



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Contribuição para o Estudo da Resposta Terapêutica *in vivo*
às Combinações Baseadas em Derivados da Artemisinina no
Tratamento da Malária em Maputo**

Elsa da Conceição Lobo

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, ESPECIALIDADE DE PARASITOLOGIA**

JUNHO, 2015



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina

**Contribuição para o Estudo da Resposta Terapêutica *in vivo*
às Combinações Baseadas em Derivados da Artemisinina no
Tratamento da Malária em Maputo**

Autor: Elsa da Conceição Lobo

Orientadora: Investigadora Doutora Maria de Fátima Carvalho Nogueira

Co-orientadora: Professora Doutora Natércia Emília Pedro Fernandes

**Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de
Doutor em Ciências Biomédicas, Especialidade de Parasitologia.**

Apoio Financeiro:

Instituto Português de Apoio ao Desenvolvimento (IPAD), Fundação Calouste Gulbenkian.

JUNHO, 2015

Publicações e Comunicações Científicas

1.1 - Publicações

- 1- Escobar C, Pateira S, **Lobo E**, Lobo L, Teodósio R, Dias F, Fernandes N, Arez AP, Varandas L, Nogueira F. Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* K13-Propeller in Angola and Mozambique after the Introduction of the ACTs. PLoS ONE. 2014; 10 (3): e0119215. doi:10.1371/jour.
- 2- **Lobo E**, de Sousa B, Rosa S, Figueiredo P, Lobo L, Pateira S, Fernandes N, Nogueira F. Prevalence of *pfmdr1* alleles associated with artemether-lumefantrine tolerance/resistance in Maputo before and after the implementation of artemisininbased combination therapy. Malaria J. 2014; 13:300.
- 3- **Lobo E**, de Sousa B, Cassy S, Rosa S, Fernandes N, Nogueira F. Severe Malaria in Mozambican Children: clinic and the role of *RNAse3* gene (em fase de submissão).

1.2 - Comunicações orais

- 1- **Lobo E**, Lobo L, de Sousa B, Fernandes N, do Rosário V, Nogueira F. Eficácia Terapêutica das Combinações AL e ASAQ no tratamento da malária não complicada em Maputo, Moçambique. XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia, 24-27 de Agosto, 2011, Centro de Convenções de Rebouça.
- 2- **Lobo E**, Lobo L, de Sousa B, Fernandes N, do Rosário V, Nogueira F. Therapeutic Efficacy of AL for the treatment of uncomplicated malaria in Maputo, Mozambique; Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane, Maputo, Moçambique. 7th

European Congress on Tropical Medicine & International Health, October 3-6, 2011, Barcelona, Espanha.

- 3- **Lobo E**, Lobo L, de Sousa B, do Rosário V, Fernandes N, Nogueira F. Eficácia Terapêutica do AL e do ASAQ no tratamento da malária não complicada em Maputo, Moçambique. XIV Jornadas de Saúde em Maputo 2012, Centro de Conferências Joaquim Chissano, Maputo, Moçambique.

Posters

- 1- **Lobo E**, Lobo L, de Sousa B, do Rosário V, Fernandes N, Nogueira F. Eficácia Terapêutica do AL e do ASAQ no tratamento da malária não complicada em Maputo, Moçambique. Jornada Científica do IHMT, 2011 (Resultados preliminares).
- 2- **Lobo E**, Lobo L, de Sousa B, do Rosário V, Fernandes N, Nogueira F. Eficácia Terapêutica do AL e do ASAQ no tratamento da malária não complicada em Maputo, Moçambique. Jornada Científica do IHMT, 2012.
- 3- **Lobo E**, de Sousa B, Rosa S, Figueiredo P, Lobo L, Pateira S, Fernandes N, Nogueira F. Frequência de alelos *pfmdr1* associados à tolerância/resistência ao arteméter-lumefantrina em Maputo antes e após a implantação da terapia combinada à base de artemisininas. Jornada Científica do IHMT, 2014.

**A DEUS, por me iluminar todos os dias e me dar força para vencer as
inúmeras barreiras da vida.**

À minha família, aos meus amigos e a todos que me querem bem.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pelo **Instituto Português de Apoio ao Desenvolvimento (IPAD)** e pela **Fundação Calouste Gulbenkian**, Instituições às quais endereço o meu profundo agradecimento.

À orientadora Investigadora Doutora Maria de Fátima Carvalho Nogueira, pelos seus ensinamentos e valiosas contribuições desde a concepção do protocolo; pelo apoio bibliográfico e pela orientação na elaboração da tese.

À co-orientadora Professora Doutora Natércia Fernandes, por ter aceite integrar a comissão tutorial e pelas suas importantes contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Investigador Doutor Bruno de Sousa, os meus agradecimentos pelas suas sugestões na análise estatística deste trabalho.

Ao Professor Doutor Virgílio do Rosário, pelas contribuições dadas na parte inicial do trabalho e pela sua manifesta disponibilidade em apoiar no que fosse necessário.

Ao Professor Doutor Aires Fernandes, pelo seu incessante incentivo para a procura do saber e pela sua pronta disponibilidade demonstrada na discussão de vários aspetos relacionados com este trabalho, em particular na área clínica.

À Professora Doutora Alexandra Rodrigues e a toda a sua família pela amizade que sempre demonstraram e pela sempre pronta disponibilidade em apoiar incondicionalmente.

Aos colegas do IHMT com quem compartilhei muitos momentos, pela amizade, simpatia e companheirismo, em especial à Lis Lobo, Zoraima Neto, Patricia Machado, Cristina Mendes, Ana Afonso, Fernanda Murtinheira, Tiago Vaz, Gonçalo, Mariana e Joana.

À Paula Figueiredo e à Soraia Rosa pelo seu valioso apoio no processamento das amostras.

Um agradecimento muito especial à Rita Neres pelo seu inestimável contributo e sempre pronta disponibilidade em apoiar sobretudo na revisão da parte estatística.

A toda a equipa do CMDT/IHM, pela colaboração e apoio técnico prestado.

À Dona Teresa Santos um profundo agradecimento por me ter acolhido sempre com muito carinho e amizade e a toda a sua família, pela simplicidade e amizade que sempre demonstraram.

Aos colegas da Faculdade de Medicina da UEM com os quais pude contar e que prestaram o seu valioso apoio durante a realização deste trabalho em especial a Dra Cátia, Dr Jahith, Dr Orvalho, Dr Leonel, dra Assa e à Julieta.

À Direção e a todo o pessoal do Instituto do Coração em Maputo com quem trabalho e convivo no meu dia-a-dia.

Aos colegas do Centro de Investigação da Manhiça (CISM) e do Instituto Nacional de Saúde em Moçambique, pelo apoio na revisão da lâminas e pela colaboração na discussão de alguns aspetos relevantes, em especial ao Dr Eusébio Macete, Dr Hélder Bulo, Dr Acácio Sabonete, Dr Abú Saifodine e Dra Sónia Enosse.

Ao Diretor do Instituto Nacional de Estatística, ao Dr Celso Zunguze e ao Dr Xadrique pelo seu apoio e cedência de dados estatísticos relativos à malária em Moçambique.

Às direções e equipas clínicas das unidades sanitárias onde foram recolhidas as amostras, pela sua colaboração na recolha de dados clínicos dos pacientes incluídos no estudo.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para este trabalho de pesquisa e que apesar de não terem sido mencionadas, o seu contributo não foi de modo algum menos precioso.

A todos os pacientes que participaram no estudo.

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos por serem parte importante da minha vida.

Resumo

Com o objetivo de reduzir a emergência e propagação de parasitas resistentes aos antimaláricos, a OMS recomenda o uso de terapia combinada à base de artemisinina (ACT) como tratamento de primeira linha para a malária não complicada por *P. falciparum*. A resistência aos ACTs foi recentemente relatada no Sudeste Asiático. Historicamente, a região oriental da África sub-Sahariana tem sido um dos principais focos de disseminação da resistência aos antimaláricos. Em Moçambique, um país da África do Leste, a malária é um grande desafio para a saúde pública, responsável por 56% dos internamentos pediátricos e 26% das mortes intrahospitalares. O tratamento com artesunato e sulfadoxina+pyrimethamina foi implementado em 2004. Esta combinação foi substituída por artesunato+amodiaquina (ASAQ) ou arteméter+lumefantrina (AL) em 2009. Em Moçambique, a resposta terapêutica aos ACTs é pouco estudada, existindo poucos dados sistematizados relativos aos aspetos clínicos e gravidade da doença nos pacientes hospitalizados. Os polimorfismos no gene *pfmdr1* têm sido associados a alterações na susceptibilidade aos antimaláricos, incluindo os ACTs. Em 2014, foi proposto um marcador molecular correlacionando mutações no gene *pfK13* ao fenótipo de susceptibilidade aos ACTs. Os nossos objetivos foram: contribuir para delinear o perfil da resposta terapêutica da malária *falciparum* não complicada (MnC) em pacientes tratados com ACTs em Maputo; contribuir para melhor compreensão do quadro clínico e evolução da malária grave (MG); descrever a frequência de marcadores moleculares de resistência aos antimaláricos usados em Maputo. Foram incluídos 412 pacientes com MnC (2010-2012); 284 foram tratados com AL (106 no Centro de Saúde¹ de Maio e 168 no Centro de Saúde de Boane); os restantes 138 foram tratados com ASAQ em Boane. Dois pacientes (tratados com ASAQ) regressaram no D₇ com sintomas e parasitemia. Os restantes tiveram resposta adequada até ao D₁₄. Para estudo clínico e evolução da malária grave, foram selecionados pacientes na enfermaria pediátrica do Hospital Central de Maputo, de Fevereiro a Março de 2012. Dos 129 incluídos, 30 apresentaram malária cerebral (MC) com *scores* de Glasgow entre 4-9. Cinco destes resultaram em óbito nas primeiras 24h após admissão. Os pacientes portadores do genótipo *RNAse3* GG apresentaram *score* de Glasgow inferior à admissão, embora sem diferença significativa. Para analisar a tendência temporal da frequência de marcadores moleculares de resistência aos antimaláricos em Maputo, foi incluído um grupo de amostras de ADN de um estudo anterior realizado entre 2003 e 2005. Em relação aos SNPs *pfmdr1* 86Y, Y184, 1246Y: a frequência dos alelos N86 e D1246 aumentou significativamente de 2003-2005 para 2010-2012; o aumento da frequência do 184F não foi significativo; exceto para NFD e NYD, a frequência de haplótipos triplos diminuiu em 2010-2012. Das 99 amostras analisadas somente 3 possuíam duas cópias *pfmdr1*. Em 100 amostras, não foram identificadas mutações *pfK13* relacionadas com a resistência aos ACTs no Sudeste Asiático. Em 2 amostras coletadas após introdução dos ACTs foi identificado um novo polimorfismo no *pfK13* (ausente em 2003-2005). Este SNP (V494I) é adjacente à mutação Y493H no *pfK13*, associada à resistência.

Palavras-chave: Malária em Moçambique, *Plasmodium falciparum*, resposta terapêutica, marcadores moleculares de resistência, *pfk13*.

Abstract

With the aim of reducing the emergence and spread of antimalarial drug resistant parasites WHO recommends the use of artemisinin-based combination therapy (ACT) as first-line treatment for *P. falciparum* uncomplicated malaria. ACT drug resistance has recently been reported in the Southeast Asia. Historically, East Africa has been a major focus of drug resistance spread in sub-Saharan Africa. In Mozambique, an Eastern African country, malaria is a major public-health challenge responsible for 56% of the paediatric cases and about 26% of the hospital deaths. Here, artesunate in combination with sulphadoxine+pyrimethamine was implemented in 2004. This combination was replaced by artesunate+amodiaquine (ASAQ) or artemether+lumefantrine (AL) in 2009. In Mozambique, the treatment response to ACTs is poorly studied and documented and few systematic data on clinical aspects related to the severity of the disease in the hospitalized patients are available. SNPs in *pfmdr1* gene have been associated with changes in parasite susceptibility to various antimalarials, including ACTs. In 2014, molecular marker correlating ACT susceptibility phenotype with *pfK13* gene mutations was proposed. Our aims were: to contribute to outline of the profile of the response to treatment of uncomplicated *falciparum* malaria (UnM) patients with ACTs in Maputo; to contribute to a better understanding of the clinical profile and evolution of severe malaria patients (SM); and to describe the prevalence of molecular markers of drug resistance to ACT in Maputo. A total of 412 patients with UnM (from 2010 to 2012) from Maputo area were included: 284 treated with AL (106 from Centro de Saúde 1° de Maio and 168 Centro de Saúde de Boane); the remaining 138 patients were treated with ASAQ and came from Boane. Two of the patients (treated with ASAQ) returned on D₇ with symptoms and parasitemia, the remaining responded adequately up to D₁₄. For the clinical profile and evolution of severe malaria, patients were selected on February and March 2012 on the Paediatric ward of Maputo Hospital Central. From the 129 included, 30 presented cerebral malaria (CM); 5 resulted in fatalities during the 1st 24h of admission, with CM and Glasgow score 4-9. Although, patients carrying the *RNAse3* genotype GG presented lower Glasgow score on admittance, the association did not reach significance. In order to analyse the temporal trend in the antimalarial drug resistance molecular markers prevalence in Maputo, a group of DNA samples from a previous study conducted also in Maputo between 2003 and 2005 was included. Regarding *pfmdr1* SNPs 86Y, Y184, 1246Y: prevalence of the alleles N86 and D1246 increased significantly from 2003-2005 to 2010-2012; although increased prevalence of 184F did not reach significance; except for NFD and NYD, all triple haplotypes decreased in prevalence in 2010-2012. Only 3/99 samples carried 2 copies of *pfmdr1*. Mutations in *pfK13* correlating with ACT resistance in Southeast Asia were not identified in the 100 samples. A new polymorphism in *pfk13* was identified in 2 of the samples collected after the introduction of ACTs (absent in 2003-2005). The newly identified SNP, V494I lays adjacent to the known *pfK13* resistance-associated mutation Y493H.

Key words: malaria in Mozambique, *Plasmodium falciparum*, therapeutic response, molecular markers of resistance, *pfk13*.

Índice de Figuras

Figura	Título	Página
1	Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i> .	5
2	Distribuição geográfica da malária no mundo.	7
3	Mapa da Província de Maputo ilustrando os centros de saúde nos quais foi realizado o estudo da malária não complicada e o número total de pacientes incluídos.	65
4	Distribuição dos pacientes com malária não complicada por grupo etário em ambos centros de saúde.	67
5	Frequência das principais manifestações dos pacientes com malária não complicada no dia da admissão (D ₀), de acordo com o grupo etário.	70
6	Evolução dos valores de hemoglobina e plaquetas nas três avaliações efetuadas aos pacientes com MnC seguidos em Boane e 1º de Maio.	72
7	Evolução dos valores de hemoglobina e plaquetas nas três avaliações efetuadas aos pacientes com MnC seguidos em Boane.	74
8	Principais causas da procura de cuidados de saúde nos pacientes com malária grave admitidos ao estudo	78
9	Evolução da parasitémia dos pacientes com malária grave durante o período de internamento	81
10	Evolução do estado de consciência dos pacientes com malária grave determinado pela escala de Glasgow (<i>Glasgow score</i>).	83
11	Associação do polimorfismo 371G>C com o nível de consciência (<i>score</i> Glasgow) nos pacientes com malária grave e malária cerebral.	87
12	Representação gráfica da frequência dos polimorfismos no gene <i>pfmdr1</i> em doentes com malária não complicada, analisada separadamente em amostras provenientes dos centros de saúde de Boane e 1º de Maio.	89
13	Representação gráfica da frequência dos polimorfismos no gene <i>pfmdr1</i> analisada separadamente em amostras provenientes de doentes com malária não complicada e malária grave.	90
14	Representação gráfica da frequência dos polimorfismos N86Y, Y184F e D1246Y no gene <i>pfmdr1</i> em Maputo.	92

Figura	Título	Página
15	Frequência dos polimorfismos nos codões 86, 184 e 1246 do gene <i>pfmdr1</i> antes e depois da introdução dos ACTs em Moçambique.	95
16	Variação temporal das frequências dos alelos associados com a tolerância aos ACTs nos codões 86, 184 e 1246 do gene <i>pfmdr1</i> .	96
17	Número de cópias do gene <i>pfmdr1</i> estimado por RT-PCR usando <i>SYBR Green I</i> .	98
18	Distribuição das amostras e polimorfismos estudados por localidade e em cada período.	101

Índice de Tabelas

Tabela	Título	Página
1	CrITÉRIOS clÍnicos e laboratoriais definidores de malÁria grave	14
2	AntimalÁricos disponÍveis para o tratamento e/ou profilaxia da malÁria, classificados de acordo com a fase do ciclo do parasita sobre a qual actuam.	20
3	Marcadores moleculares associados à quimio-resistência em <i>P. falciparum</i> .	31
4	Protocolos de tratamento da malÁria não complicada recomendados pela OMS.	35
5	Protocolos de tratamento da malÁria grave recomendados pela OMS.	36
6	Classificação da anemia de acordo com o nível plasmático de hemoglobina, tendo em conta a idade e o sexo.	47
7	Classificação da trombocitopénia de acordo com a contagem de plaquetas.	48
8	Esquema para tratamento da malÁria não complicada com AL.	48
9	Esquema para tratamento da malÁria não complicada com ASAQ.	49
10	Escala de Coma de Glasgow modificada para crianças.	50
11	Sequência dos <i>primers</i> e condições de amplificação do gene <i>RNase3</i> por PCR-RFLP.	50
12	Sequência dos <i>primers</i> e condições de amplificação dos genes <i>pfmsp2</i> e <i>pfglurp</i> por PCR.	55
13	Clones de referência utilizados como controlo no estudo	56
14	Sequência dos <i>primers</i> e condições de amplificação dos fragmentos 86, 184 e 1246 do gene <i>pfmdr1</i> por PCR.	57
15	Condições de restrição para os fragmentos 86, 184 e 1246 do gene <i>pfmdr1</i> .	58
16	Sequência de primers e condições para determinação do número de cópias do gene <i>pfmdr1</i> .	59
17	Condições para amplificação por PCR do gene <i>pfatp6</i> para pesquisa de mutações relacionadas com a resistência à artemisinina.	60
18	Pesquisa de polimorfismos no gene <i>pfK13</i> : primers, condições de PCR e fragmentos.	61
19	Distribuição dos pacientes por tratamento efetuado em cada um dos centros de saúde de Boane e 1º de Maio.	66

Tabela	Título	Página
20	Principais manifestações clínicas à admissão (D ₀) dos pacientes com malária não complicada (Boane e 1º de Maio).	68
21	Principais resultados laboratoriais à admissão (D ₀) nos pacientes com malária não complicada em Boane e 1º de Maio.	69
22	Pacientes com malária não complicada admitidos ao estudo em D ₀ <i>versus</i> os que terminaram o seguimento (D ₁₄).	71
23	Características dos pacientes com malária grave incluídas no estudo da malária grave.	75
24	Manifestações definidoras de MG apresentadas pelas crianças admitidas ao estudo em D ₀ .	77
25	Frequência dos achados laboratoriais em D ₀ e em D ₃ nos pacientes com malária grave.	79
26	Parâmetros hematológicos em diferentes níveis de parasitemia	82
27	Frequência dos achados laboratoriais à admissão nos pacientes com malária cerebral.	84
28	Características gerais dos pacientes incluídos no estudo do polimorfismo do gene <i>RNAse3</i> .	85
29	Frequência de haplótipos de <i>pfmdr1</i> nos codões N86Y, Y184F e D1246Y em Maputo após a introdução dos ACTs (2010-2012).	93
30	Frequência dos haplótipos de <i>pfmdr1</i> para os codões N86Y, Y184F e D1246Y em Maputo, antes e depois da introdução de ACTs.	97
31	Genótipos apresentados pelos dois pacientes de Boane que revelaram sintomas e parasitemia positiva em D7.	102

Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

A	Alanina
ACTs	<i>Artemisinin-based combination therapy</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AL	Arteméter + Lumefantrina (doses combinadas)
ANOVA	Análise de variância
AQ	Amodiaquina
ASAQ	Artesunato + Amodiaquina (doses combinadas)
CQ	Cloroquina
CMDT	Centro de Malária e outras Doenças Tropicais
CSP	<i>Circumsporozoite Protein</i>
D	Aspartato
D₀	Dia zero
D₇	Dia de controlo (7º dia)
D₁₄	Dia de controlo (14º dia)
DHFR	Dihidrofolato reductase
DHPS	Dihidropteroato sintetase
dp	Desvio padrão
dl	Decilitro
dNTPs	Desoxirribonucleótidos Trifosfato
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
Fansidar	Sulfadoxina em associação com Pirimetamina
fl	Fentolitros
G	Glicina
GLURP	<i>Glutamate Rich Protein</i>
h	Hora
IHMT	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
HRP-2	<i>Histidin Rich Protein 2</i>
I	Isoleucina
ICAM	<i>Intercelular adhesion molecule</i>
INS	Instituto Nacional de Saúde
MQ	Mefloquina
MSP-2	<i>Merozoite Surface Protein</i>

OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PCR-RT	Real-Time <i>Polimerase Chain Reaction</i>
<i>pfATP6</i>	Proteína <i>Plasmodium falciparum</i> ATP6
<i>pfATP6</i>	Gene <i>Plasmodium falciparum</i> ATP6
<i>pfert</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> Chloroquine Resistance Transporter
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule -1</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. malarie</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
PFCRT	Proteína <i>Plasmodium falciparum</i> Chloroquine Resistance Tansporter
<i>pfdhfr</i>	Gene <i>Plasmodium falciparum</i> Dihidrofolato Reductase
<i>pfdhps</i>	Gene <i>Plasmodium falciparum</i> Dihidropteroato Sintetase
<i>pfglurp</i>	Gene <i>Plasmodium falciparum</i> glutamin rich protein
<i>pfmdr1</i>	Gene <i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistance 1
<i>pfmdr2</i>	Gene <i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistance 2
<i>pfmrp1</i>	Gene <i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistance associated protein1
<i>pfmdr</i>	Gene <i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistance
<i>pfMDR</i>	Proteína <i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistance
<i>pfMRP2</i>	Proteína <i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistance associated 2
<i>pfubp-1</i>	Gene <i>Plasmodium falciparum</i> ubiquitin -specific protease
Pgh1	<i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistance 1 protein1
Pgh1	<i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistance 2 protein 2
pLDH	<i>Parasite Lactate Desidrogenase</i>
PNCM	Programa Nacional de Controlo da Malária
QN	Quinino
RDT	<i>Rapid Diagnose Test</i>
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
SERCA	Sarco-endoplasmic reticulum Ca ₂ -ATP
SNPs	<i>Single Nucleotid Polimorfism</i>
SP	Sulfadoxina-pirimetamina

