes in genotypes of *Plasmodium falciparum* human malaria parasite following withdrawal of chloroquine in Tiwi, Kenya. *Acta Trop* 2012; 123:202-7.

Martin RE, Kirk K. The malaria parasite's chloroquine resistance protein of *Plasmodium falciparum* is a member of the drug/metabolite transporter superfamily. *Microbiology* 2004; 150:1-3.

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

Martin RE, Marchetti RV, Cowan AI, Howitt SM, Broer S, Kirk K,. Chloroquine transport via the malaria parasite's chloroquine resistance transporter. *Science* 2009; 325:1680–2.

McCollum A, Mueller K, Villegas L, Udhayakumar V, Escalante A. Common origin and fixation of *Plasmodium falciparum dhfr* and *dhps* mutations associated with sulphadoxine-pyrimethamine resistance in a low transmission area in South America, 2007. *Antimicrob. Agents Chemother* 2007; 51:2085-91.

Mendes C, Salgueiro P, Gonzalez V, Berzosa P, Benito A, do Rosário VE, de Sousa B, Cano J, Arez AP. Genetic diversity and signatures of selection of drug resistance in *Plasmodium* populations from both human and mosquito hosts in continental Equatorial Guinea. *Malar J* 2013; 12:114.

Mendez F, Muñoz A, Carrasquilla G, Jurado D, Arévalo-Herrera M, Cortese JF, Plowe CV. Determinants of treatment response to sulfadoxine–pyrimethamine and subsequent transmission potential in *falciparum* malaria. *Am J Epidemiol* 2002; 156:230-8.

Menegon M, Sannella AR, Majori G, Severini C. Detection of novel point mutations in the *Plasmodium falciparum ATPase6* candidate gene for resistance to artemisinins. *Parasitol Int* 2008; 57:233-5.

Miao M, Wang Z, Yang Z, Yuan L, Parker DM, Putaporntip C, Jongwutiwes S, Xangsayarath P, Pongvongsa T, Moji H, Dinh Tuong T, Abe T, Nakazawa S, Kyaw MP, Yan G, Sirichaisinthop J, Sattabongkot J, Mu J, Su XZ, Kaneko O, Cui L. Genetic diversity and lack of artemisinin selection signature on the

Plasmodium falciparum ATP6 in the Greater Mekong Subregion. *PLoS One* 2013; 8:e59192.

Migasena S, Bunnag D, Harinasuta T. A case of *Plasmodium falciparum* in Thailand apparently resistant to quinine. *Ann Trop Med Parasitol* 1980; 74:243-4.

Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002; 415:673-9.

Mita T, Tanabe K, Kita K. Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance. *Parasitol Int* 2009; 58:201-9.

Moore DV, Lanier JE. Observations on two *Plasmodium falciparum* infections with an abnormal response to chloroquine. *Am J Trop Med Hyg* 1961; 10:5-9.

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

Mugittu K, Genton B, Mshinda H, Beck HP. Molecular monitoring of *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin in Tanzania *Malar J* 2006;5:126.

Murray CK, Gasser RA, Magill AJ, Miller RS. Update on rapid diagnostic testing for malaria. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21:97-110.

Mwai L, Ochong E, Abdirahman A, Kiara SM, Ward S, Kokwaro G, Sasi P, Marsh K, Borrmann S, Mackinnon M, Nzila A. Chloroquine resistance before and after its withdrawal in Kenya. *Malar J*. 2009; 8:106.

Na-Bangchang K, Congpuong K. Current malaria status and distribution of drug resistance in East and Southeast Asia with special focus to Thailand. *Tohoku J Exp Med* 2007; 211:99-113.

Neiva, A. Formação de raça do hematozoário do impaludismo resistente à quinina*. Mem Inst Oswaldo Cruz* 1910; 2:131-40.

Neuberger A, Zhong K, Kain KC, Schwartz E. Lack of evidence for chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria, Leogane, Haiti. *Emerg Infect Dis* 2012;18:1487-9.

Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM, Artemisinin Resistance in Cambodia 1 (ARC1) Study Consortium. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med* 2008; 359:2619-20.

Okombo J, Ohuma E, Picot S, Nzila A. Update on genetic markers of quinine resistance in *Plasmodium falciparum Mol Biochem Parasitol* 2011; 177:77-82.

Olliaro P. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarials drugs. *Pharmacology Therapeutics* 2001; 89:207-19.

Orjih AU, Ryerse JS, Fetch CD. Hemoglobin catabolism and the killing of intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* by chloroquine. *Experientia* 1994; 50:34-9.

Payne, D. Did medicated salt hasten the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*? *Parasitol Today* 1988, 4:112–5.

Perandin F, Manca N, Calderaro A, Piccolo G, Galati L, Ricci L, Medici MC, Arcangeletti MC, Snounou G, Dettori G, Chezzi C. Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1214-9.

Petersen I, Eastman R, Lanzer M. Drug-resistant malaria: Molecular mechanisms and implications for public health *FEBS Letters* 2011; 585: 1551-62.

Peterson DS, Di Santi SM, Povoa 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.

Peterson DS, Walliker D, Wellems TE. Evidence that a point mutation in dihidrofolate reductase thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria. *PNAS USA* 1988; 85:9114-8.

Phompradit P, Wisedpanichkij R, Muhamad P, Chaijaroenkul W, Na-Bangchang K. Molecular analysis of *pfatp6* and *pfmdr1* polymorphisms and their association with *in vitro* sensitivity in *Plasmodium falciparum* isolates from the Thai-Myanmar border. *Acta Trop* 2011; 120:130-135.

Phyo AP, Nkhoma S, Stepniewska K, Ashley EA, Nair S, McGready R, ler Moo C, Al-Saai S, Dondorp AM, Lwin KM, Singhasivanon P, Day NP, White NJ, Anderson TJ, Nosten F. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet* 2012; 379:1960-6.

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.

Plowe CV, Cortese JF, Djimde A, Nwanyanwu OC, Watkins WM, Winstanley PA, Estrada-Franco JG, Mollinedo RE, Avila JC, Cespedes JL, Carter D, Doumbo OK. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase

and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *J Infect Dis* 1997; 176:1590-6.

Plowe CV, Djimde A, Bouare M, Doumbo O, Wellems TE. Pyrimethamine and proguanil resistance – conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction method for surveillance in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52:565-8.

Plowe, CV. The evolution of drug-resistant malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103:11-4.

Pradines B, Pages JN, Barbe J. Chemosensitizers in drug transport mechanisms involved in protozoan resistance. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2005; 5:411-31.

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

Price RN, 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.

Prudêncio M, Rodriguez A, Mota MM. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4:849-56.

Raj DK, Mu J, Jiang H, Kabat J, Singh S, Sullivan M, Fay MP, McCutchan TF, Su XZ. Disruption of a *Plasmodium falciparum* multidrug resistance-associated protein (*Pf*MRP) alters its fitness and transport of antimalarial drugs and glutathione. *Biol Chem* 2009; 284:7687-96.

Rason MA, Andrianantenaina HB, Ariey F, Raveloson A, Domarle O, Randrianarivelojosia M. Prevalent *pfmdr1* n86y mutant *Plasmodium falciparum* in Madagascar despite absence of pfcrt mutant strains. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76:1079-83.

Raster M, Horn F, Jünemann A, Rosa AA, Souza GS, Gomes BD, Lima MG, Silveira LC, Kremers J. Retinal disorders in northern Brazilian patients treated with chloroquine assessed by multifocal ERG. *Doc Ophthalmol* 2011; 122:77-86.

Reacher M, Campbell CC, Freeman J, Doberstyn EB, Brandling-Bennett AD. Drug therapy for *Plasmodium falciparum* malaria resistant to pyrimethamine-sulfadoxine (Fansidar). A study of alternative regimens in Eastern Thailand, 1980. *Lancet* 1981; 1:66-8.

Restrepo E, Carmona-Fonseca J, Maestre A. *Plasmodium falciparum*: high frequency of *pfcrt* point mutations and emergence of new mutant haplotypes in Colombia. *Biomedica* 2008; 28:523-30.

Retief F, Cilliers L. Periodic pyrexia and malaria in antiquity. *S Afr Med J* 2006; 96:686-8.

Rieckmann KH, Davis DR, Hutton DC. *Plasmodium vivax* resistance to choloroquine? *Lancet* 1989; 2:1183-84.

Rieckmann KH, McNamara JV, Frischer H, Stockert TA, Carson PE, Powell RD. Effects of chloroquine, quinine and cycloguanil upon the maturation of assexual erythrocytic forms of two strains of *Plasmodium falciparum in vitro*. *Am J Trop Med Hyg* 1968; 17:661-71.

Ritchie GY, Mungthin M, Green JE, Bray PG, Hawley SR, Ward SA. *In vitro* selection of halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* is not associated with increased expression of Pgh1. *Mol Biochem Parasitol* 1996; 83:35-46.

Rodrigues da Silva J. Terçã maligna "cloroquino-resistente"- uma séria ameaça ao "Hinterland" brasileiro. *Tribuna Médica* 1961; 160:2-6.

Roepe PD. Molecular and physiologic basis of quinoline drug resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Future Microbiology* 2009; 4:441–55.

Rohrbach P, Sanchez CP, Hayton K, Friedrich O, Patel J, Sidhu AB, Ferdig MT, Fidock DA, Lanzer M. Genetic linkage of *pfmdr1* with food vacuolar solute import in *Plasmodium falciparum*. *EMBO J* 2006; 25:3000-11.

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

Ross R. An improved method for microscopical diagnosis of intermittent fevers. *Lancet* 1903; 1: 86-7.

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

Rubio JP, Cowman AF. The ATP-binding cassette (ABC) gene family of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today*. 1996; 12:135-40.

Rumans LW, Dennis DT, Atmoesoedjono S. Fansidar resistant *falciparum* malaria in Indonesia. *Lancet* 1979; 2:580-1.