TBE	Tampão constituído por Tris, ácido bórico e EDTA
TRAP	<i>Trombospondin Related Adesive Protein</i>
UNL	Universidade Nova de Lisboa
V	Valina
WHO	<i>World Health Organization</i>
Y	Tirosina

Índice geral

Publicações e Comunicações Científicas	I
Agradecimentos	IV
Resumo	VII
Abstract	VIII
Índice de Figuras	IX
Índice de Tabelas	XII
Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos	XIV
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Breve historial	2
1.2. Agente etiológico	3
1.2.1. Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	3
1.2.2. Genética do <i>Plasmodium</i>	6
1.3. Epidemiologia	7
1.3.1. Aspetos gerais e distribuição geográfica da malária	7
1.3.2. Malária em Moçambique	8
1.4. Diagnóstico da malária	9
1.5. Aspetos clínicos da malária	11
1.5.1. Malária não Complicada	12
1.5.2. Malária grave ou complicada	13
1.5.2.1. Malária cerebral	15
1.5.2.2. Sistema respiratório	15
1.5.2.3. Sistema renal	16
1.5.2.4. Acidose metabólica	16
1.5.2.5. Sistema hepático	17
1.5.2.6. Anemia	17
1.5.2.7. Hipoglicémia	18
1.5.2.8. Hipotensão e choque	18
1.6. Terapia da malária	19
1.6.1. Principais grupos de antimaláricos disponíveis para tratamento da malária	19
1.6.2. Resistência aos Antimaláricos	19
1.6.2.1. Mecanismos de ação e de resistência associados aos antimaláricos.	20
1.6.2.1.1. Antimaláricos do grupo das quinoleínas	21
1.6.2.1.1.1. Cloroquina	21
1.6.2.1.1.2. Amodiaquina	22

1.6.2.1.1.3. Quinino	23
1.6.2.1.2. Arilaminoalcoois ou quinolinometanóis	24
1.6.2.1.2.1. Lumefantrina	24
1.6.2.1.3. Artemisinina e derivados	24
1.6.2.2. Fatores relacionados com o aparecimento de resistência aos antimaláricos	27
1.6.2.2.1. Características do vector e fatores ambientais	27
1.6.2.2.2. Fatores relacionados com o hospedeiro humano	27
1.6.2.2.3. Fatores relacionados com os fármacos antimaláricos	28
1.6.2.2.4. Fatores relacionados com o parasita	29
1.6.2.3. Monitorização da resistência aos antimaláricos	29
1.6.2.3.1. Métodos <i>in vivo</i>	30
1.6.2.3.2. Métodos <i>in vitro</i>	30
1.6.2.3.3. Marcadores moleculares de resistência	30
1.6.3. Combinações terapêuticas baseadas nos derivados da artemisinina	32
1.6.4. Conceito de falência terapêutica e resistência aplicado à resposta aos ACTs	33
1.6.5. Tratamento da malária não complicada	34
1.6.6. Tratamento da malária grave	36
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivo geral	41
2.2. Objetivos específicos	42
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Estudo da malária não complicada	45
3.1.1. Locais de estudo	45
3.1.2. Pacientes incluídos no estudo	46
3.1.3. História e exame clínico	46
3.1.4. Recolha e processamento das amostras de sangue	46
3.1.5. Parâmetros hematológicos	47
3.1.6. Tratamento efetuado	48
3.1.7. Acompanhamento dos pacientes	49
3.2. Estudo da malária grave	49
3.2.1. Local do estudo	49
3.2.2. Pacientes incluídos no estudo	50
3.2.3. Classificação dos pacientes com MG de acordo com o estado de consciência	50
3.2.4. Tratamento antimalárico efetuado	51

3.2.5. Identificação de polimorfismos nos genes <i>RNase3</i>	52
3.2.6. Electroforese dos produtos amplificados	52
3.3. Estudo de polimorfismos genéticos de <i>P. falciparum</i> associados à resposta aos ACTs em Maputo.	53
3.3.1. Material biológico	53
3.3.2. Detecção e identificação parasitária por <i>PCR (Polimerase Chain Reaction)</i>	53
3.3.2.1. Extração do ADN genómico	53
3.3.2.2. Eletroforese dos produtos amplificados	54
3.3.2.3. Genotipagem do <i>P. falciparum</i> por PCR	54
3.3.3. Determinação do número de cópias do gene <i>pfmdr1</i> por RT-PCR	58
3.3.4. Pesquisa de polimorfismos no gene <i>pfatp6</i> por sequenciação de produto de PCR	59
3.3.5. Pesquisa de polimorfismos no gene <i>pfK13</i> por sequenciação de produto de PCR	61
3.3.5.1. Sequenciação do ADN para a pesquisa de polimorfismos no gene <i>pfK13</i>	62
3.4. Análise estatística dos dados	62
4. RESULTADOS	
4.1. Estudo da malária não complicada	65
4.1.1. Pacientes incluídos no estudo	65
4.1.2. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo	67
4.1.3. Evolução clínica dos pacientes com malária não complicada incluídos no estudo	70
4.2. Estudo da malária grave	75
4.2.1. Características dos pacientes incluídos no estudo	75
4.2.2. Frequência das manifestações definidoras de nos pacientes em cada um dos grupos etários.	76
4.2.3. Principais causas da procura de cuidados de saúde dos pacientes com malária grave.	77
4.2.4. Estudo dos achados laboratoriais nos pacientes com malária grave durante o internamento.	78
4.2.4.1. Frequência dos achados hematológicos e bioquímicos em D ₀ e em D ₃ nos pacientes com malária grave	78
4.2.4.2. Evolução do grau de parasitémia nos pacientes com malária grave durante o internamento	80
4.2.4.3. Avaliação dos parâmetros hematológicos em diferentes graus de parasitémia	81
4.2.5. Evolução do estado de consciência dos pacientes com malária grave	82

4.2.6. Estudo dos pacientes com malária cerebral	83
4.2.7. Estudo do polimorfismo na posição 371 do gene <i>RNAse3</i> potencialmente associado à gravidade da doença.	85
4.3. Estudo de polimorfismos genéticos de <i>P. falciparum</i> associados à resposta aos ACTs em Maputo.	88
4.3.1. Frequência de polimorfismos no gene <i>pfmdr1</i> .	88
4.3.2. Estudo comparativo da frequência dos polimorfismos N86Y, Y184F e D1246Y no gene <i>pfmdr1</i> em Maputo antes e depois da introdução dos ACTs	94
4.3.3. Determinação do número de cópias do gene <i>pfmdr1</i>	98
4.3.4. Determinação da frequência dos polimorfismos no gene <i>pfatp6</i> nas amostras colhidas nos pacientes com malária não complicada em Maputo.	99
4.3.5. Determinação da frequência de polimorfismos no gene <i>pfK13</i>	100
4.3.6. Avaliação de polimorfismos genéticos de <i>P. falciparum</i> associados à resposta aos ACTs nos pacientes que não responderam à terapêutica em D ₇	102
5. DISCUSSÃO	
5.1. Estudo da malária não complicada	105
5.2. Estudo da malária grave	109
5.3. Estudo de polimorfismos genéticos de <i>P. falciparum</i> associados à resposta aos ACTs em Maputo.	114
5.3.1. Polimorfismos no gene <i>pfmdr1</i>	115
5.3.2. Amplificação do gene <i>pfmdr1</i>	118
5.3.3. Polimorfismos no gene <i>pfatp6</i>	119
5.3.4. Polimorfismos no gene <i>pfK13</i>	122
6. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
8. ANEXOS	
8.1. Parecer do Comité Nacional de Bioética para a Saúde.	166
8.2. Declaração de consentimento informado.	167
8.3. Diagnóstico de malária <i>P. falciparum</i> por Microscopia Ótica.	169
8.4. Diagnóstico de malária <i>P. falciparum</i> por PCR (<i>Polimerase Chain Reaction</i>).	170
8.5. Ficha de colheita de dados (malária não complicada)	172
8.6. Frequência das principais manifestações dos pacientes com malária não complicada no dia da admissão (D ₀), de acordo com o grupo etário	174
8.7. Marcadores de diversidade parasitária efetuados aos dois pacientes tratados para malária não complicada e com	

parasitémia positiva no D7	
8.8. Evolução dos valores médios de hemoglobina e plaquetas nas três avaliações efetuadas aos pacientes com MnC seguidos em Boane e 1º de Maio	175
8.9. Fotografia de gel exemplificativo da electroforese dos fragmentos obtidos por PCR-RFLP para a identificação do polimorfismo 371G>C do gene <i>RNAse3</i>	177
8.10. Frequência relativa dos polimorfismos no gene <i>pfmdr1</i> em doentes com malária não complicada, em amostras provenientes dos centros de saúde de Boane e 1º de Maio	178
8.11. Sequenciação do gene <i>pfatp6</i> nas amostras colhidas nos pacientes com malária não complicada em Maputo	180

1 – INTRODUÇÃO

Introdução

1.1- Breve Historial

A malária é provavelmente uma das doenças mais antigas que atingem o ser humano e durante séculos impediu o desenvolvimento de várias regiões do mundo^(1,2). Desde tempos imemoriáveis as febres provocadas pela malária foram atribuídas a causas sobrenaturais. A palavra *mal'aria* de origem italiana que etimologicamente significa "ar ruim" indica a crença geral de que vapores nocivos (miasmas) que emanavam dos pântanos eram os responsáveis pela doença⁽³⁾. Acredita-se que Hipócrates tenha sido o 1º malariologista, ao descrever 400 AC diferentes tipos de febre associadas a esplenomegália, diferenciando-as das febres contínuas provocadas por outras infeções. Este relacionou-as à época do ano e ao local onde os pacientes viviam mas manteve a crença de que estas eram causadas pela ingestão de águas estagnadas^(2,3). As pesquisas intensificaram-se a partir de 1880, quando Charles Laveran identificou o parasita da malária em uma amostra de sangue de um soldado na Argélia ao qual chamou de *Oscillaria malariae*⁽⁴⁾. Seis anos depois Camillo Golgi descreveu o ciclo esquizogónico do parasita, demonstrando que a febre intermitente da malária coincidia com a rotura dos eritrócitos e o lançamento dos parasitas na circulação⁽⁴⁾. Golgi descreveu três espécies de parasitas com diferentes ciclos, duas delas reconhecidas por Giovanni Grassi e Raimondo Filetti em 1890 como *P. vivax* e *P. malariae* a terceira por William Welch em 1897 como *P. falciparum*. Em 1897 os mosquitos foram identificados como vetores para a malária aviária por Ronald Ross e entre 1898 e 1999 para a malária humana, por um grupo de investigadores dirigidos por Grassi⁽³⁾. Em 1922, John Stephens descreveu a 4ª espécie de *Plasmodium* (*P. ovale*). A existência de formas pré-eritrocíticas das espécies *vivax* e *falciparum* foi confirmada por Short^(5,6,7). Mais tarde estas formas foram também demonstradas para as espécies *ovale*⁽⁸⁾ e *malariae*⁽⁹⁾. A 5ª espécie de *Plasmodium* (*P. Knowlesi*) foi descrita por Robert Knowlesi e Biraj Das Gupta em 1931 em macacos e documentada em humanos em 1965⁽¹⁰⁾. Em 1987 foi testada a 1ª vacina sintética *Spf66* contra o *P. falciparum* desenvolvida por Manuel E. Patarroyo⁽¹¹⁾ cuja eficácia veio a ser posta em causa⁽¹²⁾. Actualmente as pesquisas nesta área continuam, estando em fase de avaliação pela OMS as provas relativas à eficácia e segurança de uma nova vacina contra o *P. falciparum* designada RTS, S/AS01.

Introdução

Um dos principais problemas da malária tem sido a resistência do *Plasmodium* aos antimaláricos e até aos dias de hoje a sua terapia tem evoluído de forma a fazer face ao surgimento de parasitas resistentes.

Recentemente foram sequenciados os genomas do mosquito *Anopheles gambiae*, do clone 3D7 do *P. falciparum*⁽¹³⁾, do *P. vivax*⁽¹⁴⁾ e do *P. knowlesi*⁽¹⁵⁾, o que poderá ser útil para identificar alvos antigênicos para o desenvolvimento de vacinas, testes diagnósticos e novos fármacos antimaláricos.

1.2- Agente etiológico

A malária é causada por protozoários do género *Plasmodium*. Existem mais de 120 espécies de *Plasmodium* que infetam mamíferos, aves e répteis. Cinco destas espécies nomeadamente o *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* têm a capacidade de infectar o ser humano diferindo na sua morfologia e patogénese⁽¹⁶⁾.

1.2.1- Ciclo de vida do *Plasmodium*

O *Plasmodium* é um protozoário unicelular, haplóide durante a maior parte do seu ciclo de vida (Figura 1). O estado de diploidia verifica-se por um breve período do ciclo no hospedeiro invertebrado⁽¹⁷⁾. A transmissão do parasita ao hospedeiro vertebrado é uma etapa obrigatória do ciclo de vida do *Plasmodium* e inclui duas fases: fase esporogónica, caracterizada por multiplicação do parasita no hospedeiro definitivo (invertebrado do género *Anopheles*) e fase esquizogónica na qual este se multiplica no hospedeiro intermediário vertebrado (*Homo sapiens*)⁽¹⁸⁻²⁰⁾. Os parasitas são transmitidos ao mosquito fêmea (vector) no estadio de gametócitos, durante a picada ao hospedeiro intermediário infetado. Após a maturação dos gametócitos no estômago do mosquito, ocorre a sua fertilização que termina com a formação do zigoto. Este transforma-se em oocineto, forma

Introdução

móvel e invasiva que penetra o epitélio do estômago do mosquito onde se fixa. De seguida, inicia-se o desenvolvimento do oocisto que após divisão meiótica, seguida de múltiplas divisões mitóticas origina inúmeros esporozoítos. Quando maduro, o oocisto se rompe, libertando esporozoítos móveis para o hemocélio do mosquito. Estes deslocam-se para as glândulas salivares, acumulando-se nos ductos. Quando o mosquito infetado se alimenta no hospedeiro vertebrado, os esporozoítos inoculados durante a picada entram na corrente sanguínea. Alguns dirigem-se para o fígado, atravessando a membrana de vários hepatócitos, provavelmente buscando os mais suscetíveis à infeção⁽²¹⁾, local onde por um processo de esquizogonia hepática ou extra-eritrocitária se formam os esquizontes hepáticos. No caso do *P. vivax* e do *P. ovale*, este desenvolvimento não se processa de imediato, permanecendo os esporozoítos sob formas hepáticas latentes ou hipnozoítos. A maturação dos esquizontes hepáticos resulta em rutura e libertação de merozoítos para a corrente sanguínea. Estes invadem os eritrócitos, iniciando-se a esquizogonia intraeritrocitária. Durante esta fase os merozoítos sofrem diferenciação passando por três estadios de desenvolvimento (trofozoíto em anel, trofozoítomaduro e esquizonte). Até a fase de divisão nuclear, o parasita é designado trofozoíto. Quando o núcleo entra em divisão (esquizogonia) origina milhares de merozoítos que formam o esquizonte. Cada esquizonte, ao sofrer rotura liberta 16 a 32 merozoítos que invadem novos eritrócitos. Este ciclo ocorre em períodos de aproximadamente 48 a 72 horas dependendo da espécie infectante, sendo responsável pelos picos febris típicos da infeção malárica. Alguns dos merozoítos diferenciam-se em gametócitos que constituem as formas infectantes para o vector (Figura 1). A maturação dos gametócitos inicia-se no hospedeiro vertebrado e é completada no mosquito após refeição sanguínea, dando início a um novo ciclo esporogónico⁽¹⁸⁻²⁰⁾.

Introdução

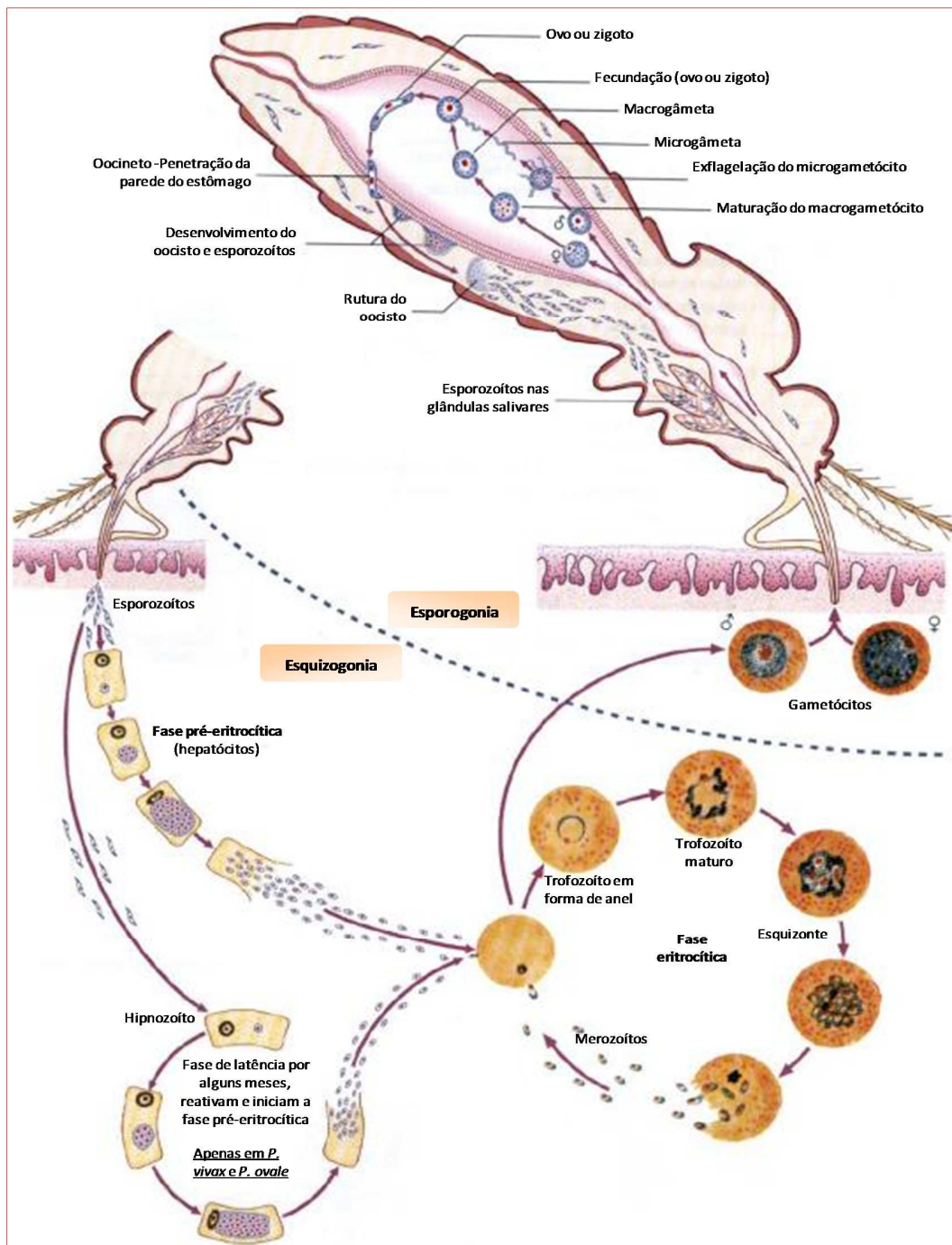


Figura 1 - Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum* (Adaptado de Chiodini et al, 2010)

Introdução

1.2.2 - Genética do *Plasmodium*

O material genético do *Plasmodium* encontra-se organizado em três genomas: 1) genoma mitocondrial (6kb)⁽²²⁻²⁵⁾, 2) genoma do apicoplasto, remanescente de um plastídio não fotossintético com 35 kb^(25, 26) e 3) genoma nuclear cuja sequenciação completa foi efetuada em 2002 no clone 3D7 do *P. falciparum*⁽²⁷⁾. No genoma nuclear foram identificados aproximadamente 5.300 genes distribuídos por 14 cromossomas. Uma característica que diferencia este genoma dos genomas de outros eucariontes é a abundância em genes variáveis (*var* genes) envolvidos na evasão imune⁽²⁸⁾. Estes genes codificam proteínas altamente polimórficas expressas à superfície dos eritrócitos parasitados. Uma destas proteínas, a *PfEMP1*^(29, 30), é responsável pela variação antigénica do *P. falciparum* e pelos fenómenos de adesão e sequestro que ocorrem na malária grave^(29, 31, 32). Com recurso a técnicas moleculares é possível descrever sequências polimórficas nos genes codificadores das proteínas de superfície dos merozoítos (*msp*)⁽³³⁾. Estes polimorfismos são utilizados como marcadores genéticos para caracterização das populações parasitárias. Por exemplo, a genotipagem de regiões polimórficas dos genes codificantes das proteínas de superfície dos merozoítos (*msp1* e *msp2*) e da proteína rica em glutamato (*glurp*) é habitualmente realizada para distinguir recrudescências (que podem indicar falência terapêutica) de novas infeções⁽³⁴⁾.

1.3 - Epidemiologia

1.3.1 - Aspectos gerais e distribuição geográfica da malária

No mundo a malária predomina nas regiões tropicais e subtropicais da América, algumas regiões da Ásia e em grande parte da África⁽³⁵⁾ (Figura 2). Para além da intensidade de transmissão, a sua epidemiologia e impacto sobre a população nas diferentes localizações geográficas são influenciados por vários fatores que incluem o acesso aos serviços eficazes de prevenção, diagnóstico e tratamento^(35, 36).

Introdução

Estima-se que entre 2000 e 2013, as taxas de incidência e de mortalidade por malária tenham reduzido respetivamente em 30% e 47% no mundo e em 34% e 54% no continente Africano (*WHO African Region*) pressupondo-se que 670 milhões de casos e 4,3 milhões de mortes tenham sido evitados⁽³⁵⁾. Estas reduções resultaram de melhorias no controlo do vetor, no diagnóstico e na disseminação de terapias combinadas à base de artemisininas (ACTs). Contudo, apesar dos progressos, grande parte da população mundial ainda vive em áreas endémicas e o número absoluto decasos e de mortes por malária, continua elevado. Estima-se por exemplo que em 2013 tenham sido registados 198 milhões de casos e 584 mil óbitos, dos quais respetivamente 82% e 90% ocorreram na África sub-Saariana. A maioria das mortes (78%) ocorreu em crianças menores de 5 anos⁽³⁵⁾.