Russell PF. The United States and malaria: debits and credits. *Bull N Y Acad Med* 1968; 44:623-53.

Sá JM, Twu O, Hayton K, Reyes S, Fay MP, Ringwald P, Wellems TE. Geographic patterns of *Plasmodium falciparum* drug resistance distinguished by differential responses to amodiaquine and chloroquine. *Proc Natl Acad Sci* USA 2009; 106:18883-9.

Sallares R. Malaria and Rome: a history of malaria in ancient Italy. New York (NY): *Oxford University Press*; 2002.

Sanchez CP, Stein WD, Lanzer M. Dissecting the components of quinine accumulation in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 2008; 67:1081-93.

Sanchez CP, McLean JE, Stein W, Lanzer M,. Evidence for a substrate specific and inhibitable drug efflux system in chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* strains. *Biochemistry* 2004; 43, 16365-73.

Sanchez CP1, Dave A, Stein WD, Lanzer M. Transporters as mediators of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol* 2010; 40:1109-18.

Santana Filho FS, Lima-Arcanjo AR, Chehuan YM, Costa MR, Martinez-Espinosa FE, Vieira JL, Barbosa MG, Alecrim WD, Alecrim MG. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 1125-9.

Schlagenhauf P. Mefloquine for malaria chemoprophylaxis 1992-1998: a review. *J Travel Med 1999*; 6:122-33.

Segurado AA, Di Santi SM, Shiroma M. *In vivo* and *in vitro Plasmodium falciparum* resistance to chloroquine, amodiaquine and quinine in the Brazilian Amazon. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1997; 39:85-90.

Sérandour J, Girel J, Boyer S, Ravanel P, Lemperière G, Raveton M. How human practices have affected vector-borne diseases in the past: a study of malaria transmission in Alpine valleys. *Malar J* 2007; 6:115.

Sharma A, Khanduri U. How benign is benign tertian malaria? *J Vector Borne Dis* 2009; 46:141-4.

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.

Sidhu AB, Verdier-Pinard D, Fidock DA. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by *pfcrt* mutations. *Science* 2002; 298:210-3.

Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60: 687-92.

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

Slater AF. Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol Ther* 1993; 57:203-35.

Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario 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.

Soto J, Toledo J, Gutierrez P, Luzz M, Llinas N, Cedeno N, Dunne M, Berman J. *Plasmodium vivax* clinically resistant to chloroquine in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65:90-3.

Spencer HC. Drug-resistant malaria-changing patterns mean difficult decisions. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985; 79:748-58.

Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* 2006; 313:1287-90.

Tahar R, Ringwald P, Basco LK. Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XXVIII. *In vitro* activity of dihydroartemisinin against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* and sequence analysis of the *P. falciparum ATPase6* gene. *Am J Trop MedHyg* 2009; 81:13-8.

Tanabe K, Zakeri S, Palacpac NM, Afsharpad M, Randrianarivelojosia M, Kaneko A, Marma AS, Horii T, Mita T. Spontaneous mutations in the *Plasmodium falciparum* sarcoplasmic/ endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase (PfATP6) gene among geographically widespread parasite populations unexposed to artemisinin-based combination therapies. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:94-100.

Terkuile F, White NJ, Holloway P, Pasvol G, Krishna S. *Plasmodium falciparum*: *in vitro* studies of the pharmacodynamic properties of drugs used for the treatment of severe malaria. *Exp Parasitol* 1993; 76:85-95.

Trape JF. The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 64:12-7.

Vasconcelos KF, Plowe CV, Fontes CJ, Kyle D, Wirth DF, Pereira da Silva LH, Zalis MG. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of isolates from the Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95:721-8.

Viana GM, Machado RL, Calvosa VS, Póvoa MM. Mutations in the *pfmdr1*, cg2, and *pfcrt* genes in *Plasmodium falciparum* samples from endemic malaria areas in Rondonia and Pará State, Brazilian Amazon Region. *Cad Saude Publica* 2006; 22:2703-11.

Vieira PP, Ferreira MU, Alecrim MG, Alecrim WD, da Silva LH, Sihuincha MM, Joy DA, Mu J, Su XZ, Zalis MG. *Pfcrt* polymorphism and the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* populations across the Amazon Basin. *J Infect Dis* 2004; 190:417-24.

Wang X, Mu J, Li G, Chen P, Guo X, Fu L, Chen L, Su X, Wellems TE. Decreased prevalence of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter 76T marker associated with cessation of chloroquine use against *P. falciparum* malaria in Hainan, People's Republic of China. *Am J TropMed Hyg* 2005; 72:410-4.

Wellems TE, Hayton K, Fairhurst RM. The impact of malaria parasitism: from corpuscles to communities. *J Clin Invest* 2009; 119:2496-505.

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

Wellems TE, Plowe CV. Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis* 2001; 184:770-6.

Wellems TE, Walker-Jonah, Panton LJ. Genetic mapping of the chloroquine-resistance locus on *Plasmodium falciparum* chromosome 7. *PNAS USA* 1991; 88:3382-6.

Wernsdorfer WH. Drug resistance, current studies and future prospects. *Scand J Infect Dis* 1982; 36:26-30.

White NJ, Pongtavornpinyo W, Maude RJ, Saralamba S, Aguas R, Stepniewska K, Lee SJ, Dondorp AM, White LJ, Day NP. Hyperparasitaemia and low dosing are an important source of anti-malarial drug resistance. *Malaria J* 2009; 8:253.

White NJ, Pongtavornpinyo W). The *de novo* selection of drug-resistant malaria parasites. *Proceedings Biol Sci* 2003; 270:545-54.

White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. *Lancet*. 2013 15. pii: S0140-6736(13)60024-0

Wongsrichanalai C, Meshnick SR. Declining artesunate-mefloquine efficacy against *falciparum* malaria on the Cambodia–Thailand border. *Emerg Infect Dis* 2008; 14:716-9.

Wongsrichanalai C, Prajakwong S, Meshnick SR, Shanks GD, Thimasarn K. Mefloquine – its 20 years in the Thai Malaria Control Program. *South Asian J Trop Med Public Health* 2004; 35:300-8.

WHO. World Health Organization. Advances in malaria chemotherapy. *WHO Tech Rep Ser* 1984; 711. 218 p.

WHO. World Health Organization. Chemotherapy of malaria and resistance to antimalarials. *WHO Tech Rep Ser* 1973; 529. 219 p.

WHOa. World Health Organization. *Emergency response to artemisinin resistance in the Greater Mekong subregion: regional framework for action 2013-2015*. Geneva: World Health Organization; 2013. 40 p

WHO. World Health Organization. *Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000–2010*. Geneva: World Health Organization; 2010.

WHO. World Health Organization. Scientific Group on Chemotherapy of Malaria. *WHO Tech Rep Ser* 1967; 375. 92 pp.

WHO. World Health Organization. *The use of antimalarial drugs. Report of an informal consultation*. Geneva, WHO/CDS/RBM/2001.33. Geneva: World Health Organization; 2001. 144 pp.

WHO. World Health Organization. *World Malaria Report 2013*. WHO/HTM/GMP/2013.1. Geneva: World Health Organizatio; 2013.

Zakeri S, Hemati S, Pirahmadi S, Afsharpad M, Raeisi A, Djadid ND. Molecular assessment of *atpase6* mutations associated with artemisinin resistance among unexposed and exposed *Plasmodium falciparum* clinical isolates to artemisinin-based combination therapy. *Malar J* 2012; 11:373.

Zhang G, Guan Y, Zheng B, Wu S, Tang L. No PfATPase6 S769N mutation found in *Plasmodium falciparum* isolates from China. *Malaria J* 2008; 8:122.

Zhou Z, Griffing S, Macedo A, McCollum A, Marquino W, Arrospide N, Escalante AA, Udhayakumar V. Decline in sulfadoxine–pyrimethamine resistant alleles after change in drug policy in the Amazon region of Peru. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:739-41.

.

ANEXOS

Anexo I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO 1
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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: Marcadores moleculares para análise do polimorfismo genético relacionado à resposta de *Plasmodium falciparum* aos antimaláricos.

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: 24 meses.

1 – Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa a avaliar se os parasitos que causam a malária por *P. falciparum* sofreram modificações que fazem com que se tornem resistentes aos antimaláricos, o que auxiliará na escolha dos tratamentos para a doença.

2 – Serão realizados testes para verificar por meio da análise do DNA dos parasitos se estas alterações estão ou não presentes. Estes exames são diferentes daqueles que são utilizados para diagnóstico de malária rotineiro, sendo utilizados somente em estudos.

3 – Será coletado um tubo de 5 ml (aproximadamente uma colher de sopa rasa) de sangue da veia do antebraço, 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, trata-se de estudo experimental, testando em laboratório alterações que causem resistência aos antimaláricos, e somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.

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) terá acesso ao profissional responsável pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas, que é Dra. Silvia M. Di Santi, que pode ser encontrada na Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 4º andar, Ambulatório dos Viajantes, Laboratório de Malária, tel. 3069-8025. Se o senhor (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de

Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar, tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26, e-mail: cappesq@hcnet.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 tratamento 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 paciente.

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 compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 – Esta amostra será utilizada para este estudo, sendo que parte dele será realizada no exterior, seguindo as normas para remessa de material biológico para fora do país. 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 Biobanco, 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, chefe do Núcleo de Estudo em Malária. O senhor (a) pode concordar ou não em armazená-la para eventuais estudos posteriores, com a garantia que estes 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:

☐ Concordo com o armazenamento desde que assinando novo consentimento

☐ Concordo com o armazenamento sem necessidade de novo consentimento

☐ Não concordo com o armazenamento

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, pois o único procedimento é a coleta de sangue. 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 "Marcadores moleculares para análise do polimorfismo genético relacionado à resposta de *Plasmodium falciparum* aos antimaláricos.". 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. 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 menores de 18 anos, 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 II – Carta de aprovação da CONEP