As cinco espécies de *Plasmodium* que infetam o Homem exibem uma distribuição geográfica sobreposta sendo o *P. falciparum* e o *P. vivax* as mais disseminadas. Nas últimas décadas a distribuição global e a frequência destas espécies nas diferentes regiões do mundo não sofreu alterações significativas⁽³⁷⁾. O *P. falciparum* é a espécie mais prevalente e ocorre sobretudo no continente africano, sendo responsável por mais de 90% dos casos fatais de malária^(35, 37). O *P. vivax* é largamente distribuído nas Américas e Ásia, ocorrendo mais esporadicamente no continente africano. O *P. malariae* e o *P. ovale* ocorrem principalmente na África, e mais raramente em outras parte do mundo⁽¹⁶⁾.

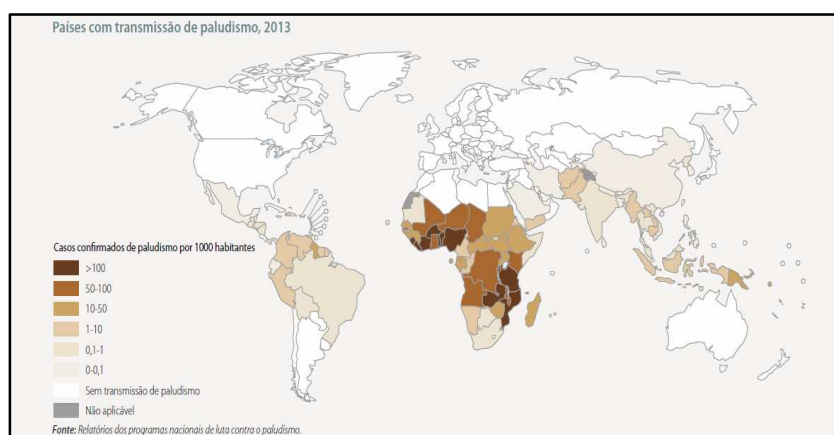


Figura 2 - Distribuição geográfica da malária no mundo (Fonte: WHO, 2014)

Introdução

O *P. knowlesi*, até há poucos anos conhecido como causador de infecção crónica em macacos foi recentemente identificado como agente da malária no ser humano⁽¹⁰⁾. Esta espécie foi reportada em países do Sudeste Asiático^(10, 38), como responsável por casos de malária com complicações fatais⁽³⁹⁾.

1.3.2 - Malária em Moçambique

Moçambique é um país situado na costa oriental da África austral. Possui um clima tropical húmido, com uma estação quente de Outubro a Março, caracterizada por chuvas e temperaturas médias entre 22 a 31°C e outra estação fresca e seca de Abril a Setembro com temperaturas entre 13 a 24°C. A sua população é essencialmente jovem (45,6%), estimada em cerca de 22 milhões de habitantes e a densidade populacional é de 25.68 habitantes/km²⁽⁴⁰⁾.

A malária é endémica em todo o país e a sua transmissão ocorre durante todo o ano com picos durante e após a estação chuvosa. Os principais vetores da malária pertencem aos grupos *Anopheles funestus* e *Anopheles gambiae*⁽⁴⁰⁾. Em relação às espécies infetantes, o *P. falciparum* é a mais prevalente, causando mais de 90% das infeções, o que representa um forte contributo para a frequência da anemia na população, com maior gravidade entre as crianças e mulheres grávidas⁽⁴¹⁾.

Moçambique está entre os 10 países do mundo com maiores taxas de mortalidade por malária por 1000 habitantes/ano⁽⁴²⁾. Embora haja sinais de redução do número de casos (5.168.684 em 2005 para 3.381.371 em 2010), a sua frequência mantém-se elevada, particularmente nas crianças com idade inferior a 5 anos⁽⁴⁰⁾. Dados indicam que esta é a principal causa dos problemas de saúde e de mortalidade no país, sendo responsável por cerca de 30% de todos os óbitos registados⁽⁴³⁾. A maioria dos estudos relacionados com a malária efetuados em Moçambique tem incluído crianças até aos 15 anos. Destas, cerca de dois terços pertencem ao grupo etário inferior a 5 anos tanto em estudos envolvendo pacientes com malária não complicada⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾ como em pacientes com malária grave⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾.

Introdução

Em relação aos adultos a informação relativa à malária é escassa estimando-se uma frequência de 14% nos indivíduos com idade igual ou superior a 15 anos⁽⁵⁰⁾.

A resposta terapêutica aos ACTs introduzidos há alguns anos para o tratamento da malária não complicada é ainda pouco estudada e existem poucos dados sistematizados, relativos aos aspetos clínicos e à gravidade da doença nos pacientes hospitalizados.

1.4 - Diagnóstico da malária

O diagnóstico correto e atempado da malária é importante para assegurar um tratamento apropriado de forma a reduzir os sintomas da doença, possibilitar a cura e reduzir o risco de complicações que podem ser fatais. Este tem como base os sintomas e sinais objetivos e deve ser confirmado pelos exames laboratoriais^(51, 52).

O perfil epidemiológico dos pacientes é importante, devendo ter em conta fatores como a área de procedência, a história de viagens recentes para áreas endémicas e a distribuição geográfica das espécies de *Plasmodium*.

Dada a natureza inespecífica das manifestações, a suspeita do diagnóstico é fundamental, não só nas regiões endémicas, como em outras regiões onde indivíduos semi-imunes podem ser portadores assintomáticos e desenvolver a doença em qualquer altura como se descreve adiante. Além da transmissão através da picada do mosquito, a malária pode ser transmitida de um ser humano a outro através de sangue transfundido, transplante de órgãos ou partilha de agulhas em usuários de drogas injetáveis⁽⁵³⁾. Nos recém-nascidos deve-se excluir a possibilidade de malária congénita⁽⁵⁴⁾.

O diagnóstico laboratorial envolve vários métodos, dos quais se destacam: 1) testes microscópicos 2) testes imunocromatográficos (imunotestes) e 3) testes moleculares.

A microscopia ótica é o método mais utilizado e consiste na identificação do parasita em uma amostra de sangue colhida por punção, e colocada numa lâmina que é de seguida

Introdução

corada por um dos vários métodos utilizados para tal incluindo o método de Giemsa, Wright ou Field⁽⁵⁵⁾.

Os imunotestes baseiam-se na detecção rápida de antígenos específicos do parasita tais como a proteína 2 rica em histidina (HRP-II) e a enzima lactato desidrogenase (pLDH), ou ainda mediante detecção de anticorpos mono ou policlonais.

Os métodos moleculares são usados para detecção do material genético do parasita^(56, 57). Como exemplo temos a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), descrita pela primeira vez em 1983 por Mullins⁽⁵⁸⁾ e atualmente usada sobretudo na área de pesquisa. Esta técnica consiste na amplificação exponencial e selectiva de um segmento específico do ADN, sob ação de uma enzima termoestável (*ADN polimerase*), mediante utilização de sequências oligonucleotídicas (*primers ou iniciadores*) desenhados em laboratório de acordo com o comportamento da reação que se pretende.

Os *primers* são pequenos fragmentos sintéticos de ADN de fita simples compostos por 12 a 25 pares de bases complementares às sequências alvo, específicas do ADN molde, situadas em regiões adjacentes (3' e 5') de cada uma das cadeias da dupla hélice a amplificar. O desenho dos *primers* deve ter em consideração alguns parâmetros de importância fundamental para garantir a sensibilidade e especificidade da reação de PCR como: 1) temperatura de dissociação do par *primer*/sequência alvo (temperatura de *melting* ou T_m); 2) conteúdo em Guanina/Citosina (G/C); e 3) complementaridade da sequência do *primer*.

A *ADN polimerase* diferencia as duas extremidades dos *primers* (3' e 5'), iniciando a reação sempre pela extremidade 3' do ADN. A amplificação é originada pela repetição sequencial de ciclos, cada um composto por 3 passos: 1º desnaturação do ADN alvo pelo calor (94-96°C); 2º ligação ou anelamento (*annealing*) dos *primers* (50-65°C); 3º extensão através da ligação dos nucleótidos livres ao ADN molde, pela enzima *ADN polimerase* (72°C).

Dada a elevada sensibilidade, a PCR permite detetar o ADN parasitário em concentrações extremamente baixas de até 1 parasita por μ l de sangue, de tal forma que apenas uma cópia

Introdução

é suficiente para produzir por amplificação milhões de cópias de ADN, cuja presença pode ser posteriormente confirmada por electroforese em gel. Com o objectivo de melhorar a especificidade e a eficiência da reacção, a técnica de PCR pode ser realizada com o envolvimento de dois pares de *primers* em duas reacções consecutivas de PCR, passando esta reacção a ser designada Nested-PCR. Deste modo, o segmento genómico é amplificado numa primeira reacção que ocorre de forma abrangente, na qual são copiadas até mesmo sequências fora deste. O produto desta reacção é de seguida utilizado como molde para amplificação da real sequência alvo.

1.5 - Aspetos clínicos da malária

O quadro clínico da malária tem início após um período de incubação que dependendo da espécie infetante, varia entre 6 a 40 dias, sendo mais curto nas infeções causadas pelo *P. falciparum*^(57, 59). A sua forma de apresentação e a evolução variam de acordo com fatores ligados ao parasita e ao hospedeiro, assim como com fatores sociais e geográficos.

A existência de imunidade efetiva, além de reduzir o nível de parasitémia e as manifestações clínicas, prolonga o período de incubação, de forma que indivíduos semi-imunes podem manter parasitémias assintomáticas e só apresentar sintomas meses ou anos após a infeção^(53, 57, 59-63).

As manifestações clínicas resultam da ruptura dos esquizontes eritrócitos e da libertação dos parasitas na circulação. Na sua maioria associam-se à ativação da cascata de citocinas e ao desencadeamento de uma resposta inflamatória que atinge diferentes graus⁽⁶⁴⁾. De acordo com o grau de comprometimento orgânico e da evolução clínica, a doença aguda pode-se apresentar com ou sem complicações^(59, 65) como a seguir se descreve.

Introdução

1.5.1 - Malária não Complicada

A malária não complicada caracteriza-se por sintomas e sinais inespecíficos que surgem no indivíduo infetado, e que se confundem com os de outras síndromes sobretudo de natureza viral.

Em geral, a principal manifestação é a febre que inicialmente é irregular mas após alguns dias tende a tornar-se periódica, dependendo da duração dos ciclos assexuais do parasita. Esta pode ser precedida de sintomas prodrómicos que incluem mau estar geral, cefaleia, dores articulares e musculares, dor abdominal, anorexia, náuseas e vômitos^(51, 55).

Algumas características clínicas específicas relacionam-se com a espécie de *Plasmodium* envolvida. No caso do *P. vivax* e do *P. ovale*, 5 a 7 dias após a infeção desenvolvem-se ciclos assexuais com paroxismos febris normalmente vespertinos compostos por 3 estadios clássicos que ocorrem a cada 3 dias (febre terçã). À microscopia observam-se parasitas em todas as fases de desenvolvimento desde trofozoítos em anel até esquizontes maduros. Raramente a densidade parasitária excede os 2%. Os gametócitos podem ser observados após a 1ª semana. Entre os paroxismos febris os pacientes são geralmente assintomáticos e mesmo se não tratados podem melhorar espontaneamente. Após um período latente de semanas meses ou anos depois da infeção primária podem ocorrer recaídas devido à reinvasão dos eritrócitos por merozoítos produzidos a partir de hipnozoítos hepáticos dormentes dando origem ao reaparecimento de sintomas⁽⁵⁹⁾.

Nas infeções por *P. falciparum* os sintomas prodrómicos surgem após um período de incubação que varia entre 6 a 14 dias. A febre inicialmente é diária e irregular podendo tornar-se periódica ao fim da primeira semana, passando a ocorrer a cada 3 dias (febre terçã)⁽⁵⁹⁾. Entre outras manifestações gerais os pacientes podem apresentar hipotensão ortostática, taquicardia, icterícia e hepato-esplenomegália⁽⁶⁶⁾. A anemia e a trombocitopénia são comuns mas nem sempre se associam à gravidade da doença^(67, 68). Outros achados laboratoriais incluem alterações leucocitárias, aumento transitório da ureia e creatinina séricas, aumento das transaminases, desidrogenase láctica e bilirrubinas. O exame microscópico revela tipicamente trofozoítos em anel. A presença de trofozoítos maduros e

Introdução

esquizontes é rara podendo indicar mau prognóstico. Os gametócitos podem aparecer a partir da segunda semana e persistir por várias semanas após a cura⁽⁵⁹⁾. Com diagnóstico precoce e tratamento adequado, o prognóstico da malária não complicada é favorável, em geral com melhoria dos sintomas nos primeiros 3 dias⁽⁶⁹⁾. Em alguns casos o quadro pode progredir rapidamente para malária grave particularmente em indivíduos não imunes. Quando não corretamente tratada e apesar da melhoria dos sintomas podem persistir no sangue formas eritrócíticas do parasita originando recrudescências⁽⁵⁹⁾.

A infecção por *P. malariae* origina manifestações mais insidiosas que surgem normalmente após períodos de incubação de 18 a 40 dias. Os paroxismos febris são tipicamente vespertinos com intervalos de 72 horas (febre quartã). A anemia é ligeira e a parasitemia raramente superior a 1%. À microscopia são encontradas todas as formas de desenvolvimento assexual do parasita. Se não tratado, o ataque agudo é auto-limitado mas pode durar meses antes da remissão espontânea⁽⁷⁰⁾. Embora o *P. malariae* não forme hipnozoítos como ocorre com as espécies *ovale* e *vivax* este pode permanecer assintomático no estadio eritrócito por décadas originando recrudescências^(53, 57, 71). A infecção por esta espécie está associada ao desenvolvimento de síndrome nefrótica que pode progredir para insuficiência renal dentro de poucos anos^(59,72).

O *P. knowlesi* causa infecções com características clínicas bastante semelhantes às originadas pelas espécies *falciparum* e *vivax* sendo de difícil distinção. É comum a hiperparasitemia e o desenvolvimento de complicações⁽³⁹⁾. A identificação desta espécie ao exame microscópico é difícil devido à sua semelhança com o *P. malariae*⁽⁷³⁾ podendo a sua distinção ser efetuada de forma mais precisa mediante técnicas de PCR (*Polimerase Chain Reaction*)⁽¹⁰⁾.

1.5.2 - Malária grave ou complicada

A malária grave ou complicada é uma doença que se apresenta de diversas formas clínicas e é atualmente reconhecida como um distúrbio multisistémico com características

Introdução

semelhantes às da Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS)^(64,74,75). A sua evolução resulta da combinação de fatores específicos do parasita, relacionados com a adesão e sequestro na microcirculação e libertação de moléculas bioactivas, associados à resposta inflamatória do hospedeiro devido à ação das citocinas⁽⁶⁴⁾. Está descrito que cerca de 1% dos casos de malária se tornam graves e potencialmente fatais⁽⁷⁵⁾. Nestes casos a maioria das mortes ocorre nas primeiras 24 horas^(76, 77). Em alguns casos devido ao atraso na libertação dos mediadores inflamatórios, as manifestações da malária podem-se tornar graves mesmo após a depuração da parasitémia e da resposta terapêutica inicial⁽⁷⁸⁾.

De acordo com a definição da OMS, para além das manifestações que ocorrem na malária não complicada, a malária grave deve apresentar pelo menos um dos criterios indicados na Tabela 1⁽⁷⁹⁾. Contudo, na prática clínica qualquer caso de malária deve ser considerado como potencialmente grave, sendo o tratamento precoce de vital importância para uma evolução favorável^(80, 81). Embora o *P. falciparum* seja responsável pelo maior número de casos graves e mortes por malária^(74,79, 82), nos últimos anos têm sido registadas infeções graves e mortes causadas pelo *P. vivax*⁽⁸³⁻⁸⁵⁾ e *P. knowlesi*^(10, 39, 86-88).

Tabela 1 - Critérios clínicos e laboratoriais definidores de malária grave (WHO, 2010).

Critérios clínicos	Critérios laboratoriais
<ul style="list-style-type: none">• Estado de consciência alterado ou coma não despertável• Prostração/fraqueza generalizada/impossibilidade de ficar de pé ou sentar-se sem ajuda• Incapacidade de se alimentar• Convulsões generalizadas múltiplas (mais de 2 episódios em 24 horas)• Respiração acidótica (respiração profunda e com dificuldade)• Choque circulatório (pressão sistólica <70 mm Hg em adultos e <50 mm Hg em crianças)• Icterícia e evidência de disfunção de outros órgãos vitais• Hemoglobinúria• Sangramento anormal espontâneo• Edema pulmonar (radiológico)	<ul style="list-style-type: none">• Hipoglicémia (glucose sanguínea <2.2 mmol/l ou 40 mg/dl)• Acidose metabólica (Bicarbonato plasmático <15% mmol/l)• Anemia normocítica (hemoglobina <5 g/dl, hematócrito <15%)• Hemoglobinúria• Hiperparasitémia (>2%/100000/μl em áreas de baixa intensidade de transmissão ou >5% ou 250000/μl em áreas de intensidade de transmissão estável)• Hiperlactatémia (lactato>5mmol/l)• Disfunção renal (creatinina>265 μmol/l)

Introdução

1.5.2.1 - Malária cerebral

A malária cerebral é considerada a forma mais grave de malária, responsável por um número elevado de mortes no mundo, sobretudo em crianças^(89, 76, 90). Segundo a OMS a MC é definida como malária grave por *P. falciparum*, com manifestações cerebrais, que geralmente incluem um estado de coma (nível de consciência <11 na escala de coma de Glasgow ou <3 na escala de coma de Blantyre)⁽⁷⁹⁾. Nos casos em que o coma sobrevém após convulsão, a sua persistência por mais de 30 minutos após o término é classificada como MC. Devem ser excluídas outras causas de coma como a hipoglicémia, meningite ou outras encefalopatias^(79, 89).

A patogénese da MC é complexa e sem explicação conclusiva. As causas prováveis incluem hipoxia, produção local de lactato, e acidose metabólica resultantes de obstrução criada pela citoaderência e sequestro de células sanguíneas na microcirculação^(91, 76, 91-93) e vasoespasmio associado à redução local do óxido nítrico⁽⁹⁴⁾.

O acometimento cerebral manifesta-se por quadros que vão desde sonolência, confusão, desorientação, delírio e agitação até ao coma profundo. Em alguns casos o coma surge bruscamente sem sinais premonitórios^(89, 90). As convulsões generalizadas ou focais são comuns, particularmente nas crianças. Podem ocorrer alterações motoras, dos nervos cranianos e sinais de irritação meníngea. Na maioria dos casos, a recuperação da MC é rápida com reversão completa do quadro clínico⁽⁹⁴⁾. Alguns pacientes desenvolvem sequelas neurológicas transitórias ou permanentes incluindo *deficits* cognitivos, problemas comportamentais e de linguagem, alterações motoras e epilepsia⁽⁸⁹⁾. Mesmo com tratamento adequado a taxa de mortalidade da malária cerebral pode atingir aproximadamente 20%^(89, 90).

1.5.2.2 - Sistema respiratório

O compromisso respiratório é uma complicação importante na malária e mais frequente nos adultos constituindo um indicador de mau prognóstico⁽⁹⁵⁾. Este pode iniciar de forma súbita

Introdução

em qualquer fase da doença, inclusive após depuração da parasitemia^(96, 97). O edema pulmonar é não-cardiogénico e embora a sua patogénese não esteja esclarecida supõe-se que resulte de uma resposta inflamatória, associada a lesão endotelial e aumento da permeabilidade capilar^(78, 97, 98). Os casos mais graves manifestam-se pela síndrome de desconforto respiratório agudo (*acute respiratory distress syndrome* ou ARDS), semelhante à que ocorre em outros distúrbios pulmonares podendo em caso de hipoxemia grave, necessitar de ventilação mecânica^(59, 64, 97).

1.5.2.3 - Sistema renal

Embora evidências bioquímicas de disfunção do sistema renal sejam frequentemente observadas na malária não complicada, a insuficiência renal aguda (IRA) é uma complicação que surge nos casos mais graves. Esta é mais comum nos adultos podendo estar presente à admissão ou ocorrer na fase de recuperação^(59, 72, 90, 107). Vários mecanismos patogénicos têm sido propostos, entre eles a necrose tubular aguda secundária à isquemia renal⁽⁷⁸⁾ e a lesão glomérulo-tubular imunomediada^(105, 108). A hemólise maciça é rara e ocorre quase exclusivamente após administração de fármacos com efeito antioxidante como a primaquina e mais raramente o quinino⁽¹⁰⁹⁾. Nos casos de IRA, as manifestações resultam de redução da taxa de filtração glomerular e do aumento do nível sérico dos produtos nitrogenados. Nos casos mais graves pode ocorrer acidose metabólica e alterações hidroelectrolíticas necessitando de diálise⁽⁵⁹⁾.

1.5.2.4 - Acidose metabólica

A acidose metabólica, tal como a insuficiência respiratória, constitui um importante determinante do prognóstico na malária^(77, 99) podendo estar subjacente à síndrome de angústia respiratória^(100, 101). Para além da redução do fluxo na microcirculação devido à adesão dos eritrócitos infectados ao endotélio capilar e/ou ao aumento da rigidez das células não infectadas⁽¹⁰²⁾ o aumento do ácido láctico pode resultar do inadequado

Introdução

suprimento de oxigênio aos tecidos devido à anemia⁽¹⁰³⁾ ou ainda da redução da sua depuração hepática e renal^(104, 105). A contribuição direta do *P. falciparum* para o aumento da concentração de lactato através da glicólise anaeróbia no parasita parece ser pequena⁽¹⁰⁶⁾.

1.5.2.5 - Sistema hepático

O comprometimento hepático na malária é mais frequente nos adultos e a sua principal manifestação é a icterícia⁽⁵⁹⁾. A principal causa é a hemólise intravascular que origina hiperbilirrubinemia predominantemente não conjugada. Nos casos mais graves pode ocorrer aumento significativo da bilirrubina conjugada, da fosfatase alcalina e das transaminases, indicando disfunção hepatocelular e/ou colestase intra-hepática. É frequente o aumento do fígado particularmente em crianças e adultos não imunes. Pode ocorrer aumento do tempo de protrombina e do tempo parcial de tromboplastina normalmente sem repercussão clínica⁽⁵⁹⁾.