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER Nº 206/2012

Registro CONEP 16498 **(Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)**

Folha de Rosto - 356868 **Processo nº 25000.089153/2011-80**
Projeto de Pesquisa: *"Marcadores moleculares para análise do polimorfismo genético relacionado à resposta de Plasmodium falciparum aos antimaláricos"*
Pesquisador Responsável: Dra. Sílvia Maria de Fátima Di Santi
Instituição: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HCFMUSP) **(1º CENTRO)**
CEP de origem: CEP do HCFMUSP
Área Temática Especial: Pesquisa com cooperação estrangeira
Patrocinador: Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo

Sumário geral do protocolo

A malária é uma moléstia infecciosa causada por parasitos do gênero *Plasmodium* transmitida pela picada de mosquitos infectados do gênero *Anopheles*. As espécies que infectam humanos são *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*, este recentemente descrito como a quinta espécie que acomete o homem, causando infecções graves. Os principais sintomas associados à malária são febre intermitente, cefaléia, anemia e esplenomegalia. *P. falciparum* pode ocasionar malária grave e óbito se o diagnóstico e o tratamento específico não forem realizados rapidamente após o início dos sintomas, principalmente em gestantes e primoinfectados. Mais recentemente, foram relatados casos graves, incluindo óbitos, devido a infecções por *P. knowlesi* e *P. vivax*. A malária causada por *P. falciparum* pode apresentar episódios de recrudescência, motivados por resistência do parasito ao antimalárico utilizado.

Estima-se que 247 milhões de casos clínicos ocorram anualmente, em uma população sob risco que atinge mais de 3 bilhões de pessoas, e cerca de um milhão de óbitos, acometendo principalmente crianças africanas com menos de 5 anos de idade. As principais estratégias dos programas de controle integrado visam conter o avanço da endemia com o uso de mosquiteiros tratados com inseticidas, borrifação intra-domiciliar, tratamento preventivo intermitente de gestantes, diagnóstico precoce e terapêutica baseada na associação de artemisinina com outros antimaláricos (*artemisinin-based combination therapy*; ACT).

No Brasil, em 2008 foram registrados 306.347 casos, sendo o estado do Amazonas responsável pelo maior número, totalizando 131.437 casos. Em seguida, aparecem os estados do Pará, com 66.266 casos, e Rondônia, com 48.932. No país, há transmissão de três espécies de *Plasmodium*, sendo *P. vivax* a espécie mais prevalente, contribuindo com 79,6% dos casos, seguida por *P. falciparum*, com 19,3%, e infecções associadas de *P. vivax* e *P. falciparum*, com 1,1%. *P. malariae* é uma espécie de ocorrência rara, provavelmente devido à dificuldade de diferenciação com *P. vivax*. A redução nos casos de malária por *P. falciparum* em praticamente todos os estados pode, em parte, ser

atribuída à mudança no tratamento de primeira escolha, substituindo o esquema terapêutico de quinino e doxiciclina por combinações com derivados da artemisinina.

O *P. falciparum* possui um genoma complexo, o que lhe confere capacidade de adaptar-se a qualquer droga. A pressão seletiva de drogas, seja pela adoção de esquemas inadequados, pela baixa aderência do paciente ao tratamento ou pelo uso de quimioprofilaxia de modo indiscriminado, resulta no surgimento de mutações que conferem resistência. A Rede Amazônica de Vigilância da Resistência às Drogas Antimaláricas (Ravreda) foi criada em 2001 com o objetivo de monitorar a resistência às drogas antimaláricas, com foco nos estudos sobre a eficácia dos tratamentos de primeira escolha e avaliação da resistência dos *P. vivax* e *P. falciparum*, além do impacto do uso de tratamento combinado com derivados de artemisinina na transmissão da malária, o que indica a necessidade de monitoramento constante da resistência nas diferentes regiões brasileiras.

A diminuição da sensibilidade aos antimaláricos tem sido objeto de diversos estudos, baseados essencialmente na identificação de genes do *P. falciparum* e na análise de polimorfismos, notadamente SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) envolvidos nos mecanismos que permitem ao parasito adaptar-se à presença de fármacos. Em vista da multiresistência detectada no Brasil, baseada principalmente na análise fenotípica, a proposta de um estudo comparativo entre a avaliação *in vivo*, que será realizada em projeto paralelo por infectologistas do grupo, e a frequência de polimorfismos genéticos é considerada fundamental pelos proponentes do estudo em tela, visando o entendimento do fenômeno da resistência e a adoção de esquemas alternativos para o tratamento da malária. A adoção de diferentes marcadores moleculares para diversos antimaláricos permitirá mapear simultaneamente o perfil genético de *P. falciparum* com relação às mutações associadas à resistência. Além disso, o estudo permitirá o processamento de grande número de amostras provenientes de diferentes regiões geográficas. Segundo os proponentes, o presente estudo, que abrange um conjunto de parâmetros para avaliação da resposta do *P. falciparum* aos antimaláricos, é inédito no Brasil.

Neste contexto, os objetivos propostos são: "1. Verificar a frequência de mutações nos genes de P. falciparum relacionados à resistência, nomeadamente, pfcrt, pfmdr1, pfATPase6, pfubp1, Pf (cromossomo 13), pfdhfr e pfdhps"; e "2. Determinar associações estatisticamente significativas entre a resposta *in vivo* e os polimorfismos nos genes acima descritos".

O tamanho da amostra proposta para o estudo considera a genotipagem de 100 amostras de sangue, sendo 50 integrantes do estudo prospectivo (Grupo A) e 50 do estudo retrospectivo (Grupo B), conforme segue:

A) Avaliação prospectiva da frequência de mutações, com uso de marcadores moleculares da resposta a antimaláricos, em 50 amostras de pacientes admitidos no Ambulatório dos Viajantes do HCFMUSP com diagnóstico de *P. falciparum* realizado no Núcleo de Estudos em Malária da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), no Instituto de Infectologia Emílio Ribas ou no Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (NUMETROP), em Santarém/PA.

B) Avaliação retrospectiva de 50 isolados criopreservados de *P. falciparum*, utilizando marcadores moleculares relacionados à resposta de *P. falciparum* à artemisinina, mefloquina, quinino, cloroquina, pirimetamina e sulfadoxina, em amostras coletadas entre 1985 e 2009, que compõem o Banco de Cepas do Núcleo de Estudos em Malária.

Para a amostragem prospectiva é considerada a casuística baseada na média de pacientes diagnosticados com *P. falciparum* nos dois últimos anos nas duas unidades de diagnóstico e tratamento da endemia no município de São Paulo, quais sejam, o Núcleo

de Estudos em Malária/Ambulatório dos Viajantes/HCFMUSP e o Instituto de Infectologia Emílio Ribas. Em cada uma destas unidades a média anual é de 15 casos, somando, portanto, 30 casos. Para completar a amostragem de 50 casos prospectivos, considera-se viável a coleta de 20 casos no NUMETROP no município de Santarém, face ao perfil epidemiológico desta região, endêmica para malária. O município de Santarém foi considerado devido à relevância do estado do Pará no quadro da malária no Brasil - dados de 2009 demonstram 99.446 casos, num total de 305.868 notificados na Amazônia Legal - além das facilidades de triagem e coleta de pacientes no NUMETROP. As duas unidades de atendimento no município de São Paulo foram consideradas pela estrutura existente para a realização dos experimentos e também pela possibilidade de captação de isolados de toda a região endêmica brasileira, bem como da avaliação acurada de episódios de recrudescência, visto ser impossível a reinfecção.

A identificação da espécie de *Plasmodium* será efetuada por microscopia óptica por meio de gota espessa e por *Nested PCR*, que consiste na amplificação do genoma do parasita através de duas reações de PCR. Na primeira reação utiliza-se um par de oligonucleotídeos que amplificam uma região do gene que codifica a menor subunidade do ácido ribonucléico ribossomal (ssrRNA), específica para o gênero *Plasmodium*. Na segunda reação, utilizam-se quatro pares de oligonucleotídeos distintos que hibridizam dentro da região amplificada e que são específicos para cada uma das espécies (*P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. vivax*). O soro dos pacientes será submetido à avaliação dos níveis séricos da droga utilizada por HPLC.

As amostras do dia "0" serão processadas para análise de polimorfismos em genes relacionados à resistência aos antimaláricos, assim como aquelas provenientes de eventuais recrudescências. As amostras de sangue serão colhidas por punção venosa e em papel filtro Whatman 3® ou em Whatman FTA® e submetidas à extração de DNA com Chelex® 100. Os segmentos dos genes em estudo serão amplificados de acordo com os protocolos descritos para pfATPase6, pfmdr1, pfcrt, pfdhfr e pfdhps. A existência de mutações ou SNPs será identificada através da técnica PCR-RFLP, em que as mutações contidas em cada um dos fragmentos amplificados por PCR serão identificadas pela digestão com enzimas de restrição que reconhecem especificamente os palíndromos originados ou eliminados por determinada mutação. Para pfATPase será realizada PCR seguido por sequenciamento. O estudo do número de cópias do gene pfmdr1 será efetuado através da técnica Real-time PCR com SYBR Green, que permite a quantificação absoluta de DNA presente na amostra. O número de cópias do gene pfmdr1 das amostras será determinado por comparação com os clones Dd2 e 3D7, cujo número de cópias do referido gene é conhecido.

Local de realização

Trata-se de pesquisa nacional e multicêntrica, com cooperação estrangeira, correspondente ao projeto de Mestrado da aluna Juliana Inoue, sob orientação da pesquisadora responsável e orientadora Dra. Sílvia M. Di Santi. Além do Brasil, Portugal participará do estudo por meio das Unidades de Malária e de Biologia Molecular do Centro de Malária e Doenças Tropicais, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, onde serão realizados os ensaios moleculares. Consta garantia de que as amostras retornarão ao Brasil juntamente com a pós-graduanda.