1.5.2.6 - Anemia

Na malária grave a anemia é definida como a presença de hemoglobina <5 g/dL, ou hematócrito <15%⁽⁷⁹⁾ e constitui uma das principais manifestações sobretudo em crianças⁽⁷¹⁾. As suas principais causas são o aumento da destruição e/ou redução da produção de eritrócitos^(110, 111). O grau de anemia pode ser influenciado por outros fatores como a coexistência de infecções e a presença de deficiências enzimáticas e/ou nutricionais^(112, 59). Em geral, as consequências da anemia dependem sobretudo da rapidez de instalação e das alterações hemodinâmicas que origina, devendo o seu manuseamento adequar-se a cada situação clínica e epidemiológica⁽⁷⁸⁾.

Introdução

1.5.2.7 - Hipoglicémia

A hipoglicémia (glucose no sangue <2.2 mmol/l ou <40 mg/dl) é frequente na malária sobretudo em crianças. Quando presente à admissão, associa-se normalmente a doença grave. As causas incluem falha na gluconeogénese hepática e aumento do consumo de glicose pelos tecidos⁽¹¹³⁾. Nos pacientes tratados com quinino pode ocorrer hipoglicémia hiperinsulinémia, visto ser este um poderoso estimulante da secreção de insulina pelo pâncreas⁽¹⁰¹⁾. As manifestações da hipoglicémia podem-se confundir com as da malária, pelo que a sua monitorização é importante, de forma a evitar o coma, as sequelas neurológicas ou a morte⁽⁷⁸⁾.

1.4.2.8 - Hipotensão e choque

O choque ou colapso circulatório, definido pela OMS como pressão arterial sistólica <70 mm Hg em adultos e <50 mm Hg em crianças é uma complicação que pode ocorrer na malária mesmo após depuração da parasitémia^(95, 105, 114). A hipotensão pode desenvolver-se de modo súbito podendo estar associada a edema pulmonar, acidose metabólica, sepsis e/ou hemorragia massiva secundária à ruptura esplénica ou do trato gastrointestinal⁽⁷⁸⁾. Na maioria dos pacientes o choque é hiperdinâmico, e ocorre devido à redução da resistência vascular periférica associada à resposta inflamatória. A função cardíaca é preservada, apesar do intenso sequestro de eritrócitos parasitados na microcirculação miocárdica^(64, 115, 116). A hipotensão postural pode ser secundária à disfunção do sistema nervoso autónomo. Condições que favorecem a bacteriémia como o uso de cateteres ou o coma prolongado são invocadas como predisponentes⁽⁵⁹⁾.

Introdução

1.6 - Terapia da malária

1.6.1 - Principais grupos de antimaláricos disponíveis para tratamento da malária

Durante séculos, extratos de plantas foram utilizados para tratamento das febres causadas pela malária destacando-se a *Chinchona* e a *Artemísia annua*. A casca da *Chinchona* (*Chinchona spp.*) foi introduzida na Europa no século VII pelos Jesuítas⁽¹¹⁷⁾. Seu principal alcalóide conhecido por quinino (QN) foi isolado pela primeira vez em 1820 pelos químicos Pierre Joseph Pelletier e Jean Bienaime Caventou⁽¹¹⁸⁾. A partir da sua estrutura foram desenvolvidos vários análogos (quinolinas) como a cloroquina (CQ) a mefloquina e a amodiaquina (AQ)⁽¹¹⁷⁾.

Este grupo de antimaláricos teve um papel preponderante no tratamento e profilaxia da malária, até à descoberta da artemisinina e derivados na década de 70 do século XX por investigadores chineses (119). Actualmente existem diversos antimaláricos disponíveis para o tratamento das infeções pelo *Plasmodium spp.*

Em função da fase do ciclo de vida do parasita sobre a qual exercem a sua ação, estes são classificados como: a) esquizonticidas sanguíneos (atuam na fase intraeritrocitária impedindo o desenvolvimento dos parasitas à fase de esquizonte); b) esquizonticidas teciduais (previnem o desenvolvimento de esquizontes hepáticos); c) hipnozoiticidas (atuam sobre os hipnozoítos hepáticos nas espécies *P. vivax* e *P. ovale*) e d) gametocidas (destroem as formas sexuais intra-eritrocíticas)^(56, 120, 121) (Tabela 2).

1.6.2 - Resistência aos Antimaláricos

1.6.2.1 - Mecanismos de ação e de resistência associados aos antimaláricos.

A eficácia dos agentes usados para o tratamento das doenças infecciosas deriva da sua capacidade em atuar especificamente sobre os processos metabólicos que ocorrem no agente infeccioso sem interferência significativa com o hospedeiro. No caso da malária por

Introdução

P. falciparum, a fase sintomática da infeção é intra-eritrocitária e os processos metabólicos que ocorrem nesta fase constituem o principal alvo terapêutico dos antimaláricos. A seguir descrevem-se alguns dos antimaláricos utilizados para o tratamento da malária, com especial destaque para os derivados da artemisinina e para os fármacos a estes associados nas combinações terapêuticas (ACT) que constituem o principal objeto deste estudo.

Tabela 2 - Antimaláricos disponíveis para o tratamento e/ou profilaxia da malária, classificados de acordo com a fase do ciclo do parasita sobre a qual actuam.

Grupo	Exemplos	Classificação
Antimaláricos naturais e semi-sintéticos	Quinino Artemisinina e derivados	Esquizonticidas sanguíneos
Antimaláricos sintéticos	Amodiaquina, Cloroquina, Piperaquina Mefloquina, Lumefantrina, Halofantrina Sulfadoxina Pirimetamina, Proguanil Atovaquona	
	Primaquina, Tafenoquina	Esquizonticidas sanguíneos Esquizonticidas hepáticos Hipnozoiticidas Gametócitocidas
Antibióticos	Tetraciclina, Doxiciclina, Clindamicina, Azitromicina	Esquizonticidas sanguíneos

1.6.2.1.1 - Antimaláricos do grupo das quinoleínas

As quinoleínas constituem um grupo de antimaláricos com ação selectiva sobre os estádios intraeritrocitários do parasita (trofozoítos maduros e esquizontes) durante os quais se produz a hemozoína⁽¹²²⁻¹²⁴⁾. Deste grupo fazem parte a cloroquina (CQ), a amodiaquina (AQ) e a mefloquina (MQ), usadas no tratamento da malária não complicada (as duas últimas como parte das combinações ACT) e o quinino, usado no tratamento da malária grave.

Introdução

1.6.2.1.1.1 - Cloroquina

A cloroquina é uma 4-aminoquinolina amplamente utilizada desde os anos 40 para tratamento da malária. Estudos efectuados nas diferentes fases do ciclo de vida intra-eritrocitário do *P. falciparum* apontam o vacúolo digestivo do parasita, como o seu local de ação⁽¹²⁵⁾. A CQ actua por acumulação no vacúolo digestivo, onde atinge concentrações 50 a 100 vezes superiores às do plasma⁽¹²⁶⁻¹²⁹⁾, interferindo com a destoxificação do grupo heme e a polimerização da hemozoína⁽¹²⁸⁾.

A principal causa de resistência do *P. falciparum* à CQ (tal como ocorre com os outros fármacos que interferem com o metabolismo da hemoglobina) parece ser a redução da sua concentração no vacúolo digestivo⁽¹²⁸⁾, originada pelo aumento do efluxo^(130, 131), de forma que esta não atinge níveis suficientemente altos, capazes de inibir a polimerização do heme nos parasitas resistentes^(125, 132).

Mutações em dois genes: *pfcr1* (*P. falciparum chloroquine resistance transporter*) e *pfmdr 1* (*P. falciparum multidrug-resistance 1*), codificantes de duas proteínas presentes na membrana do vacúolo digestivo do parasita^(133, 134) e envolvidas na regulação do transporte dos antimaláricos têm sido implicadas na resistência do *P. falciparum* à CQ.

O gene *pfcr1* localiza-se no cromossoma 7 e codifica a proteína transmembranar PfCRT⁽¹³⁵⁾. Este gene foi identificado como alvo primário de resistência à CQ após cruzamento genético entre um clone sensível (HB3) e um resistente (Dd2)⁽¹³³⁾. Dentre as várias mutações pontuais detectadas no gene *pfcr1* em parasitas de campo, a substituição da lisina (K) pela treonina (T) na posição 76 é tida como o principal marcador de resistência à cloroquina^(135, 136) e tem sido encontrada de forma consistente em parasitas resistentes de diversas regiões na África, Sudeste Asiático e América do Sul⁽¹³⁷⁻¹⁴⁹⁾. Existem evidências de que mutações no gene *pfcr1* determinam não só resistência à CQ mas também influenciam a suscetibilidade a outros antimaláricos. Estudos relatam a associação entre mutações neste gene e a resposta ao QN⁽¹⁵⁰⁻¹⁵²⁾ assim como à amodiaquina, halofantrina e, possivelmente à mefloquina⁽¹⁵³⁻¹⁵⁵⁾.

Introdução

O gene *pfmdr1* localiza-se no cromossoma 5 e codifica uma glicoproteína transmembrana no vacúolo digestivo do parasita, conhecida por Pgh-1 ou PfMDR⁽¹⁵⁶⁾. Esta proteína pertence à família dos transportadores ABC, e possui a capacidade de expelir através da membrana diferentes agentes quimioterápicos⁽¹⁵⁷⁾, incluindo os antimaláricos⁽¹³⁴⁾. O mecanismo que envolve o gene *pfmdr1* baseia-se na observação de que o verapamil pode reverter a resistência à CQ ao impedir o seu efluxo através da membrana vacuolar^(131, 157, 158). Com base na aparente similaridade fenotípica entre a resistência a múltiplas drogas em células cancerígenas (que ocorre frequentemente devido à elevada expressão da Pgh1) e a resistência à CQ em *P. falciparum*, foi sugerido que a Pgh-1 pudesse ser a principal molécula candidata a conferir resistência à CQ^(159, 160). Contudo evidências mais recentes sugerem que a contribuição dos polimorfismos *pfmdr1* para a resistência à CQ é dependente das características genéticas da estirpe parasitária^(134, 155).

Os polimorfismos identificados no gene *pfmdr1* foram agrupados em dois genótipos: tipo *K1*, resultante da substituição do aminoácido asparagina (N) pela tirosina (T) na posição 86 (N86Y); e tipo *7G8*, que inclui os alelos Y184F, S1034C, N1042D e D1246Y^(160, 162). Embora a base genética da resistência à CQ não esteja completamente esclarecida, a mutação N86T (tipo *K1*) tem sido associada à resistência *in vitro* em isolados provenientes de várias regiões da Ásia e África⁽¹⁶⁰⁻¹⁶⁵⁾. Contrariamente, estirpes resistentes à cloroquina provenientes da América do Sul foram caracterizadas pela presença do triplo mutante 1034, 1042 e 1246 do gene *pfmdr1* (tipo *7G8*)⁽¹⁶⁰⁾.

Para além da CQ, os polimorfismos *pfmdr1* podem alterar a sensibilidade a outros antimaláricos, como o quinino, amodiaquina, halofantrina, mefloquina e artemisinina⁽¹⁶⁶⁻¹⁶⁸⁾.

1.6.2.1.1.2 - Amodiaquina

A amodiaquina (AQ) é uma 4-aminoquinoleína, com estrutura química e mecanismo de ação semelhantes à CQ⁽¹⁶⁹⁾. Estudos indicam que tal como para a CQ a resistência à

Introdução

amodiaquina se relaciona com a presença de mutações nos genes *pfert* e *pfmdr*⁽¹⁷⁰⁻¹⁷³⁾. Durante muitos anos a AQ foi utilizada em monoterapia como alternativa à CQ permanecendo eficaz em algumas zonas endêmicas^(155, 174). O seu uso clínico em monoterapia foi restrito pela OMS na década de 1990 devido à hepatotoxicidade e agranulocitose, efeitos que também contraindicam a sua utilização como profilático⁽¹⁷⁵⁾. O conhecimento dos marcadores moleculares de resistência à AQ é de extrema relevância, uma vez que actualmente esta é indicada para tratamento da malária não complicada em combinação com o artesunato⁽¹⁷⁶⁾.

1.6.2.1.1.3 - Quinino

O quinino (QN) é um composto alcalóide (quinolinometano/arilaminoálcool), com ação esquizotocida. Tal como as restantes quinoleínas interfere com o processo de digestão da hemoglobina por parte do parasita^(177, 178). Este é indicado sobretudo para tratamento dos casos de malária grave ou de resistência a múltiplos fármacos e constitui terapia de escolha na gravidez, sobretudo no primeiro trimestre⁽¹⁷⁹⁾. A sua absorção é rápida por via oral e parenteral atingindo o pico de concentração plasmática dentro de 1-3 horas. Possui baixo índice terapêutico e fraca tolerabilidade derivada dos efeitos adversos que ocorrem mesmo em doses terapêuticas⁽¹⁷⁹⁾.

Apesar do longo tempo de utilização, o QN continua eficaz contra todas as espécies de *Plasmodium*⁽¹⁷⁹⁾. A redução da suscetibilidade do *P. falciparum* ao QN *in vivo* associa-se à presença de mutações no gene *pfmdr1*^(134, 180-182) ou à alteração do seu número de cópias e níveis de expressão⁽¹⁸³⁻¹⁸⁵⁾.

Outros genes como o *pfcr*^(150, 151), *pfmrp* (codificante da *Multidrug Resistance-associated Protein*-PfMRP)⁽¹⁸⁶⁾ e *pfhe-1* ou transportador Na⁺/H⁺⁽¹⁸⁷⁾ estão potencialmente envolvidos na resposta ao QN *in vitro*. A redução da sensibilidade do *P. falciparum* ao QN foi relatada pela primeira vez em 1910⁽¹⁸⁸⁾ e actualmente tem sido documentada na Ásia⁽¹⁸⁹⁾ e na América do Sul⁽¹⁹⁰⁾. Em África esta parece relativamente incomum e existem

Introdução

resultados conflituosos, uns defendendo a existência de diferentes graus de resistência⁽¹⁹¹⁻¹⁹³⁾ e outros a sua ausência^(194, 195).

1.6.2.1.2 - Arilaminoalcoóis ou quinolinometanóis

1.6.2.1.2.1 - Lumefantrina

A Lumefantrina (antes denominada benflumetol) pertence à classe dos arilaminoalcoóis ou quinolinometanóis e foi sintetizada na China na década de 1970. O seu mecanismo de ação é similar aos antimaláricos do mesmo grupo como o quinino, mefloquina e halofantrina, possivelmente através da inibição da polimerização do grupo heme⁽¹⁹⁷⁾. Trata-se de uma substância lipofílica cuja absorção aumenta após as refeições atingindo concentrações plasmáticas máximas 6-8 horas após administração oral. A sua meia-vida de eliminação é de 3 a 6 dias; possui baixa toxicidade e é bem tolerada^(196, 197). Actualmente a lumefantrina é utilizada no tratamento da malária não complicada por *P. falciparum* em combinação com o arteméter.

A presença do alelo *pfmdr1* N86 de forma isolada ou com os alelos 184F (N86/184F) e D1246 (N86/D1246) tem sido associada à tolerância *in vivo* à lumefantrina^(198, 199). A presença deste polimorfismo já antes havia sido associada à redução da sensibilidade à lumefantrina *in vitro* em clones de *Plasmodium falciparum*⁽¹⁶⁶⁾.

1.6.2.1.3 - Artemisinina e derivados

A *Artemisia annua* L, também conhecida por qinghao é uma planta cujos extratos foram utilizados há mais de 2000 anos na medicina tradicional chinesa para tratamento de febres possivelmente causadas pela malária. A substância com actividade antiparasitária, “qinghaosu”, foi isolada em 1972 e é actualmente conhecida por artemisinina⁽²⁰⁰⁾. A partir da artemisinina foram desenvolvidos derivados semi-sintéticos, hidrossolúveis (artesanato e

Introdução

ácido artelinico) e lipossolúveis (arteméter e arteéter)^(201, 202). Estes actuam após conversão em dihidroartemisinina (DHA), um princípio activo com potente ação antimalárica e meia vida inferior a 1 hora⁽²⁰³⁾. O grau de conversão dos derivados artemisinínicos para DHA é variável. O artesunato por exemplo, possui meia vida extremamente curta (<10 minutos) e é rapidamente hidrolizado para DHA enquanto o arteméter e o arteéter são convertidos mais lentamente⁽²⁰⁴⁾. Além destes, outros derivados semi-sintéticos de 2ª geração e análogos peroxídicos sintéticos têm sido testados, esperando-se que as suas diferenças estruturais possam no futuro ultrapassar eventuais problemas de resistência^(201,205). Os derivados da artemisinina actuam contra todas as espécies de *Plasmodium* que afectam o homem. Embora sejam particularmente esquizontocidas, possuem também actividade contra os gametócitos^(206, 2007), contribuindo para redução da transmissão⁽²⁰⁸⁾. As suas propriedades incluem rápido início de ação, propiciando inibição precoce do metabolismo parasitário, meia-vida curta e excelente perfil de segurança^(203,207). Não possuem efeitos sobre as fases hepáticas do parasita⁽²⁰⁹⁾.

O mecanismo de ação da artemisinina e derivados permanece por esclarecer e a redução da susceptibilidade do parasita às artemisininas permanece em debate⁽²¹⁰⁾. Vários modelos propostos e não mutuamente exclusivos atribuem a ação antiparasitária da artemisinina à existência de uma ponte peróxidona sua estrutura⁽²¹¹⁻²¹⁵⁾. De forma resumida sugere-se que a artemisinina, uma vez ativada através da clivagem desta ponte possa agir sobre o parasita por meio de um dos mecanismos a seguir descritos: 1) interferência na via de destoxificação do grupo heme 2) indução da alquilação de proteínas⁽²¹⁶⁾; 3) inibição da bomba SERCA-*PfATP6*⁽²¹⁷⁾ ou 4) interferência na função mitocondrial do parasita^(213, 218, 219).

Entre os genes possivelmente envolvidos na resposta aos ACTs destaca-se o *pfmdr1*^(198, 199, 218). Outros genes cuja associação à resistência aos derivados da ART tem sido alvo de várias pesquisas incluem o *pfatp6*⁽²²⁰⁾, o *pfmdr6*⁽²²¹⁾ o *pfmrp*⁽¹⁸⁶⁾ e o gene *pfubp-1*, codificante da enzima de desubiquitinação UBP-1⁽²²²⁾. O papel das alterações provocadas pelos polimorfismos nestes genes é ainda controverso.

Introdução

Em relação ao gene *pfmdr1*, das mutações pontuais associadas à redução da susceptibilidade aos ACTs destacam-se os alelos *pfmdr1* N86Y, Y184F, S1034C, D1042N e D1246Y que podem ocorrer de forma isolada ou em diferentes combinações (haplótipos)^(134, 166, 168).

Adicionalmente, alguns autores associaram o aumento do número de cópias do gene *pfmdr1* à redução da sensibilidade às artemisininas sobretudo no sudeste Asiático ^(185, 223). Em países africanos a amplificação deste gene parece ser rara como demonstram resultados de estudos no Uganda⁽²²⁴⁾, Kenya⁽²²⁵⁾, Tanzania e Zanzibar⁽¹⁹⁹⁾.

Alguns estudos revelam grande diversidade do gene *pfatp6* sugerindo que a ocorrência natural de mutações possa constituir o início da seleção de parasitas resistentes às artemisininas^(226, 227).

A relação entre a redução da sensibilidade do *P. falciparum* ao arteméter, evidenciada por aumento significativo da IC₅₀ foi associada à presença da mutação S769N neste gene, em amostras de pacientes com malária não complicada provenientes da Guiana Francesa⁽²²⁰⁾. Além desta, outras três mutações foram associadas à redução da sensibilidade aos derivados da artemisinina nomeadamente a L263E^(228, 229), E431K e A623S^(220, 230).

Através da sequenciação do gene *pfatp6* em isolados de *P. falciparum* provenientes de outros locais da Ásia, África e América^(144, 223, 230, 231), foram identificadas várias mutações adicionais, confirmando a sua diversidade. Entretanto, a associação entre os polimorfismos neste gene e a resistência aos ACTs não foi definitivamente comprovada.

Mais recentemente, a sequenciação do genoma de uma linha de parasitas resistentes provenientes de África e de isolados do Camboja, local onde o fenótipo resistente à artemisinina foi inicialmente reportado, um grupo de investigadores demonstrou a associação entre a presença de mutações no gene *pfK13* e a resistência *in vitro* e *in vivo* à artemisinina⁽²³²⁾. Polimorfismos neste gene são actualmente considerados importantes determinantes de resistência à artemisinina tendo este sido proposto como um marcador molecular útil para vigilância em larga escala.

Introdução

1.6.2.2 - Fatores relacionados com o aparecimento de resistência aos antimaláricos

A resistência parasitária é um fenómeno complexo, definido como “capacidade de uma população de parasitas em sobreviver e/ou multiplicar em presença de um fármaco, administrado em doses iguais ou acima das habitualmente recomendadas dentro da tolerância do indivíduo”. Resistência não significa necessariamente o mesmo que “falência terapêutica”. Enquanto a resistência pode levar à falência terapêutica, nem todas as falências são causadas por resistência, uma vez que estas podem resultar de outros fatores como dosagem incorreta, problemas de adesão ao tratamento, má qualidade dos medicamentos, interações com outros fármacos, absorção inadequada ou erros de diagnóstico. Para que se considere resistência, é necessário que o fármaco em causa atinja concentrações adequadas nos locais de ação^(56,79). Alguns fatores associados ao desenvolvimento de resistência incluem as características do vector, fatores ambientais, e ainda os fatores relacionados com o hospedeiro e com o parasita.

1.6.2.2.1 - Características do vetor e fatores ambientais

A proliferação de parasitas resistentes é influenciada pelas características do vector e do ambiente, pelo que estas devem ser analisadas em conjunto. Por exemplo, existem na natureza mais 400 espécies de mosquitos do género anopheles mas os parasitas resistentes reproduzem-se com maior facilidade em certas espécies de mosquitos em relação a outras⁽²³³⁾. Adicionalmente, a sobrevivência do vector e a sua interação com o hospedeiro humano dependem sobretudo da existência de condições ambientais propícias⁽²³⁴⁾.

1.6.2.2.2 - Fatores relacionados com o hospedeiro humano

A presença da malária no mundo exerceu uma forte pressão selectiva sobre o genoma humano e em algumas regiões desenvolveram-se variantes moleculares descritas como protetoras^(235, 236, 237). Muitos dos genes sujeitos a estas alterações desempenham funções importantes na estrutura e metabolismo do eritrócito. Destas, as melhor estudadas e amplamente aceites incluem os alelos da anemia falciforme (hemoglobina S)⁽²³⁸⁾ das α e β talassémias^(339, 340, 341) e da deficiência de glicose-6-fosfato (G6PD)^(242, 243).