Todos os 100 sujeitos de pesquisa são brasileiros, sendo 75 oriundos do centro em tela. Além deste, no Brasil, participarão os seguintes centros: Ambulatório dos Viajantes/HCFMUSP (responsável local: Marcos Boulos; Comitê de Ética em Pesquisa: Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP - CAPPesq); Núcleo de Extensão em Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da USP em Santarém/PA (Marcos Boulos; Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

do HCFMUSP - CAPPesq); Instituto de Infectologia "Emílio Ribas" (Marcos Vinícius da Silva; Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas da Coordenadoria de Serviços de Saúde da Secretaria de Estado da Saúde - atualmente o Instituto de Infectologia "Emílio Ribas" está vinculado ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP).

Apresentação do protocolo

A Folha de Rosto (FR – 356868; anexo "14") encontra-se preenchida e assinada pela pesquisadora responsável e pela Dra. Marta Heloisa Lopes (chefe do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da FMUSP) como responsável institucional. Consta indicada a constituição de banco de materiais biológicos.

O modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo "2") proposto é sucinto e redigido em linguagem acessível.

O orçamento detalhado (anexo "6") apresenta custo total correspondente a R$52.192,69, incluindo os insumos necessários aos testes moleculares. Segundo informado neste documento, os recursos financeiros encontram-se aprovados pela Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo e recursos complementares estão sendo solicitados à FAPESP.

O currículo da pesquisadora responsável, disponível na Plataforma Lattes/CNPq, foi apresentado (anexo "4"), observando-se adequação à proposta. Os currículos dos demais integrantes da pesquisa não foram apresentados. No cronograma da pesquisa (anexo "5" observa-se duração estimada de 24 meses, não constando data/época prevista para seu início.

Adicionalmente, constam anexados no CD-ROM do protocolo os seguintes documentos: Ficha de coleta de dados ("anexo "3"); Lista de países participantes (anexo "7"); Lista de centros participantes no Brasil (anexo "8"); Carta anuência - Universidade Federal de Goiás (contendo a concordância do colaborador Pedro Vitor Lemos Cravo em participar da pesquisa; anexo "9"); Carta anuência Lisboa (anexo "10"); Carta de anuência Instituto de Infectologia Emílio Ribas (arquivo encontra-se corrompido, impossibilitando sua abertura; anexo "11"); Carta de anuência Secretaria do Estado do Pará – Santarém (anexo "12"); Carta vínculo temporário Dr. Pedro Vitor Lemos (anexo "13"); e Parecer Consubstanciado CEP-CAPPesq (anexo "15").

Comentários/Considerações

1. Não foram explicitadas informações relativas às características da população a estudar, como faixa etária, sexo, estado de saúde, etc, e os critérios de inclusão e exclusão cabíveis. Em atendimento ao disposto nos itens VI.3."a" e "d" da Resolução CNS 196/96, solicita-se adequação.
2. No documento denominado "Carta Anuência Lisboa", o Professor Doutor Paulo Ferrinho, diretor do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, autoriza a colaboração dos docentes/investigadores Virgílio E. do Rosário, Dinora Ferreira e Marta Machado na realização do projeto [...] <u>a ser implementado no Brasil</u>" (sem grifo no original). No entanto, não consta confirmação de realização de procedimentos laboratoriais nas unidades colaboradoras em Portugal. Neste sentido, solicita-se a apresentação:
    a. da comprovação do acordo entre as instituições envolvidas visando a realização dos ensaios moleculares previstos no protocolo;
    b. da declaração do colaborador responsável em Portugal quanto ao uso do material biológico unicamente para os fins previstos no protocolo (Resolução CNS 292/99, item VII.5) e sobre a destinação do mesmo ao término da pesquisa (Resolução CNS 196/96, item VI.2."n").