Introdução

Alguns autores relatam aumento significativo da atividade dos eosinófilos em pacientes com malária cerebral⁽²⁴⁹⁾. A proteína catiónica do eosinófilo (ECP), codificada pelo gene *RNAse3* possui atividade citotóxica capaz de matar protozoários e outros microorganismos *in vitro*⁽²⁴⁹⁻²⁵⁵⁾. Esta proteína tem sido associada à patogenia da malária⁽²⁵¹⁻²⁵⁶⁾. Sugere-se que o polimorfismo de nucleótido único G371C no gene *RNAse3*, que resulta na substituição da arginina (R) por treonina (T), suprima a citotoxicidade da ECP podendo aumentar a suscetibilidade para a malária grave.

A imunidade é um fator interveniente na malária exercendo um papel importante na eliminação da parasitémia residual após o tratamento. A redução da eficiência do sistema imune, em presença de concentrações residuais de antimaláricos predispõe à multiplicação de parasitas residuais e ao desenvolvimento de mutantes resistentes⁽²⁵⁷⁾.

Um outro fator que predispõe ao desenvolvimento de resistência é a alteração da metabolização dos fármacos resultante de mudanças na actividade enzimática do hospedeiro. Para além da existência de polimorfismos genéticos no hospedeiro, esta alteração pode ocorrer devido à presença de outros processos metabólicos, infecciosos, ou em situações de deficiência de micronutrientes⁽²⁵⁸⁾.

1.6.2.2.3 - Fatores relacionados com os fármacos antimaláricos

Entre os fatores relacionados com a utilização dos fármacos, e que influenciam o desenvolvimento de parasitas resistentes destacam-se: a dosagem, a qualidade, a capacidade de resistência cruzada e as características farmacocinéticas.

A dosagem é um dos fatores mais importantes para selecção de parasitas resistentes. A exposição indiscriminada aos antimaláricos em concentrações subterapêuticas resulta na adaptação do parasita, permitindo que populações resistentes possam proliferar⁽²⁵⁹⁾.

A qualidade dos fármacos relaciona-se principalmente com a concentração efetiva do seu princípio activo. Fatores como o inadequado manuseamento e armazenamento, pelo facto de afectarem a sua concentração efectiva podem favorecer o desenvolvimento de mutantes resistentes^(260, 261).

Introdução

A resistência cruzada é também um fenómeno importante. Alguns fármacos antimaláricos possuem uma relação química estreita entre si de modo que o desenvolvimento de resistência a uns pode originar resistência cruzada em relação a outros.

As características farmacocinéticas dos antimaláricos também interferem com o desenvolvimento de resistências. Por exemplo, fármacos com características lipofílicas (lumefantrina, halofantrina, atovaquona e mefloquina) ou com meia vida longa (sulfadoxina, pirimetamina) muitas vezes atingem concentrações plasmáticas subterapêuticas, que são suficientes para eliminar parasitas susceptíveis mas não os resistentes facilitando a sua multiplicação. Este fenómeno é agravado em áreas de transmissão intensa onde novas infeções são contraídas continuamente na presença de antimaláricos em concentrações residuais^(258, 262).

1.6.2.2.4 - Fatores relacionados com o parasita

Com a propagação da malária no mundo, o uso contínuo dos antimaláricos produziu sobre o *P. falciparum* uma pressão selectiva que levou à selecção e propagação de parasitas resistentes⁽²⁶³⁾. Os mecanismos genéticos pelos quais os parasitas se tornam resistentes relacionam-se com o desenvolvimento de polimorfismos em determinados genes codificadores de proteínas enzimáticas que funcionam como alvos dos fármacos, ou como bombas de transporte transmembranares. Estes eventos ocorrem de forma espontânea, independentemente do efeito específico dos fármacos^(183, 264) causando respetivamente redução da sensibilidade do parasita aos mesmos (ex: antifolatos e atovaquona) ou alteração da sua concentração nos locais onde actuam (ex: cloroquina e mefloquina)⁽²⁶⁴⁾. Os polimorfismos genéticos, também designados marcadores moleculares de resistência, conferem aos parasitas resistentes uma vantagem adaptativa em relação aos sensíveis⁽²⁶⁵⁾.

1.6.2.3 - Monitorização da resistência aos antimaláricos

Vários métodos podem ser utilizados para a monitorização da resistência, entre os quais se destacam os métodos *in vivo*, *in vitro* e os métodos moleculares a seguir descritos^(56,183).

Introdução

1.6.2.3.1 - Métodos *in vivo*

Os métodos *in vivo* avaliam a resposta do *Plasmodium* aos fármacos antimaláricos no paciente infectado e embora não sejam suficientes para confirmar a resistência devido a limitações humanas, parasitárias e ambientais, fornecem uma informação básica para se determinar a sua eficácia. Os procedimentos de controlo disponíveis incluem os testes de eficácia terapêutica (ensaios *in vivo*). Estes ensaios envolvem a avaliação repetida dos resultados clínicos e parasitológicos do tratamento por um período fixo durante o qual é feito um acompanhamento dos pacientes com o fim de se detetar eventual reaparecimento de sinais e sintomas de malária clínica e/ou de parasitas no sangue, o que indicaria uma redução da sensibilidade do parasita ao fármaco administrado⁽⁷⁹⁾.

1.6.2.3.2 - Métodos *in vitro*

Os testes *in vitro* são normalmente realizados em amostras de sangue do hospedeiro submetidas a um ambiente experimental controlado. Os parasitas são expostos a concentrações conhecidas de antimaláricos e a monitorização da susceptibilidade é feita através de medição da resposta à inibição da maturação dos esquizontes.

Estes métodos reflectem exclusivamente a resistência ao fármaco, dado que não interferem com os fatores do hospedeiro. A fim de determinar os níveis individuais de susceptibilidade do fármaco a testar, os resultados dos testes *in vitro* devem ser interpretados de forma integrada com os testes farmacológicos e com os resultados clínicos *in vivo* (normalmente influenciados pela imunidade). Estes testes são sobretudo indicados para monitorização epidemiológica e podem ser utilizados para validação dos marcadores moleculares de resistência⁽⁵⁶⁾.

1.6.2.3.3 - Marcadores moleculares de resistência

A resistência aos antimaláricos constitui o maior obstáculo para o controlo e eventual eliminação da malária. A vigilância de rotina dos marcadores moleculares de resistência é uma forma eficiente de avaliar a sua eficácia. Teóricamente esta é a forma mais precoce de

Introdução

deteção de resistências emergentes e em complemento com os resultados de outros testes (*in vivo* e *in vitro*) constitui um excelente suporte para a tomada de decisões sobre políticas terapêuticas eficazes para o controlo da doença^(56, 91, 183, 266, 267).

A Tabela 3 mostra os marcadores moleculares associados à quimioresistência em *P. falciparum*. Salientando a sua importância, estudos relacionados com a presença da mutação K76T no gene *pfprt* permitiram no passado documentar a disseminação da resistência à CQ tendo-se destacado a necessidade de medicamentos alternativos^(135,136, 143).

Pesquisas relacionadas com os polimorfismos nos genes *dhfr* e *dhps* foram igualmente vitais para a monitorização da resistência à SP e em conjunto com as investigações clínicas, confirmaram a diminuição rápida e disseminada da sua eficácia^(268, 269).

O gene *pfmdr1* tem sido relacionado com a resistência a vários antimaláricos, como a cloroquina, amodiaquina, mefloquina, artemisinina e derivados, podendo modular a sua susceptibilidade por dois mecanismos: amplificação génica^(185, 223, 270) e/ou mutações na sua sequência^(119, 167, 271).

Tabela 3 - Marcadores moleculares associados à quimio-resistência em *P. falciparum*.

Fármaco	Marcador molecular	Associação com resistência
Cloroquina	<i>pfprt</i> T76	<i>in vivo</i> bastante elevada
	<i>pfmdr1</i> Y86, F184, C1034, D1042, Y1246	<i>in vivo</i> ocasional
Sulfadoxina-pirimetamina	Pirimetamina: <i>pfdhfr</i> 108, 51, 59, 164 Sulfadoxina: <i>pfdhps</i> 436, 437, 540, 581, 623	<i>in vivo</i> bastante elevada
Quinino	<i>pfprt</i> T76	redução da susceptibilidade <i>in vitro</i>
	<i>pfmdr1</i> Y86, F184, C1034, D1042, Y1246	
Artemisininas	<i>pfprt</i> C350R	redução da susceptibilidade <i>in vitro</i>
	<i>pfmdr1</i> N86, 184F, C1034, D1042, D1246	redução da susceptibilidade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>
	<i>pfatp6</i> S769N	redução da susceptibilidade <i>in vivo</i>
	<i>pfK13</i> C580Y, R539T and Y493H	redução da susceptibilidade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>

Introdução

No caso específico da artemisinina e derivados, de acordo com estudos genéticos, em populações naturais de *P. falciparum* parece existir uma forte associação entre a amplificação do gene *pfmdr1*, a sua forma selvagem e a resistência aos derivados da artemisinina⁽¹⁶⁷⁾.

Ensaio *in vitro* revelaram uma correlação entre a diminuição da susceptibilidade aos derivados da artemisinina e o aumento do número de cópias do gene *pfmdr1*⁽¹⁶⁸⁾.

Num outro ensaio foi demonstrado que a redução do número de cópias (de 2 para 1) do gene *pfmdr1* na estirpe resistente FCB resultou num aumento da susceptibilidade à artemisinina *in vitro*, reforçando a ideia que o número de cópias deste gene possui capacidade de modular este fenótipo⁽¹⁸⁵⁾.

Adicionalmente, mutações pontuais no gene *pfmdr1* têm sido associadas a mudanças de susceptibilidade dos parasitas da malária à artemisinina^(166, 167, 168). A presença de mutações no gene *pfatp6* foi associada à redução da susceptibilidade aos derivados da artemisinina, tendo este sido proposto como seu principal alvo⁽²²⁰⁾.

Em relação ao gene *pfK13*, após a recente publicação relativa à presença de mutações em associação com a resistência *in vitro* e *in vivo* à artemisinina⁽²³²⁾, espera-se que este gene possa ser útil para monitorização dos ACTs cuja redução da eficácia, na ausência de terapias alternativas pode tornar-se uma ameaça para o controle da malária⁽⁷¹⁾.

1.6.3 - Combinações terapêuticas baseadas nos derivados da artemisinina

Com a expansão da resistência do *P. falciparum* à cloroquina, à sulfadoxina-pirimetamina e à mefloquina (esta última nas áreas de multi-resistência estabelecida), e com o objectivo de a conter, a actual recomendação para o tratamento da malária não complicada por *P. falciparum* passou a ser a terapia combinada com os derivados da artemisinina ou ACTs^(172, 219, 273).

Introdução

Assim, desde 2001 a OMS recomenda o uso de terapias combinadas à base de artemisininas como primeira linha para o tratamento da malária não complicada *pelo P. falciparum* (WHO; <http://www.who.int/malaria/areas/treatment/en/>). Esta terapia consiste no uso de dois ou mais fármacos esquizotomicidas sanguíneos com diferentes modos de ação e que actuam em diferentes alvos parasitários⁽²⁷²⁾.

Para além de ser considerada mais efetiva, esta abordagem é mais segura uma vez que na eventualidade do surgimento de parasitas resistentes a um dos componentes no decorrer da infeção, estes poderão ser eliminados pelo segundo componente^(219, 273). Adicionalmente, as artemisininas possuem um efeito gametocitocida importante para redução da transmissão dos parasitas^(259, 274, 275) incluindo eventuais resistentes.

1.6.4 - Conceito de falência terapêutica e resistência aplicado à resposta aos ACTs

Embora as terapias combinadas com os derivados da artemisinina continuem efetivas, sinais de redução da suscetibilidade a estes fármacos (*in vitro* e *in vivo*) foram evidenciados pela primeira vez no sudeste Asiático, na região da fronteira entre a Tailândia e o Camboja conhecida como o epicentro histórico do início da resistência aos antimaláricos^(35, 276-280). Especialistas concordam que a capacidade para conter ou eliminar os parasitas resistentes é limitada e as áreas com transmissão elevada e com baixa cobertura em termos de intervenção contra a malária são particularmente vulneráveis. Se a resistência à artemisinina afectar tais regiões, a elevada transmissão contínua pode levar à rápida propagação de parasitas resistentes e à eventual perda dos ACTs como tratamento eficaz. A urgência em conter esta disseminação é agravada pelo facto de não existirem outros antimaláricos com os mesmos níveis de eficácia e tolerabilidade que os ACTs e alternativas promissoras não estarem disponíveis a curto prazo.

De acordo com a OMS⁽³⁵⁾ um aumento significativo do tempo de depuração do parasita deve ser considerado sinal de alerta precoce, devendo merecer resposta semelhante à que é dada à resistência confirmada. Considera-se suspeita de resistência, o aumento do tempo de eliminação dos parasitas, evidenciado por um número igual ou superior a 10% dos casos

Introdução

com parasitas detectáveis ao dia 3 após início do tratamento com ACTs e como resistência confirmada, a falha terapêutica após monoterapia à base de artemisinina oral (com adequada concentração sanguínea do antimalárico), evidenciada por persistência de parasitas ao 7º dia, ou pela sua presença ao 3º dia e recrudescência dentro de 28 a 42 dias. Os ACTs devem ser tratados como uma classe e ambos os componentes devem ser protegidos, uma vez que a resistência a um deles faz com que o fármaco acompanhante actue em monoterapia, aumentando a probabilidade de resistência também a este e comprometendo os ACTs como um todo^(35, 281).

1.6.5 - Tratamento da malária não complicada

O tratamento da malária não complicada tem como principal objectivo, a melhoria dos sintomas e a eliminação rápida e completa do *Plasmodium* do sangue do paciente, a fim de impedir a progressão para formas de doença grave e a morte. Na perspectiva de saúde pública, o mesmo destina-se a reduzir a transmissão da infecção, diminuir os reservatórios da doença e prevenir a seleção e disseminação da resistência aos antimaláricos.

Na Tabela 4 descrevem-se os principais esquemas terapêuticos recomendados pela OMS para o tratamento da malária em diferentes situações específicas. A escolha do tratamento deve basear-se sobretudo nos níveis de resistência do fármaco usado em combinação com os derivados da artemisinina em cada região e deve ser efetuada com base no peso corporal de cada paciente. Em Moçambique, o protocolo terapêutico que inclui as combinações com os derivados da artemisinina para o tratamento da malária não complicada começou a ser implementado a partir de 2004.

Devido aos elevados índices de resistência à combinação sulfadoxina-pirimetamina (SP)^(282, 283), esta deixou de ser recomendada, tendo sido retirada do protocolo terapêutico nacional. Em relação à mefloquina (MQ) e à piperquina (PQ) embora sejam por vezes utilizadas em casos independentes, estas nunca fizeram parte dos protocolos terapêuticos nacionais para tratamento da malária.

Introdução

Tabela 4 - Protocolos de tratamento da malária não complicada recomendados pela OMS

Adultos		Observações
1ª linha (3 dias)	<ul style="list-style-type: none"> • Artemether+Lumefantrina • Artesunato+Amodiaquina • Artesunato+Mefloquina • Dihydroartemisinina+Piperaquina (DHA+PQ) • Artesunato+Sulfadoxina-pirimetamina (SP) 	Em algumas áreas a associação com AQ ou com SP ainda é efectiva
2ª linha (7 dias)	Em caso de persistência da parastémia (até ao 14º dia) <ul style="list-style-type: none"> • ACT alternativo efectivo na região • Artesunato+Tetraciclina, Doxiciclina ou Clindamicina • Quinino+Tetraciclina, Doxiciclina ou Clindamicina 	
	Persistência da parasitémia (após o 14º dia) <ul style="list-style-type: none"> • Tratamento idêntico ao da 1ª linha 	Não repetir a MQ antes de 60 dias
Crianças		
	<ul style="list-style-type: none"> • Idêntico ao recomendado para os adultos (doses de acordo com o peso da criança) 	Evitar combinações com SP ou Tetraciclina
Mulheres durante a gravidez e a lactação		
Gravidez 1º trimestre (7 dias)	1ª linha <ul style="list-style-type: none"> • Quinino+Clindamicina (na falta de Clindamicina; Quinino em monoterapia) 2ª linha: <ul style="list-style-type: none"> • Artesunato+Clindamicina 	Recomendação para ACTs: <ul style="list-style-type: none"> • Na ausência dos outros fármacos; • Se houver falência ao 1º tratamento; • Se não houver certeza de cumprimento do 1º tratamento.
Gravidez 2º e 3º trimestre (3-7 dias)	<ul style="list-style-type: none"> • ACT com conhecida eficácia na região ou <ul style="list-style-type: none"> • Artesunato+Clindamicina ou <ul style="list-style-type: none"> • Quinino+Clindamicina 	Duração do tratamento: <ul style="list-style-type: none"> • De acordo com o esquema usado. Não existe informação sobre a segurança da DHA+PQ nesta fase

Introdução

1.6.6 - Tratamento da malária grave

A malária grave é considerada uma emergência médica. De acordo com as recomendações, o tratamento deve ser iniciado por via parenteral imediatamente após o diagnóstico, por um período mínimo de 24 horas. Logo que possível e de acordo com a tolerância do paciente deve-se passar à terapia oral até ao 7º dia com um dos esquemas indicados na Tabela 5.

Tabela 5 - Protocolos de tratamento da malária grave recomendados pela OMS

Adultos	
1ª escolha	1- Artesunato: 2.4 mg /kg de peso endovenoso ou intramuscular 1ª dose (hora 0) 2ª dose: 12 horas após a 1ª dose 3ª dose: 24 horas após a primeira dose Doses subsequentes: administrar com intervalos de 24 h
Alternativas	1- Quinino (endovenoso ou intramuscular): 20mg/kg de dicloridrato de quinino diluídos em 10 ml/kg de dextrose a 5% seguido de 10mg/kg de 8 em 8 horas com a mesma diluição 2- Arteméter intramuscular: 3.2 mg/kg de peso à admissão seguido de 1,6 mg/kg de peso por dia
Crianças	
Uma de 3 alternativas	1- Artesunato: 2.4 mg /kg de peso endovenoso ou intramuscular 1ª dose (hora 0) 2ª dose: 12 horas após a 1ª dose 3ª dose: 24 horas após a primeira dose Doses subsequentes: administrar com intervalos de 24 h 2-Quinino (endovenoso ou intramuscular) 20 mg/kg de dicloridrato de quinino diluídos em 10 ml/kg de dextrose a 5% seguido de 10mg/kg de 8 em 8 horas com a mesma diluição 3- Arteméter intramuscular: 3.2 mg/kg de peso à admissão seguido de 1,6 mg/kg de peso por dia
Tratamento oral após a terapia parenteral	
	<ul style="list-style-type: none">• Artemether +Lumefantrina• Artesunato+ Amodiaquina• Dihidroartemisinina+Piperaquina• Artesunato+Sulfadoxina-pirimetamina• Artesunato+ Clindamicina ou Doxiciclina• Quinino+Clindamicina ou Doxiciclina

Introdução

Nos locais com menos recursos, quando necessário transferir os pacientes com malária grave para uma unidade sanitária de referência, a menos que a transferência leve menos de 6 horas, é importante a administração da primeira dose de antimalárico com qualquer dos antimaláricos efectivos recomendados disponíveis, que incluem o artesunato rectal, quinino intramuscular, artesunato intramuscular ou arteméter intramuscular⁽³⁵⁾. Caso não seja possível a transferência, o tratamento deve ser continuado no local, por via rectal ou intramuscular até que o paciente tolere a medicação oral, altura em que se deve passar ao tratamento de 1ª linha (arteméter-lumefantrina ou alternativo).

2 -OBJETIVOS

Objetivos

2.1 - Objetivo geral

A partir de 2006 a OMS passou a recomendar a terapia combinada com derivados de artemisinina (ACTs) para o tratamento da malária não complicada por *P. falciparum* na África sub-Sahariana⁽²⁷²⁾. A recomendação assenta no pressuposto de que os derivados de artemisinina (que causam rápida redução da massa parasitária e da carga de gametócitos), associados a um fármaco com maior semivida e duração de ação, produzem cura clínica e parasitológica mais rápida, protegendo-se mutuamente contra o desenvolvimento de resistência e reduzindo a transmissão da malária. Em Moçambique, a resposta ao tratamento com ACTs está pouco estudada e documentada pelo que pretendemos com o presente trabalho contribuir para um melhor conhecimento da mesma.

Os dados do Programa Nacional de Controlo da Malária de Moçambique⁽²⁸⁴⁾ referem que cerca de 60% das crianças internadas nas enfermarias de pediatria são admitidas com quadros de malária grave. Contudo, existem poucos dados sistematizados relacionados com a investigação da malária grave em crianças tanto no que diz respeito aos aspetos clínicos nos doentes internados como em relação à pesquisa de fatores relacionados com a gravidade da doença. Com a introdução neste trabalho de um capítulo referente à malária grave em crianças, pretendemos contribuir para um melhor conhecimento do perfil clínico desta população e resposta ao tratamento até agora utilizado, antes da introdução alargada do novo esquema terapêutico que inclui a administração do artesunato por via endovenosa.

A compreensão das bases moleculares e a monitorização de potenciais marcadores moleculares de resistência é fundamental por várias razões: a) a deteção precoce de parasitas resistentes aos antimaláricos e sua dispersão geográfica, em conjunto com os ensaios *in vivo* e *in vitro* constitui um potente instrumento epidemiológico para a deteção precoce e monitorização do fenómeno de resistência b) dados moleculares podem ser usados como guia para alteração dos protocolos terapêuticos nacionais. Actualmente o marcador molecular de resistência aos ACTs (baseado no gene *pfK13*) faz parte da definição de resistência recomendada pela OMS desde Setembro de 2014 (<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/status-rep-artemisinin-resistance-se-p2014.pdf>).

Objetivos

2.2 - Objetivos específicos

2.2.1 - Caracterizar o perfil clínico e resposta terapêutica de pacientes com malária não complicada tratados com ACTs em Maputo.

2.2.1.1 - Avaliar a resposta clínica e parasitológica nos pacientes com malária não grave tratados com AL ou Coartem na área geográfica da Cidade e Província do Maputo.

2.2.2 - Caracterizar o perfil à admissão e evolução clínica de pacientes com malária grave/cerebral em Maputo.

2.2.2.1 – Descrever o perfil de manifestações clínicas e parâmetros laboratoriais definidores de malária grave e ou cerebral dos pacientes no momento da admissão.

2.2.2.2 - Avaliar a evolução das manifestações clínicas e dos parâmetros laboratoriais mais relevantes durante o internamento.

2.2.2.3 - Avaliar a existência de uma potencial associação entre o polimorfismo 371G no gene *RNase3* (humano) e a gravidade da doença.

2.2.3 - Determinar a frequência de polimorfismos genéticos potencialmente associados à resposta aos ACTs em isolados de *P. falciparum* provenientes de Maputo.

2.2.3.1 - Avaliar a existência de possíveis associações entre polimorfismos genéticos e a resposta aos antimaláricos estudados.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Material e Métodos

O presente estudo envolveu 2 grupos de pacientes nos quais foram estudados os aspetos clínicos e laboratoriais associados à malária. Um dos grupos (o primeiro) foi composto por crianças e adultos com malária não complicada (MnC) e o outro grupo (o segundo) foi composto apenas por crianças com malária grave (MG). Em ambos os grupos o estudo envolveu a pesquisa de marcadores genéticos associados à resistência aos antimaláricos. No grupo da MG foram também pesquisados os marcadores genéticos associados à suscetibilidade à malária cerebral (MC).

O apuramento ético foi concedido pela Comissão Nacional de Bioética para a Saúde do Ministério da Saúde (CNBS)/MISAU) em Moçambique (Anexo 1). A inclusão dos pacientes foi feita após consentimento informado dos pacientes ou acompanhantes no caso das crianças (Anexo 2). Todas os pacientes foram tratados de acordo com os protocolos de atuação em cada uma das duas unidades sanitárias onde decorreu estudo, significando que toda a assistência foi sempre providenciada pelos médicos de serviço e demais profissionais a estas afetos.

Dado que foram envolvidos diferentes grupos, nos quais foram efetuados dois tipos de análise (clínica e molecular), para uma melhor abordagem a metodologia será dividida em 3 secções:

3.1 - Estudo da malária não complicada (MnC)

3.2 - Estudo da malária grave (MG)

3.3 -Polimorfismos genéticos de *P. falciparum* associados à resposta aos ACTs em Maputo.

Material e Métodos

3.1 - Estudo da malária não complicada

O estudo da malária não complicada foi realizado de Março de 2010 a Março de 2012. Nele foi efetuada a caracterização clínica dos pacientes estudados e a avaliação da resposta terapêutica às duas combinações utilizadas no tratamento da malária não complicada em Moçambique com base na evolução clínica e laboratorial.

3.1.1 - Locais de estudo

Foram selecionadas duas unidades sanitárias para o efeito na Província do Maputo, nomeadamente o Centro de Saúde de Boane localizado no distrito com o mesmo nome e o Centro de Saúde 1º de Maio localizado no centro da cidade de Maputo. Ao longo do texto estes Centros de Saúde passarão a ser designados por “Boane” e “1º de Maio”.

O distrito de Boane localiza-se numa região peri-urbana a 30 Km da cidade da cidade de Maputo. É limitado a norte pelo distrito da Moamba, a Sul e Este pelo Distrito da Namaacha e a Oeste pela cidade da Matola e Distrito de Matutuine. Possui uma superfície de 820 Km² e uma população estimada em 104.457 habitantes, com uma densidade populacional de 124,9 habitantes/Km². A sua população é essencialmente jovem, sendo 42% abaixo dos 15 anos. Para além do Centro de Saúde de Boane onde foi realizado o presente estudo, o distrito dispõe de mais 15 Centros de Saúde e um hospital distrital.

A cidade de Maputo localiza-se na região mais a Sul de Moçambique, possui uma população estimada em 1.209.992 habitantes e uma densidade populacional de 4.033 habitantes/Km². Estende-se da localidade de KaTembe ao bairro de Chiango no sentido Sul/Norte e da Ilha de Inhaca ao vale de Infulene, na orientação Este/Oeste. Faz o seu limite com a Província de Maputo nos extremos Norte, Sul e Oeste e é banhado pelo Oceano Índico no extremo Este, onde se localiza a Ilha de Inhaca⁽²⁸⁵⁾. O Centro de Saúde 1º de Maio encontra-se localizado nesta cidade e possui nas suas proximidades dois outros Centro de Saúdee um Hospital Geral.

Material e Métodos

3.1.2 - Pacientes incluídos no estudo

Foram incluídos 412 pacientes com idade superior a 1 ano com malária não complicada por *P. falciparum*, 306 dos quais do Centro de Saúde de Boane e 106 do Centro de Saúde 1º de Maio. O diagnóstico foi efectuado por Microscopia Ótica (Anexo 3) e posteriormente confirmado pela técnica de PCR (Anexo 4). Os critérios de exclusão foram: crianças com peso inferior a 10 Kg, mulheres grávidas, história de tratamento com algum antimalárico para a doença atual, identificação de algum sinal ou sintoma de malária grave ou doença concomitante requerendo internamento hospitalar.

3.1.3 - História e exame clínico

Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com MnC foram avaliados à admissão (D₀), e controlados ao 7º dia (D₇) e 14º dia (D₁₄).

Aquando da admissão (D₀), os pacientes com critérios definidos para inclusão no estudo foram submetidos a uma história clínica na qual foram colhidas informações acerca do início da doença e principais sintomas clínicos. Foram pesquisados dados relacionados com a existência de episódios anteriores de malária e tratamentos anteriores com antimaláricos. A história foi fornecida pelo próprio paciente no caso dos adultos, ou por um acompanhante no caso das crianças. A todos os pacientes foi efetuado um exame físico completo para determinação do estado clínico e exclusão de potenciais sinais de gravidade. O registo das principais queixas (febre, cefaleia, mioartralgia, diarreia, vômitos, dor abdominal e anorexia) assim como dos principais sinais clínicos (febre, anemia, icterícia, hepatomegália, esplenomegália e desidratação) foi efetuado numa ficha de recolha de dados (Anexo 5), utilizada para a elaboração da base de dados para posterior análise.

3.1.4 - Recolha e processamento das amostras de sangue

As amostras de sangue foram colhidas pelo pessoal do laboratório das referidas unidades sanitárias no âmbito da sua atividade diária e segundo os protocolos instituídos. As técnicas de pesquisa do *P. falciparum* por microscopia ótica assim como o hemograma foram realizadas no primeiro dia (D₀), nos laboratórios dos respetivos centros de saúde onde os

Material e Métodos

pacientes foram seguidos. Adicionalmente, parte da amostra de sangue destinada aos exames laboratoriais protocolados (cerca de 50-100µl) foi colocada em papel de filtro Whatman nº 3. Depois de secas, estas amostras foram acondicionadas e conservadas à temperatura ambiente até à data do seu processamento no laboratório do Instituto de Higiene e Medicina Tropical em Lisboa (IHMT). As amostras correspondentes ao controlo no 7º dia (D₇) e 14º dia (D₁₄) após o tratamento foram colhidas e processadas de forma idêntica.

3.1.5 - Parâmetros hematológicos

Para o estudo das alterações hematológicas, as amostras de sangue foram colhidas em tubos com anticoagulante Etileno Diamina Tetra Acético (EDTA) e analisadas num aparelho automático de hematologia (Sysmex KX-21 N)[®]. A presença de anemia foi determinada pelos resultados da hemoglobina em função da idade e do sexo dos pacientes e classificada com base nos critérios definidos pela OMS⁽²⁸⁶⁾, de acordo com a Tabela 6.

Tabela 6 - Classificação da anemia de acordo com o nível plasmático de hemoglobina, tendo em conta a idade e o sexo (WHO, 2011). ♂ - sexo masculino; ♀ - sexo feminino; *♀ - mulher não grávida

Idade (anos)	Sexo	Hgb normal (g/dl)	Anemia (Hgb g/dl)			
			Ligeira	Moderada	Grave	Muito grave
<5	♀/♂	≥11.0	10.0-10.9	7.0-9.9	<7.0	<5.0
5-11	♀/♂	≥11.5	11.0-11.4	8.0-10.9	<8.0	<5.0
12-14	♀/♂	≥12.0	11.0-11.9	8.0-10.9	<8.0	<5.0
≥15	♀*	≥12.0	11.0-11.9	8.0-10.9	<8.0	<i>n.a.</i>
≥15	♂	≥13.0	11.0-12.9	8.0-10.9	<8.0	<i>n.a.</i>

A trombocitopénia foi definida como a presença de um nível de plaquetas inferior a 150.000 por microlitro de sangue (Plaquetas < 150x 10⁹/l), independentemente da idade e sexo e classificada em diferentes graus de acordo com a Tabela 7⁽²⁸⁷⁾.

Material e Métodos

Tabela 7 - Classificação da trombocitopénia de acordo com a contagem de plaquetas

Plaquetas (x 10 ⁹ /l)	Classificação
75-149	Trombocitopénia ligeira
50-74	Trombocitopénia moderada
25-49	Trombocitopénia grave
≤25	Trombocitopénia muito grave

3.1.6 - Tratamento efetuado

Os pacientes com malária não complicada foram tratados com comprimidos de AL (doses fixas combinadas de arteméter-lumefantrina), ou ASAQ (doses fixas combinadas de artesunato-amodiaquina) de acordo com os esquemas terapêuticos apresentados respetivamente na Tabela 8 e Tabela 9.

Em ambos os grupos de tratamento a medicação foi efetuada durante 3 dias, de acordo com o peso do paciente e com as instruções dadas pelo pessoal de saúde envolvido no estudo. Em cada caso, o esquema terapêutico (AL ou ASAQ) foi escolhido tendo em conta a disponibilidade dos fármacos nos centros de saúde, visto que estes são fornecidos pelo Ministério de Saúde, o que obriga à adequação dos regimes terapêuticos em função dos medicamentos existentes.

Tabela 8 - Esquema para tratamento da malária não complicada com AL. ¹Número de comprimidos contendo 20 mg de arteméter e 120 mg de lumefantrina; ²Número total de comprimidos administrados durante os 3 dias de tratamento.

Peso (Kg)	Nº de comprimidos/dose ¹ administrados de 12/12 horas	Nº total de comprimidos ²
10-14	1	6
≥15-24	2	12
≥25-34	3	18
≥35	4	24

Material e Métodos

Tabela 9 - Esquema para tratamento da malária não complicada com ASAQ

Peso (Kg)	Formulação de ASAQ (mg)	Nº de comprimidos			
		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Total
10 - 17	50/175 mg	1	1	1	3
≥18 - 35	100/270 mg	1	1	1	3
≥36	100/270 mg	2	2	2	6

3.1.7 - Acompanhamento dos pacientes

No primeiro dia (D₀), os pacientes receberam a primeira dose da medicação sob observação do técnico de saúde da respetiva unidade sanitária (técnico de medicina ou enfermeiro) envolvido no estudo. A restante medicação foi disponibilizada em pequenas embalagens contendo as doses necessárias a efetuar no domicílio de acordo com as instruções por este fornecidas. Foram também disponibilizados comprimidos de paracetamol para o tratamento da febre e pacotes com sais de hidratação oral para reposição hídrica. Os pacientes foram instruídos a não efetuar nenhum tratamento adicional e a retornar ao Centro de Saúde nos dias de controlo (D₇ e D₁₄) ou a qualquer altura antes desse período, em caso de agravamento do quadro clínico ou surgimento de alguma situação que impossibilitasse o cumprimento do tratamento.

3.2 - Estudo da malária grave

3.2.1 - Local do estudo

O estudo clínico da malária grave (MG) foi realizado na Unidade de Cuidados Intensivos do Departamento de Pediatria do Hospital Central do Maputo durante o período de Fevereiro de 2011 a Março de 2011.

Material e Métodos

3.2.2 - Pacientes incluídos no estudo

Foram incluídas 129 crianças entre 8 meses e 14 anos de idade, com malária por *P. falciparum*, diagnosticada por microscopia ótica e posteriormente confirmada pela técnica de PCR, que se apresentaram à admissão (D₀) com pelo menos um dos critérios definidores de MG segundo a OMS descritos na Seccção 1.5.2., Tabela-1. Os dados referentes às características clínicas e laboratoriais foram recolhidos a partir dos processos clínicos durante o período em que as crianças permaneceram internadas.

3.2.3 - Classificação dos pacientes com MG de acordo com o estado de consciência

Para a classificação da MG, o estado de consciência foi avaliado segundo a escala de coma de Glasgow⁽⁷⁹⁾ modificada para crianças, utilizada pelos clínicos do serviço de pediatria onde decorreu o estudo (Tabela 10). Com base nesta escala, o “estado de consciência alterado” foi definido como a presença de um *score* de Glasgow inferior a 15 e “malária cerebral” como a presença de um *score* inferior a 11.

Tabela 10 - Escala de Coma de Glasgow modificada para crianças

	Crianças	Latentes	Pontuação
Abertura ocular	Expontânea	Expontânea	4
	Ao estímulo verbal	Ao estímulo verbal	3
	Ao estímulo doloroso	Ao estímulo doloroso	2
	Ausente	Ausente	1
Melhor resposta motora	Movimentos expontâneos	Movimentos expontâneos	6
	Localiza o estímulo doloroso	Localiza a dor (retirada ao toque)	5
	Fugaa em resposta à dor	Retirada ao estímulo doloroso	4
	Flexão em resposta à dor	Flexão anormal em resposta à dor	3
	Extensão em resposta à dor	Extensão anormal em resposta à dor	2
	Ausente	Ausente	1
Melhor resposta verbal	Orientado, adequado	Balucia	5
	Confuso	Choro irritável	4
	Palavras inapropriadas	Choro em resposta à dor	3
	Palavras incompreensíveis	Gemido em resposta à dor	2
	Ausente	Ausente	1

Para exclusão do coma transitório *pós-ictal*, nas crianças que haviam tido convulsões, foi considerado o nível de consciência que se encontrava registado no processo clínico pelo

Material e Métodos

menos 1 hora após a última convulsão ou após 6 horas naquelas que haviam sido submetidas a tratamento com anticonvulsivantes (Diazepan e/ou Fenobarbital).

O diagnóstico de malária por *P. falciparum* por microscopia ótica foi realizado de acordo com os mesmos procedimentos descritos na secção 3.1.2 (Anexo 3). O hemograma e a bioquímica foram realizados respetivamente nos aparelhos Sysmex KX-21[®] e DimensionXpand[®]. À equipe envolvida no estudo coube a colheita das amostras de sangue em papel de filtro (Whatman 3) para posterior realização dos exames moleculares no laboratório do CMDT LA/IHMT, Lisboa, de acordo com os procedimentos descritos para a MnC na secção 3.1.2 (Anexo 4).

A classificação da anemia e trombocitopénia foi feita de acordo com o descrito na secção 3.1.5, Tabela 6 e Tabela 7. Para os restantes parâmetros foram usados as seguintes valores normais de referência: Leucócitos: 3 a 12.5 x10⁹/l; Bilirrubina total: 5.1 a 17.1µmol/l; Bilirrubina conjugada: 1.7 a 5.1µmol/l; Aspartato transaminase (AST): 0 a 45 U/l; Alanina transaminase (ALT); 0 a 50 U/l; Ureia: 3.6 a 7.1mmol/l; Creatinina <133 µmol/L; Volume plaquetário médio (MPV)> 9,5 fl; Hematúria e Proteinúria: ≥“+.

3.2.4 - Tratamento antimalárico efetuado

Todas as crianças internadas com malária grave receberam o tratamento de acordo com as normas vigentes no Departamento de Pediatria do HCM na altura da realização do estudo. O tratamento consistiu na utilização de 2 fármacos nomeadamente o artemeter, administrado por via intramuscular na dose de 1,2 mg/kg de peso numa dose diária durante 3 dias (independentemente da evolução clínica) e quinino, administrado por via endovenosa na dose de 10mg/kg de peso de 8 em 8 horas, até à melhoria do estado clínico (num máximo de 7 dias, correspondendo a 21 doses).

Material e Métodos

3.2.5 - Identificação de polimorfismos nos genes *RNase3*

A identificação de polimorfismos no gene *RNase3* foi efetuada nas amostras colhidas nos pacientes com malária grave. A colheita das amostras para extração do ADN e genotipagem obedeceu aos mesmos procedimentos para o tratamento das amostras da MnC descritos na secção 3.1.2 (Anexo 3 e Anexo 4). A identificação de *SNPs* no gene *RNase3* (371G, 16G e 94A) potencialmente associados à susceptibilidade à malária cerebral nos pacientes estudados foi efetuada por PCR-RFLP (Tabela 11).

3.2.6 - Electroforese dos produtos amplificados

Após a amplificação do ADN, os produtos do PCR foram separados por electroforese em gel de agarose. O gel foi preparado através da mistura do pó de agarose com uma solução tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) com uma concentração de 2%. Foram colocados 10µl de produto amplificado em cada poço de gel de agarose juntamente com um marcador de peso molecular de 100pbs (Fermentas TM) após o que se aplicou uma corrente de 120 volts para migração do ADN amplificado no gel. A visualização dos produtos foi feita num transiluminador de luz ultravioleta EagleEye II (Stratagene®) após coloração dos géis com brometo de etídio (Sigma, Germany).

Tabela 11 - Sequência dos *primers* e condições de amplificação do gene *RNASE3* por PCR-RFLP. Fw: *primer forward*; Ver: *primer reverse*.

Fragmento	Sequência dos Primers (5'- 3')	Mistura de PCR	Condições de PCR
371G	Fw - 5'CAGTTCTCACAGGAGCCACA3' Rev- 5'AGGTGAACTGGAACCACAGG3'	H ₂ O- até 25 µl Tampão – 1X Mgcl2 – 2 mM Dntps – 0,2mM PF – 0,2µM PR - 0,2µM Taq – 0,3 U ADN - 1µl	94° -3 min (1 X) 94°- 1 min (40 X) 55° – 45 secs (40 X) 72°- 45 sec (40 X) 72°- 3 min (1 X)

Material e Métodos

3.3 - Estudo de polimorfismos genéticos de *P. falciparum* associados à resposta aos ACTs em Maputo.

3.3.1 - Material biológico

Para o estudo de polimorfismos genéticos de *P. falciparum* associados à resposta aos ACTs em Maputo foram consideradas no total 480 amostras de pacientes com malária.

As amostras referentes à malária não complicada foram colhidas nos Centros de Saúde de Boane e 1º de Maio, no período entre Março de 2010 a Março de 2012 e as referentes à malária grave foram colhidas no Serviço de Urgências de Pediatria do Hospital Central do Maputo entre Fevereiro de 2012 a Março de 2012.

Todos os procedimentos referentes à colheita e processamento das amostras obedeceram aos mesmos princípios, independentemente do local de colheita, da gravidade da malária ou do tratamento efectuado. Do volume total de sangue colhido para as análises normalmente efectuadas por rotina aos pacientes com malária descritos na secção 3.1.2 - Material e Métodos, uma gota de sangue de cada paciente (50-100 µl) foi colocada em papel de filtro (Whatman nº3). Depois de identificadas, as amostras foram secas à temperatura ambiente e acondicionadas em embalagens plásticas individuais para processamento no laboratório do Instituto de Higiene e Medicina Tropical em Lisboa (IHMT).

3.3.2 - Detecção e identificação parasitária por PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

3.3.2.1 - Extração do ADN genómico

O ADN das amostras de sangue colhido foi obtido com recurso ao método de extração com Chelex (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (Singh B, 1996), estabelecido no laboratório da UEI Malária/IHMT/CMDT LA (Anexo 4). Com auxílio de uma tesoura e uma pinça previamente imersas em ácido clorídrico (HCL) foi cortada uma pequena porção de papel de filtro contendo a gota de sangue (o correspondente a cerca de 50 µl de eritrócitos parasitados), a qual foi colocada em um tubo de micro-centrífuga (*eppendorff*) de 1,5 ml. A hemólise dos eritrócitos parasitados foi efectuada mediante adição de 1 ml de solução

Material e Métodos

tampão PBS (*phosphate buffered saline*) e 50 ml de saponina a 10% tendo-se deixado esta mistura em incubação a 4° C por cerca de 12 horas durante a noite. De seguida foi feita uma lavagem com PBS e nova incubação a 4° C por 30 minutos. A extração do ADN foi realizada mediante adição de 75 µl de solução de Chelex em Água Milli-Q a 20% (Biorad). A seguir, os tubos *eppendorff* foram aquecidos em um bloco (Dry block heater BBD-Grant-Boekel) a 99°C durante 15 minutos, após o que se procedeu à centrifugação (10000g/2min), a fim de separar o sobrenadante contendo o ADN, dos restantes componentes da mistura (papel de filtro e Chelex) através da sedimentação. O ADN extraído foi conservado em aliquotas a -20° C até à amplificação por PCR.

3.3.2.2 - Eletroforese dos produtos amplificados

Após a amplificação do ADN, os produtos do PCR foram separados por electroforese em gel de agarose. O gel foi preparado através da mistura do pó de agarose com uma solução tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) com uma concentração de 2%. Foram colocados 10µl de produto amplificado em cada poço de gel de agarose juntamente com um marcador de peso molecular de 100pbs (Fermentas TM) após o que se aplicou uma corrente de 120 volts para migração do ADN amplificado no gel. A visualização dos produtos foi feita num transiluminador de luz ultravioleta EagleEye II (Stratagene®) após coloração dos géis com brometo de etídio (Sigma, Germany).

3.3.2.3 - Genotipagem do *P. falciparum* por PCR

A genotipagem de *P. falciparum* para estudo dos marcadores de diversidade presentes nas amostras colhidas no dia da admissão (D0) foi efetuada mediante amplificação de 2 genes estáveis e de cópia única (*pfmsp2* e *pfglurp*), altamente polimórficos em tamanho e sequência⁽²⁸⁸⁾. As regiões repetitivas dos referidos genes foram amplificadas por Nested-PCR, de acordo com as condições descritas na Tabela 12.

Material e Métodos

Tabela 12 - Sequências dos primers e condições de amplificação dos genes *pfmsp2* e *pfglurp* por PCR. Fw: primer forward; Rev: primer reverse.