3. Conforme indicado na FR e no TCLE do estudo ("Concordo que a amostra de sangue colhida seja armazenada para eventuais estudos, respeitadas as normas para tanto"; página 2/2), haverá constituição de Banco de Materiais Biológicos com vistas à utilização futura. Portanto, solicita-se a comprovação do cumprimento às disposições contidas na Resolução CNS 347/2005, que trata especificamente do armazenamento e utilização de material biológico humano no âmbito de projetos de pesquisa, em particular, a apresentação de 1.1 Justificativa quanto a necessidade e oportunidade para usos futuros e 1.4. Norma ou regulamento elaborado pela instituição depositária para armazenamento de materiais biológicos humanos.
4. Com relação ao TCLE apresentado:
    a. Consta o seguinte informe na página 1/2: "3 - Será coletado um tubo de 5 ml de sangue da veia do antebraço, e todo o material utilizado é descartável" (sem grifo no original). Visando garantir esclarecimento apropriado ao sujeito convidado a participar da pesquisa, solicita-se que seja acrescentada uma medida não técnica correspondente ao volume de sangue necessário (por exemplo, aproximadamente 1 colher de chá) (Resolução CNS 196/96, item IV.1."a").
    b. Na página 1/2 se lê: "4 - O senhor(a) sentirá apenas o desconforto da picada da agulha no momento da coleta do sangue, que será realizada por profissional capacitado". Ainda que raros e transitórios, solicita-se acrescentar os possíveis riscos inerentes à punção venosa, como desmaio, infecção e edema, em linguagem acessível à compreensão leiga (Resolução CNS 196/96, item IV.1."b").
    c. Consta o seguinte informe na página 2/2: "12 - Esta amostra será utilizada para este estudo, porém solicitamos sua concordância em armazená-la para eventuais estudos posteriores, assegurando que esses serão submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa". Porém, não fica claro se o armazenamento diz respeito ao parasita isolado a partir da amostra ou se a própria amostra de sangue e/ou DNA humanos serão armazenados com vistas à pesquisas futuras. Neste segundo caso, é indispensável que conste também que o sujeito será contatado para conceder ou não autorização para uso do material em futuros projetos e que, quando não for possível, o fato será justificado perante o CEP" (Resolução CNS 340/04, item V.1."e").
    d. Não consta informe quanto ao envio de amostra para análise no exterior. Uma vez que o sujeito da pesquisa ou representante legal pode considerar esta informação relevante no seu processo decisório, solicita-se adequação (Resolução CNS 196/96, item IV.1."a").
    e. As formas de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa não se encontram explicitadas (Resolução CNS 196/96, item IV.1."i"). Solicita-se adequação.
    f. Não é informado que o TCLE é redigido em duas vias, sendo uma retida pelo pesquisador responsável e outra pelo sujeito da pesquisa (Resolução CNS 196/96, item IV.2."d"). Solicita-se adequação.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, devendo o CEP verificar o cumprimento das questões acima, antes do início do estudo.

Situação: **Protocolo aprovado com recomendação.**

OBS: No Brasil, além do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, está prevista a participação dos seguintes centros: Ambulatório dos Viajantes/HCFMUSP (responsável local: Marcos Boulos; Comitê de Ética em Pesquisa: Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP - CAPPesq); Núcleo de Extensão em Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da USP em Santarém/PA (Marcos Boulos; Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP - CAPPesq); Instituto de Infectologia "Emílio Ribas" (Marcos Vinícius da Silva; Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas da Coordenadoria de Serviços de Saúde da Secretaria de Estado da Saúde - atualmente o Instituto de Infectologia "Emílio Ribas" está vinculado ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP).

Caso ocorra modificação nessa informação, o CEP do 1º Centro deve ser informado para comunicação à CONEP. O CEP deve enviar cópia dessa comunicação para o pesquisador responsável do seu Centro. Ressalta-se que os centros que não possuem Comitês de Ética em Pesquisa - CEP, devem solicitar a CONEP a indicação de um CEP para a análise do projeto.

NOTA: *Caso na execução do protocolo, em um determinado Centro, haja parceria de instituições no recrutamento e/ou atendimento de sujeitos de pesquisa, solicita-se ao CEP correspondente que observe cuidadosamente os seguintes aspectos, conforme exigências éticas explicitadas nos itens III.3.i, V.5 , VI.2.h, VI.2.i, VI.3.d e VI.3.g da Resolução CNS 196/96 e item IV.1.m da Resolução CNS nº 251/97, com vistas à garantia da assistência ao sujeito da pesquisa, sem prejuízo ao Sistema Único de Saúde:*

1) formas de recrutamento e referência de sujeitos de pesquisa; se serão pacientes do SUS e ou/ particulares; em que instituição estão registrados, ou seja, qual instituição assume as responsabilidades inerentes à "Instituição de Pesquisa";

2) descrição da infra-estrutura disponível para a realização da pesquisa;

3) vínculos do pesquisador;

4) anuência assinada pela diretoria técnica de instituições parceiras, para assistência dos sujeitos de pesquisa, quando for o caso, com apresentação de convênios ou outras relações envolvendo pessoas jurídicas;

Ressalta-se que, havendo envolvimento do SUS em parcerias com instituições privadas, a avaliação desse aspecto extrapola as atribuições do Sistema CEPs-CONEP, devendo o pesquisador e o responsável pela instituição buscar a manifestação do Poder Público Correlato (estadual ou municipal), por meio da respectiva Assessoria Jurídica, em cumprimento à Lei Orgânica da Saúde 8080/91.

Brasília, 16 de abril de 2012.

Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

ds/ak

Anexo III – Carta de Anuência da Divisão de Endemias do 9º Centro Regional de Saúde de Santarém - PA

ORIGINAL

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE PÚBLICA

Pará GOVERNO POPULAR

Santarém - PA, 15 de Outubro de 2010

A Divisão de Endemias do 9º. Centro Regional de Saúde de Santarém - PA declara para os devidos fins que se encontra ciente e concorda com a realização do projeto de pesquisa intitulado: "Marcadores moleculares para análise do polimorfismo genético relacionado à resposta de *Plasmodium falciparum* aos antimaláricos."

O mesmo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, instituição conveniada que conduzirá o estudo.

Atenciosamente,

Evaldo de Jesus Martins
Diretor da Divisão de Endemias
9º CRS/SESPA