Gene	Sequência dos Primers (5' - 3')	Mistura de PCR	Condições de PCR
<i>pfmsp2</i>	1ª amplificação: Fw - ATGAAGGTAATTA AAAACATTGTCTATTAT 52°C Rev - CAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATA 58°C	H ₂ O Tampão – 1× Mgcl2 – 1,8 mM Dntps – 0,2 mM PF – 0,2 µM PR - 0,2 µM Taq – 0,3 U ADN - 1 µl Volume 25 µl	94°C - 3 min 94°C - 1 min (9×) 53°C -45 secs (9×) 72°C - 45 secs (9×) 94°C - 1 min (30×) 50°C -45 secs (30×) 72°C - 45 secs (30×) 72°C – 3 min
	2ª amplificação: Fw - GCAGAAAGTAAGCCTTCTACTGGTGCT 61°C Rev - TCATAAAAATGCCGAAACAAATC 50°C	H ₂ O Tampão – 1× Mgcl2 – 1,8 mM Dntps – 0,2mM PF – 0,2 µM PR - 0,2 µM Taq – 0,3 U ADN - 1 µl Volume 25 µl	94°C - 3 min 94°C - 1 min (9×) 53°C -45 secs (9×) 72°C - 45 secs (9×) 94°C - 1 min (30×) 50°C -45 secs (30×) 72°C - 45 secs (30×) 72°C - 3 min
<i>pfglurp</i>	1ª amplificação: Fw - ACATGCAAGTGTTGATCC Rev- CCACAAGAACCCGTGGTACCTACA	H ₂ O Tampão – 1× Mgcl2 – 1,6 mM Dntps – 0,2 mM PF – 0,2 µM PR - 0,2 µM Taq – 0,3 U ADN – 1 µl Volume 25 µl	94°C - 3 min 94°C - 1 min (9×) 54°C -45 secs (9×) 72°C - 45 secs (9×) 94°C - 1 min (30×) 50°C -45 secs (30×) 72°C - 45 secs (30×) 72°C - 3 min
	2ª amplificação: Fw - TGAATTTCGAAGATGTTCACTGAAC Rev- CGTTACTCCCAAACCATC	H ₂ O Tampão – 1× Mgcl2 – 1,6 mM Dntps – 0,2 mM PF – 0,2 µM PR - 0,2 µM Taq – 0,3 U ADN – 1 µl Volume 25 µl	94°C - 3 min 94°C - 1 min (9×) 54°C - 45 secs (9×) 72°C - 45 secs (9×) 94°C – 1 min (30×) 50°C - 45 secs (30×) 72°C - 45 secs (30×) 72°C - 3 min

Material e Métodos

3.3.3 - Identificação de polimorfismos nos genes *pfmdr1* por PCR-RFLP

A identificação de polimorfismos no gene *pfmdr1* em estudo foi efetuada pela técnica de *PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP), segundo os protocolos estabelecidos no laboratório da UEI Malária/IHMT/CMDT LA. A PCR-RFLP consiste em amplificar o fragmento de ADN que contém a mutação. Este fragmento é depois submetido a uma reação sob ação de uma enzima de restrição (endonuclease) que reconhece especificamente o palindroma originado ou eliminado pela mutação em causa (Lopes et al, 2002). Os fragmentos de restrição resultantes são separados de acordo com o seu comprimento por eletroforese em gel de agarose.

Os polimorfismos no gene *pfmdr1* foram avaliados nos fragmentos de ADN 86 (N86Y), 184 (Y184F), 1246 (D1246Y). Em todas as reações de amplificação e restrição foram utilizadas amostras de ADN de isolados de *P. falciparum* conhecidos nomeadamente 3D7, FBC, K1 e 7G8 como controlos positivos e Dd2 como controle negativo⁽²⁸⁹⁾ (Tabela 13).

Tabela 13 - Clones de referência utilizados como controlo no estudo. N- asparagina, D - ácido aspártico, Y- Tirosina; F - Fenilalanina; *Não está identificada a proveniência geográfica deste clone.

Clone	Origem	Referência	Genótipo		
			<i>pfmdr1</i>		
			86	184	1246
HB3	Honduras	Bhasin & Trager, 1984	N	F	D
3D7	*	Rosário <i>et al</i> , 1981	N	Y	D
7G8	Brasil	Burkot TR <i>et al</i> , 1984	N	F	Y
Dd2	SEAsiático	Oduola <i>et al</i> , 1988	Y	Y	D

A sequência dos *primers*, condições de amplificação e enzimas de restrição utilizados para os fragmentos 86, 184 e 1246 do gene *pfmdr1* são descritas na Tabela 14.

Material e Métodos

Tabela 14 - Sequência dos *primers* e condições de amplificação dos fragmentos 86, 184 e 1246 do gene *pfmdr1* por PCR. Fw: *primer forward*; Rev: *primer reverse*.

Fragmento	Sequência de Primers (5' - 3')	Mistura de PCR	Condições de PCR
86	Fw - GTATGTGCTGTATTATCAGGAGGA Rev - CGTACCAATTCCTGAACTCAC	H ₂ O Tampão – 1× Mgcl ₂ – 2 mM Dntps – 0,2 mM PF – 0,2 μM PR - 0,2 μM Taq – 0,3 U ADN - 1μl Volume - 25 μl	94°C – 3 min 94°C – 1 min (40×) 52°C -45 secs (40×) 72°C – 45 secs (40×) 72°C – 3 min
184	Fw - GCCAGTTCCTTTTTAGGTTTAAT Rev - GTCTTTTCTCCACAATAAATTGC	H ₂ O Tampão – 1× Mgcl ₂ – 2 mM Dntps – 0,2mM PF – 0,2μM PR - 0,2μM Taq – 0,3 U ADN - 1μl Volume 25 μl	94°C – 3 min 94°C – 1 min (45×) 53°C -30 secs (45×) 72°C – 45 secs (45×) 72°C – 3 min
1246	Fw -GGAGAAACAGGTAGTGGAATC Rev -CTGTTTTTGTCACCTGATAAGC	H ₂ O- Tampão – 1× Mgcl ₂ – 2 mM Dntps – 0,2 mM PF – 0,2 μM PR - 0,2 μM Taq – 0,3 U ADN – 1 μl Volume 25 μl	94°C – 3 min 94°C – 1 min (40×) 52°C -30 secs (40×) 72°C – 45 secs (40×) 72°C – 3 min

Após amplificação, os fragmentos 86, 184 e 1246 do gene *pfmdr1* foram submetidos a restrição, cujas condições se descrevem na Tabela 15.

Material e Métodos

Tabela 15 - Condições de restrição para os fragmentos 86, 184 e 1246 do gene *pfmdr1*

Fragmento	Mistura de PCR	Condições de Restrição
86	H ₂ O - 5,8 µl Tampão - 1× <i>ApoI</i> - 0.2 µl ADN - 12 µl	12 horas (37°C)
184	H ₂ O - 5,8 µl Tampão - 1× <i>TasI</i> - 0.2 µl ADN - 12 µl	12 horas (65°C)
1246	H ₂ O - 5,8 µl Tampão - 1× <i>EcoV</i> - 0.2 µl ADN - 12 µl	12 horas (37°C)

3.3.3 - Determinação do número de cópias do gene *pfmdr1* por RT-PCR

A determinação do número de cópias do gene *pfmdr* foi efetuada com recurso à técnica de PCR em tempo real (RT-PCR). O número de cópias do gene *pfmdr1* (gene alvo) foi determinado por RT-PCR usando uma master Mix de SYBR Green. Para o efeito foi usado o método $N=2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001) em que o gene *pfβ-actin1* serviu como controlo interno e o número de cópias do gene *pfmdr1* existentes no clone 3D7 (1 cópia) como amostra calibrador, segundo os protocolos estabelecidos no laboratório da UEI Parasitologia Médica/IHMT/CMDT LA ⁽²³¹⁾. O clone Dd2 previamente conhecido por ter 4 cópias do gene *pfmdr1* foi usado como controlo multicópia. Os resultados foram expressos como alterações no número de cópias do gene alvo no *P.falciparum* 3D7.

O modelo matemático ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), permite determinar a variação da expressão (N) de um gene pela equação $N=2^{-\Delta\Delta Ct}$ (**equação A**), na qual:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct, \text{alvo} - Ct, \text{controlo interno})\chi - (Ct, \text{alvo} - Ct, \text{controlo interno})\gamma \text{ (equação B)}$$

Nesta equação temos:

χ = amostra a partir da qual se pretende estudar a variação de expressão do gene alvo.

Material e Métodos

γ = amostra calibrador em relação à qual se está em estudo a variação de expressão do gene alvo (no nosso caso utilizamos o gene 3D7 que sabemos possuir 1 cópia).

A Tabela 16 mostra a sequência de *primers* e as condições para determinação do número de cópias do gene *pfmdr1*.

Tabela 16 - Sequência de primers e condições para determinação do número de cópias do gene *pfmdr1*

Primers (5'→ 3')	Mistura de PCR	Condições de PCR
Fw-TGTATTATCAGGAGGAACATTAC	H ₂ O - até 15 μ l Tampão - 1 \times PF - 300 nM	95° - 10 min (1 \times) 95° - 15 secs (1 \times)
Rev-GTCTTTTCTCCACAATAACTTGC	PR - 300 nM ADN - 1,5 μ l	60° - 1 min (1 \times)

3.3.4 - Pesquisa de polimorfismos no gene *pfatp6* por sequenciação de produto de PCR

A pesquisa de mutações no gene *pfatp6*, antes proposto como o maior alvo terapêutico das artemisininas foi efetuada com recurso à sequenciação. Foram amplificadas por PCR e sequenciadas 3 regiões do mesmo deste gene que resultaram em fragmentos com 526bp, 897bp e 780bp respectivamente para as regiões 1, 2 e 3 (Tabela 17). A escolha destas regiões genéticas deveu-se ao facto de em estudos anteriores terem sido identificadas mutações em percentagens elevadas nestas localizações com possível associação à susceptibilidade às artemisininas (Jambou et al, 2005; Dahlstrom et al, 2008).

O produto do PCR do gene *pfatp6* foi purificado mediante o uso do método *BigDye® XTerminator™ Purification Kite* enviado para sequenciação no laboratório STAB-vida. Caparica, Portugal (info@stabvida.com) usando os primers descritos na Tabela 17.

Material e Métodos

Tabela 17 - Condições para amplificação por PCR do gene *pfatp6* para pesquisa de mutações relacionadas com a resistência à artemisinina

Região amplificada/ Tamanho do fragmento	Primers usados para Amplificação (5'→ 3')	Condições de PCR
Região 1 526 pb	1ª Amplificação: Fw - TGGTAATAAACTCCCCTGATGC Rev - CCGTTGTACATCCTAACGTCTCAACAC 2ª Amplificação: Fw -GTTGAACAGAGTATGTTAACAGGAGAATCCTG	H ₂ O Tampão - 1× MgCl ₂ - 2 mM Dntps - 0,2mM PF - 0,2µM PR - 0,2µM
Região 2 897 bp	1ª Amplificação: Fw - GATGAAGCTGATCCATATAGT Rev - TTACGTGGTGGATCAATAA 2ª Amplificação: Fw - AGTAGGAGTGGTGCTAAGAG Rev - ATAAGCAAAGCTAAGTGTCT	Taq - 0,3 U ADN - 1µl Volume 25 µl Programa PCR 94°C - 3 min 94°C - 30 min (45×)
Região 3 780 bp	1ª Amplificação: Fw - AGCATGGCACAAGTTTTGA Rev - TAGCTACCTCCGTTCCATTA 2ª Amplificação: Fw - AAATAAATACCACATCAACACA Rev - CTGTCATAGCAACTGTTTCT	52°C -30 secs (45×) 72°C - 30 secs (45×) 72°C - 3 min

3.3.5 - Pesquisa de polimorfismos no gene *pfK13* por sequenciação de produto de PCR

Foi analisado o gene PF3D7_1343700, que codifica a proteína *kelch* K13, para pesquisa de polimorfismos. Os *primers*, as condições de PCR e o tamanho dos fragmentos encontram-se descritos na tabela (Tabela 18). Foi amplificado um fragmento de situado entreo nucleótido 1357e o 1877 (entre os a.a. 452 e 626). Em algumas amostras foi usado um seminested no sentido de aumentar o rendimento da reação de PCR e produto amplificado.

Material e Métodos

Tabela 18 - Pesquisa de polimorfismos no gene *pfK13*: primers, condições de PCR e fragmentos.

Fragmento	Primers (5'→ 3')	Mistura de PCR	Condições de PCR
520pb	K13_Fw GTGTAGAATATTTAAATTCG K13_Rev GCTCCTGAACTTCTAGCTTC	H ₂ O Tampão - 1× Mgcl2 - 2 mM Dntps - 0,2 mM PF - 0,2 μM Primer - 0,2 μM Taq - 0,6 U ADN – 1 μl Volume 25 μl	94° -3 min (1×) 94°- 1 min (10×) 55°-30 secs (10×) 72°- 1 min (10×) 94°- 1 min (35×) 55° - 30 secs (35×) 72°- 1 min (10×) 72°- 3 min (1×)
445pb	K13_Fw GTGTAGAATATTTAAATTCG K13N_Rev ATAGAATTTAATCTCTCACC	H ₂ O Tampão - 1× Mgcl2 - 2 mM Dntps - 0,2 mM PF - 0,2 μM Primer - 0,2 μM Taq - 0,3 U ADN – 1 μl Volume - 25 μl	94° -3 min (1×) 94°- 1 min (45×) 55° - 30 secs (45×) 72°- 1 min (45×) 72°- 3 min (1×)

3.3.5.1 - Sequenciação do ADN para a pesquisa de polimorfismos no gene *pfK13*

Após purificação recorrendo ao kit EXOSAP-IT PCR CLEANUP®, seguindo as recomendações do fabricante, o produto foi enviado para sequenciação na STAB Vida, Investigação e Serviços em Ciências Biológicas, Lda (<http://www.stabvida.com>), usando o método de Sanger. As amostras com polimorfismos foram reamplificadas e resequenciadas para confirmação.

O alinhamento de sequências foi realizado mediante a aplicação Multalin¹⁽²⁹⁰⁾ usando como referência a estirpe de *P. falciparum* 3D7. A sequência de nucleótidos foi comparada com a depositada na base de dados PlasmODB (<http://plasmodb.org/plasmo/>) para pesquisa de

¹ Disponível em: <http://multalin.toulouse.inra.fr/>

Material e Métodos

SNPs, entre eles os associados a resistência à artemisinina: M476I, Y493H, R539T, I543T, C580Y⁽²³²⁾.

3.4 - Análise estatística dos dados

O processamento e análise dos dados foi efetuado com auxílio do programa estatístico IBM SPSS Statistics (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 19. As associações foram consideradas estatisticamente significativas para um valor de $p \leq 0.05$ tendo em conta um intervalo de confiança de 95%.

As variáveis quantitativas foram apresentadas sob forma de médias, desvios padrão (DP), mediana, amplitude interquartílica e valores mínimo e máximo. As variáveis qualitativas foram apresentadas sob a forma de tabelas de frequência ou gráficos.

Para o cruzamento de 2 variáveis qualitativas (categóricas) foi usado o Teste do Qui-quadrado ou em alternativa o Teste exato de Fisher para as situações em que as condições de aplicabilidade do teste do qui-quadrado não foram satisfeitas. O Teste T para amostras emparelhadas foi usado para comparação de médias entre duas observações temporais (por exemplo entre os valores médios de hemoglobina e plaquetas nos dias D₀, D₇ e D₁₄).

Para comparar variáveis quantitativas em 2 grupos independentes foi usado o teste T student para amostras independentes. Nas situações em que não foi observada a homogeneidade das variâncias ou na ausência de um comportamento distribucional gaussiano a comparação foi feita mediante o Teste não paramétrico de Mann-Whitney (U).

A análise de variância one way ANOVA foi utilizada para comparação de médias entre mais de dois grupos. Nas situações em que não foi observada a homogeneidade das variâncias ou na ausência de um comportamento distribucional gaussiano a comparação foi feita mediante o Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

4- RESULTADOS

Resultados

4.1 - Estudo da malária não complicada

4.1.1 - Pacientes incluídos no estudo

Como referido no Capítulo 3.1.2, o estudo clínico da MnC foi realizado em dois centros de saúde da Província do Maputo (Boane e 1º de Maio). Dos 420 pacientes positivos por PCR para *P. falciparum*, para a presente análise foram excluídos 8, devido à falta de dados completos na ficha de recolha de dados em D₀ (Anexo 5). Assim, apenas foram considerados 412 pacientes com idade entre 2 e 63 anos, 211 dos quais do sexo masculino e 201 do sexo feminino, que cumpriam os critérios estabelecidos em 3.1.2

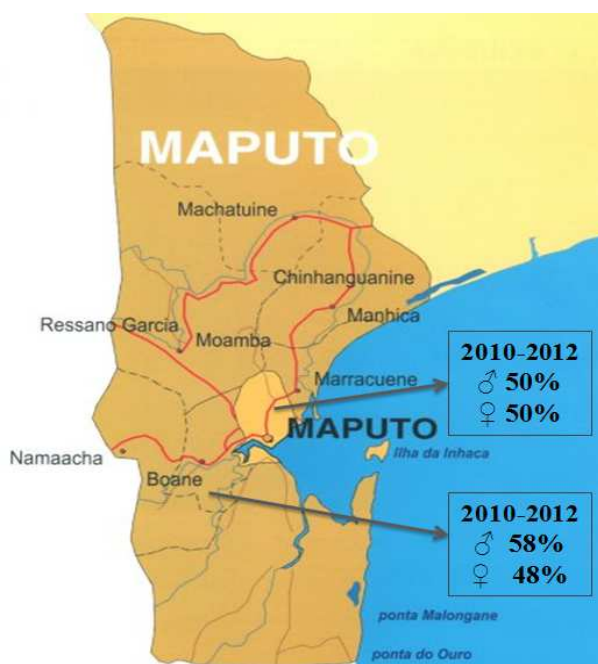


Figura 3 - Mapa da Província de Maputo ilustrando os centros de saúde nos quais foi realizado o estudo da malária não complicada e a percentagem de pacientes incluídos.

Nos dois Centros de Saúde foram estudados 412 pacientes dos quais 274 foram tratados com AL e 138 com ASAQ (Tabela 19). Em Boane não se registaram diferenças

Resultados

significativas entre as idades dos pacientes tratados com AL ou com ASAQ ($p= 0.278$ - Teste U de Mann- Whitney).

Tabela 19 - Distribuição dos pacientes com malária não complicada por idade e por tratamento efetuado em cada um dos Centros de Saúde (Boane e 1º de Maio).

Local	AL		ASAQ		Total n (%)		
	n (%)	Idade (anos)		n (%)		Idade (anos)	
		Mediana (IQR)	Média (dp)			Mediana (IQR)	Média (dp)
Boane (♂ 58%)	168 (54.9)	6 (6.8)	9.6 (9.7)	138 (45.1)	5 (8.3)	9.8 (10.5)	306 (74.3)
1º de Maio (♂ 50%)	106 (100)	21.5 (26.5)	23.2 (16.5)	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	106 (25.7)
Total	274 (66.5)	8.0 (17.6)	14.9 (14.4)	138 (45.1)	5 (8.3)	9.8 (10.5)	412

A distribuição por grupo etário está representada na Figura 4. Verificou-se uma maior frequência de adultos em 1º de Maio (Tabela 19). Relativamente à idade observou-se uma diferença significativa na frequência entre os locais ($p= 0.000$ - Teste de Mann- Whitney).

O período entre o início dos sintomas e a ida ao Centro de Saúde variou entre 1 a 7 dias (média=2.6; DP=1.3), no total de pacientes observados nos dois locais de estudo sendo que a maioria foi observada dentro dos 3 primeiros dias.

Resultados

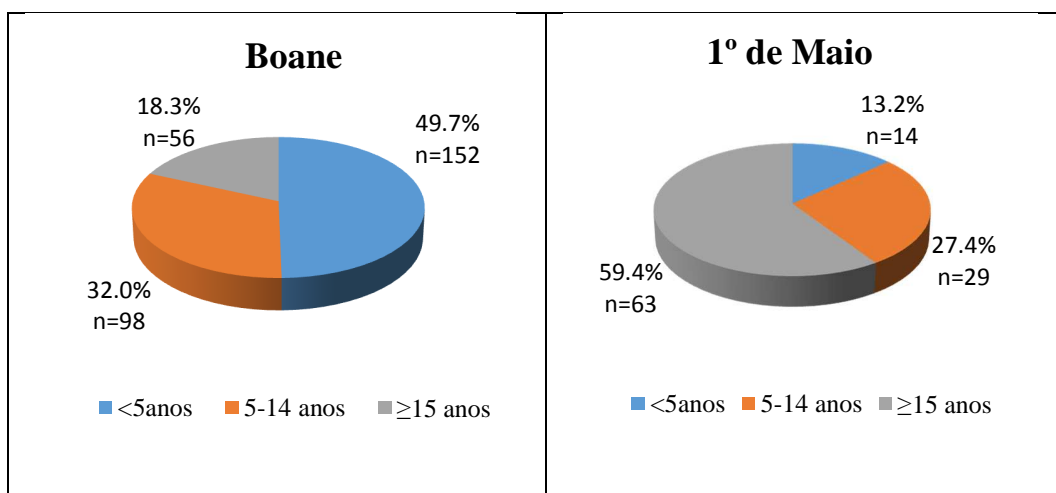


Figura 4 - Distribuição dos pacientes com malária não complicada por grupo etário em ambos Centros de Saúde (Boane e 1º de Maio). AL-arteméter-lumefantrina; ASAQ-artesunato-amodiaquina; IQR-amplitude interquartis; Desvio padrão

Apesar do diferente enquadramento geográfico nos dois locais de estudo não se registaram diferenças no intervalo entre início das queixas e a ida ao Centro de Saúde ($p > 0.05$). Também não se registou associação entre número de pacientes que referiu história de malária no último ano nos diferentes grupos etários e nos dois Centros de Saúde ($p > 0.05$).

4.1.2 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo

A febre (temperatura axilar $>37,5^{\circ}\text{C}$) foi a principal manifestação de doença, tendo sido confirmada em 82.3% dos pacientes. Seguiram-se a cefaleia, a anorexia, as mioartralgias, os vómitos ea dor abdominal (Tabela 21). Comparando os dois Centros de Saúde, verificou-se uma maior frequência de cefaleia, anorexia, dor abdominal e mioartralgias nos pacientes admitidos no 1º de Maio em relação a Boane (Tabela 21).

Resultados

Tabela 20 - Principais manifestações clínicas à admissão (D₀) dos pacientes com malária não complicada (Boane e 1º de Maio)

	Total(n=412) (%)	Boane (n=306) (%)	1º de Maio(n=106) (%)	<i>p</i>
Febre	82.3	82.4	82.1	1.000
Cefaleia	39.3	27.5	73.6	0.000
Anorexia	27.7	18.0	55.7	0.000
Mioartralgias	19.1	9.5	47.2	0.000
Vómitos	17.7	15.7	23.6	0.076
Dor abdominal	12.4	9.5	20.8	0.003
Diarreia	12.1	11.8	13.2	0.730
Desidratação	9.4	9.8	8.5	0.847
Esplenomegália	5.6	6.2	3.8	0.464
Icterícia	3.6	3.6	3.8	1.000
Hepatomegália	2.2	2.6	0.9	0.457

Na Tabela 20 são apresentados os valores observados em D₀ relativos aos principais resultados laboratoriais em Boane e 1º de Maio.

O parâmetro mais prevalente foi a anemia com 74.8% (308/412), sendo que 20.8% destes pacientes apresentavam anemia muito grave (ver classificação dos tipos de anemia, secção 3.1.5. de Material e Métodos). Em Boane registaram-se 246 (40.7%) pacientes com anemia e em 1º de Maio 62 (58.5%). A anemia ligeira foi significativamente mais prevalente ($p=0.026$) no 1º de Maio, enquanto a anemia moderada foi mais prevalente ($p=0.029$) em Boane. Relativamente à anemia grave não se registaram diferenças significativas entre os Centros de Saúde.

A trombocitopenia (ver classificação dos tipos de trombocitopenia, secção 3.1.5. de Material e Métodos) foi registada em 58.7% (242/412) do total de pacientes, não se tendo registado diferenças significativas entre os dois centros. A maioria dos pacientes (cerca de 65%) em ambos os centros apresentou trombocitopenia ligeira (Tabela 21).

Resultados

Tabela 21 - Principais parâmetros laboratoriais à admissão (D₀) nos pacientes com malária não complicada em Boane e 1º de Maio.

Parâmetros	Classificação	Total(n=41 2) %	Boane (n=306) %	1ºde Maio (n=106) %	<i>p</i>
Anemia	Ausente	25.2	19.6	41.5	0.000
	Ligeira	13.8	12.7	16.9	0.026
	Moderada	45.4	51.3	28.3	0.029
	Grave	15.6	16.3	13.2	0.726
Trombocitopénia	Ausente	41.3	41.8	36.6	0.691
	Ligeira	37.9	37.9	37.7	0.249
	Moderada	11.2	11.1	11.3	1.000
	Grave	8.7	7.8	11.3	0.311
	Muito grave	0.9	1.3	0	0.575

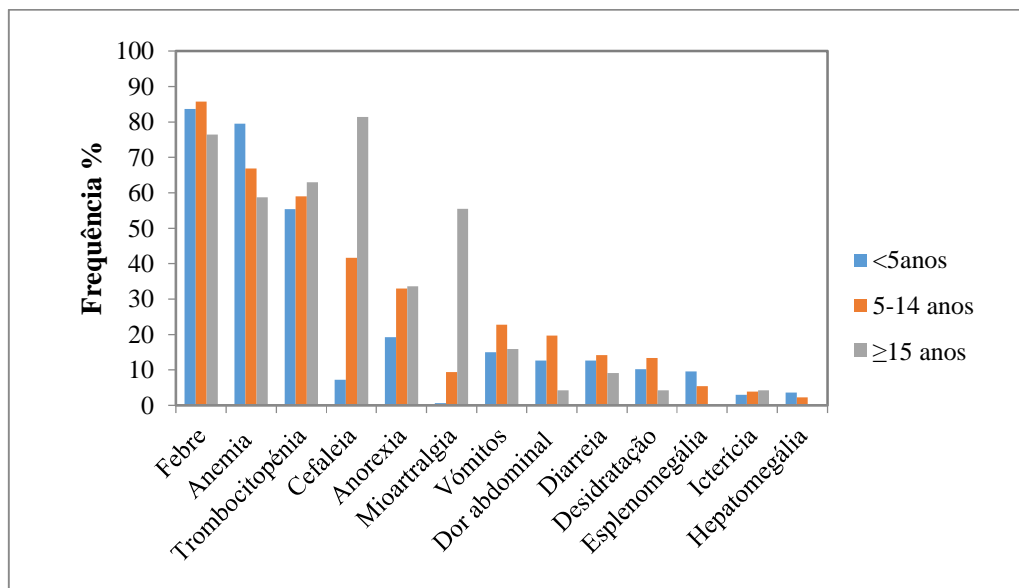
Em ambos os Centros de Saúde tanto a trombocitopénia moderada como grave apresentaram frequências aproximadas ente 7.8% e 11.3%. A forma mais grave, correspondente a contagem de plaquetas $<25 \times 10^9/l$ não foi observada em 1º de Maio.

No que respeita às densidades parasitárias, 1º de Maio foi o centro onde se registaram as densidades mais elevadas, sendo que 41,5% dos pacientes apresentavam ++++ (≥ 100.000 parasitas/ μl de sangue (ver secção 2.1.4) à admissão. Pelo contrário, em Boane a frequência deste grau de parasitémia apenas se registou em 28,8% dos pacientes e aqui a densidade mais prevalente foi de +++ (20.000 a 99.999 parasitas/ μl de sangue (ver secção 2.1.4) com 36,3% dos casos.

Quando analisado o perfil clínico dos pacientes com MnC à admissão e tendo em conta o grupo etário, verifica-se que a frequência das manifestações varia com a idade, salientando-se uma maior frequência da febre e anemia nas crianças <5 anos e da cefaleia, anorexia e mioartralgia no grupo ≥ 15 anos. Ao exame físico, a hepatomegália e esplenomegália só foram observadas nos pacientes menores de 15 anos e a icterícia foi observada em menos de 10% dos pacientes em todos os grupos (Figura 5, Anexo 6).

Resultados

Figura 5 - Frequência das principais manifestações dos pacientes com malária não complicada no dia da admissão (D₀), de acordo com o grupo etário.



4.1.3 - Evolução clínica dos pacientes com malária não complicada incluídos no estudo

A Tabela 22 ilustra o número de pacientes admitidos ao estudo (em D₀) *versus* os que terminaram o seguimento (D₁₄), dado que todos os doentes admitidos em D₀ regressaram para controlo em D₇. Dos 412 pacientes que iniciaram o tratamento em D₀, 384 (93.2%) compareceram ao controlo no D₁₄. Em 1º de Maio 18,9% (20/106) dos pacientes não compareceu para controlo em D₁₄ comparativamente a Boane onde apenas faltaram 8 (2,6%) pacientes (Tabela 22).

Todos os doentes regressaram em D₇ e D₁₄ sem sintomas de malária e sem parasitémia excepto dois. Estes pacientes, com 3 e 10 anos de idade, provenientes de Boane e que haviam sido tratados com ASAQ, regressaram em D₇ com persistência dos sintomas.

Resultados

Tabela 22 - Pacientes com malária não complicada admitidos ao estudo em D₀ versus os que terminaram o seguimento (D₁₄). D₀: dia do internamento; D₇: controlo ao 7º dia, D₁₄: controlo ao 14º dia.

Pacientes admitidos	Boane		1º de Maio	
	D0 n=306 (%)	D14 n=298 (%)	D0 n=106 (%)	D14 n=86 (%)
Sexo				
Masculino	50.0	50.7	54.7	58.1
Feminino	50.0	49.3	45.3	41.9
Grupo etário (anos)				
<5	49.7	50.3	13.2	14.0
5-14	30.0	32.2	27.3	27.7
≥15	16.3	17.5	59.5	59.3

O exame microscópico da lâmina revelou persistência da parasitemia (posteriormente confirmada pela técnica de PCR). Estes pacientes foram tratados com quinino. Nas amostras dos pacientes com parasitemia em D₇, foram efetuados marcadores de diversidade parasitária (Anexo 7) não se tendo observado diferentes genótipos de *P. falciparum* entre D₀ e D₇.

Dado que os valores de hemoglobina e a contagem das plaquetas constituem os parâmetros hematológicos de grande relevância em malária^(36, 68, 70), uma análise descritiva das médias da hemoglobina e plaquetas nas três avaliações (D₀, D₇ e D₁₄), foi efetuada aos pacientes com MnC seguidos nos dois Centros de Saúde, como forma de ilustrar a tendência em resposta ao tratamento (Anexo 8, Figura 6).

Os valores absolutos de hemoglobina e das plaquetas registados em D₀ variaram respetivamente entre 5.1 g/dl a 16.9 g/dl (média = 10.1 ± 2.3) e 12.000 a 550.000 x 10⁹/l (média = 150.000 ± 91.5). Na Figura 7 encontra-se representada a evolução destes parâmetros nas três avaliações (D₀, D₇ e D₁₄) em cada um dos grupos etários (<5 anos, 5-14

Resultados

anos e ≥ 15 anos) segundo o tratamento (AL ou ASAQ) e local do estudo (Boane ou 1º de Maio). Os valores de hemoglobina e plaquetas durante o seguimento dos pacientes em D₀, D₇ e D₁₄ mostrou uma tendência similar nos três grupos etários tanto em Boane onde foram efetuados os dois tipos de tratamento, como em 1º de Maio, onde apenas foi efectuado tratamento com AL (Figura 6).

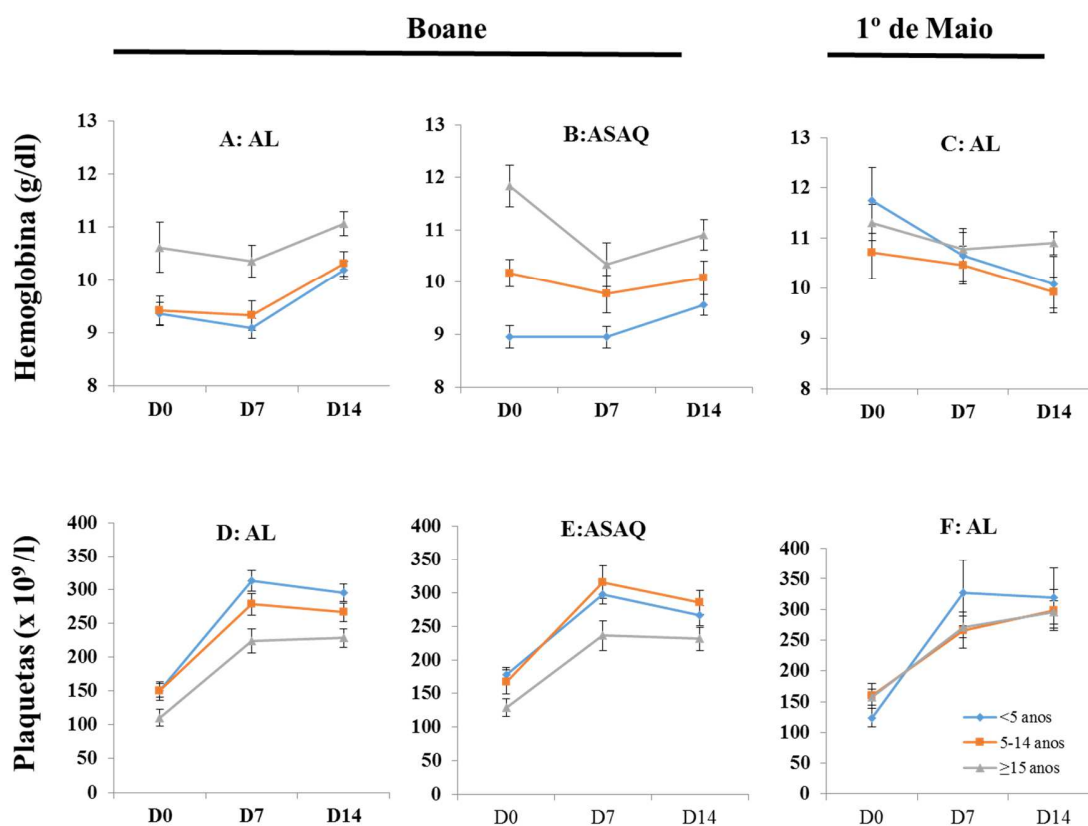


Figura 6 - Evolução dos valores médios de hemoglobina e plaquetas nas três avaliações efetuadas aos pacientes com MnC seguidos em Boane e 1º de Maio. D₀, dia do internamento; D₇, controlo ao 7º dia e D₁₄, controlo ao 14º dia. Para as observações de cada caso representa-se a média \pm erro padrão (barras de erro).

Resultados

Em Boane não foi observada diferença significativa dos valores de hemoglobina entre D0 e D7 excepto nas crianças com 15 ou mais anos tratadas com ASAQ ($p < 0.005$) (Figura 7 B). Ainda em Boane, entre D₇ e D₁₄ registou-se uma tendência de subida dos valores de hemoglobina sendo esta, apenas significativa nos doentes tratados com AL ($p < 0.005$) (Figura 6 A) e nos menores de 5 anos tratados com ASAQ ($p < 0.005$) (Figura 6, B).

Em 1º de Maio registou-se uma tendência de descida dos valores de hemoglobina entre D0 e D₁₄ para todos os grupos etários, excepto nos doentes com ≥ 15 anos entre D₇ e D₁₄ onde se registou uma tendência (não significativa) para a recuperação dos valores de hemoglobina (Figura 6, C).

Relativamente à média da contagem de plaquetas, a tendência na recuperação foi idêntica em todos os grupos etários, tratamento e local de admissão dos pacientes ($p < 0.005$) (Figura 6 D, E e F), tendo sido registada uma subida significativa entre D₀ e D₇ (atingindo valores fisiológicos) seguida de estabilização dos valores entre D₇ e D₁₄ ($p < 0.005$) (Figura 6 D, E e F).

De seguida, nos pacientes com MnC seguidos em Boane, foi efetuada uma análise descritiva das médias da hemoglobina e plaquetas nas três avaliações (D₀, D₇ e D₁₄) e nos três grupos etários (<5 anos, 5-14 anos e ≥ 15 anos) como forma de ilustrar a tendência em resposta a cada um dos dois tratamentos ACT usados, AL e ASAQ. Esta análise foi efetuada separadamente nos diferentes grupos (Anexo 8, Figura 7).

A evolução dos valores de hemoglobina e plaquetas seguiu uma tendência idêntica para ambos os tratamentos (AL ou ASAQ) nos três grupos etários (<5 anos, 5-14 anos e ≥ 15 anos) (Figura 7). No grupo <5 anos verificou-se uma descida não significativa dos valores de hemoglobina, entre D₀-D₇ e uma subida significativa entre D₇-D₁₄ ($p = 0.000$) tanto nos pacientes tratados com AL, como nos tratados com ASAQ ($p = 0.012$). No grupo entre 5-14 anos verificou-se uma descida não significativa da hemoglobina entre D₀-D₇ em ambos os tratamentos e uma subida entre D₇-D₁₄ que foi significativa ($p = 0.000$) para o grupo de pacientes tratados com AL. No grupo etário ≥ 15 anos, verificou-se uma descida da hemoglobina entre D₀-D₇, significativa ($p = 0.011$) para o grupo de pacientes tratados com

Resultados

ASAQ e uma subida entre D7-D14, que foi significativa para o grupo tratado com AL (p=0.015).

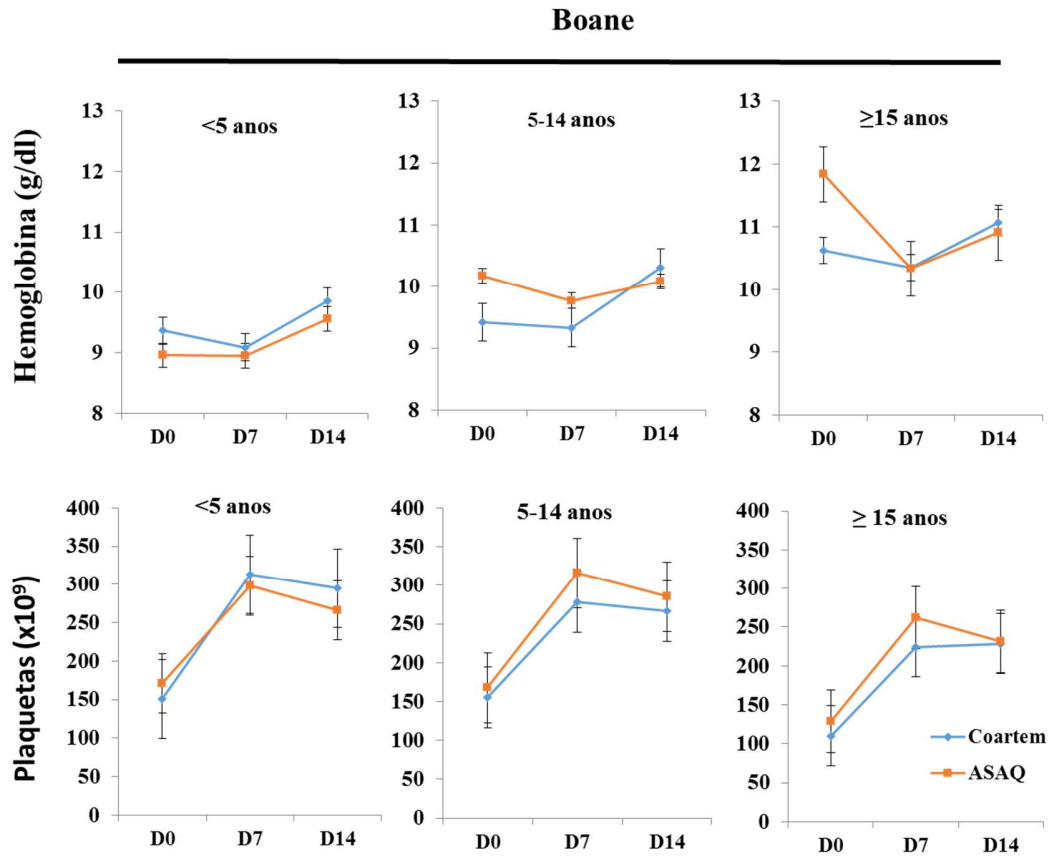


Figura 7 - Evolução dos valores de hemoglobina e plaquetas nas três avaliações efetuadas aos pacientes com MnC seguidos em Boane. D₀, dia do internamento; D₇, controlo ao 7º dia e D₁₄, controlo ao 14º dia. Para as observações de cada caso representa-se a média ± erro padrão (barras de erro).

Resultados

4.2 - Estudo da malária grave

O estudo dos pacientes com malária grave (MG) foi realizado no Serviço de Urgências do Departamento de Pediatria do Hospital Central do Maputo durante os meses de Fevereiro e Março de 2012. Com base nos critérios estabelecidos pela OMS para a definição de MG (secção 1. 5.2), foram incluídos neste estudo 129 pacientes com idades entre os 8 meses e os 14 anos, provenientes diretamente do domicílio ou referidos de outras unidades sanitárias da cidade ou província de Maputo.

4.2.1 - Características dos pacientes incluídos no estudo

As características dos pacientes com MG incluídas no estudo encontram-se resumidas na Tabela 23.

Tabela 23 - Características dos pacientes com malária grave incluídos no estudo da malária grave.

		n=129
		%
Idade (anos)	<5	60.5
	≥ 5	39.5
	Média (DP)	4,5 (3.1)
Sexo	Masculino	63.6
	Feminino	36.4
Proveniência	Domicílio	55.0
	da cidade	36.4
	da província	36.4
Início dos sintomas	≤ 3 dias	79.1
	>3 dias	20.9
	Média (DP)	3 dias (1.8)
Tratamento prévio	Nenhum	16.3
	Antipiréticos	58.9
	Tratamento tradicional	21.7
	Antibiótico	3.1

Resultados

Oitenta e duas crianças eram do sexo masculino e 47 do sexo feminino, com a seguinte distribuição etária: 78 menores de cinco anos e 51 entre 5 e 14 anos. Do total, 55.4% provinham de casa e as restantes vinham referidas de outras unidades sanitárias da cidade e província de Maputo. O período entre o início das manifestações e a procura de cuidados de saúde variou entre 1 a 9 dias (média = 3 ± 1.8), sendo que 102 dos 129 pacientes foram observados por um profissional de saúde dentro dos primeiros 3 dias após o início dos sintomas. Cerca de 22% dos pacientes apresentaram história de tratamento tradicional prévio, com substâncias de natureza não especificada. Nenhum paciente tinha história de tratamento anti-malárico convencional.

4.2.2 - Frequência das manifestações definidoras de malária grave nos pacientes em cada um dos grupos etários.

Na Tabela 25 é apresentada a frequência das manifestações definidoras de MG nos pacientes admitidos, em cada um dos grupos etários em D₀. As principais manifestações foram a prostração (94.6%) e a dificuldade na alimentação (90.7%), seguidas de alteração do estado de consciência (Glasgow²<15) em 55.8% e anemia grave em 38.8%. Vinte e quatro por cento dos pacientes apresentaram sinais de coma não despertável (Glasgow<11), compatível com o diagnóstico de malária cerebral (MC). Cerca de metade dos pacientes com convulsões múltiplas (53%) apresentaram Glasgow inferior a 11 nas 1^{as} 24 horas (p=0.000).

A desidratação foi uma manifestação frequente observada em 41.0% (53/129) das crianças. Embora com uma frequência inferior a 20%, a dispneia, hepatomegalia, esplenomegália e icterícia foram também identificadas nestes pacientes. O sangramento massivo espontâneo como complicação da malária foi observado em um paciente. Não foram recolhidos registos sobre a avaliação do estado ácido-base.

²A escala de Glasgow, é uma escala neurológica que permite medir/avaliar o nível de consciência de um indivíduo. Avalia vários parâmetros aos quais se atribuem pontuações que variam entre 3 e 15, sendo que valores abaixo de 11 correspondem a coma (secção 2.2.3).

Resultados

Quando analisadas por grupo etário, as manifestações clínicas e laboratoriais definidoras de MG identificadas (Tabela 24), com exceção da alteração da consciência, não apresentaram uma associação estatisticamente significativa com os grupos etários analisados ($p=0.007$).

Tabela 24 - Manifestações definidoras de MG apresentadas pelas crianças admitidas ao estudo em D₀.

	Total (n=129) %	<5 anos (n=78) %	≥ 5 anos (n=51) %	<i>p</i>
Prostração	94.6	97.4	80.4	0.112
Dificuldade na alimentação	90.7	89.7	92.1	0.763
Alteração da consciência (Glasgow<15/15)	55.8	36.5	70.6	0.007
Anemia (Hgb<5 gr/dl)	38.8	41.0	35.3	0.581
Malária cerebral (MC) (Glasgow<11)	23.2	21.8	27.5	0.529
Convulsões múltiplas (≥2/24 horas)	23.2	29.5	13.8	0.054
Dificuldade respiratória	19.4	24.4	11.7	0.11
Icterícia	10.0	9.0	11.7	0.766
Hipoglicémia (<2.2 mmol/l)	6.2	7.7	3.9	0.478
Sangramento massivo espontâneo	0.7	100	0.0	1.000
Hemoglobinúria	0.0	0.0	0.0	<i>n.a</i>
Insuficiência renal	0.0	0.0	0.0	<i>n.a</i>
Colapso ou choque circulatório	0.0	0.0	0.0	<i>n.a</i>
Edema pulmonar (radiológico)	0.0	0.0	0.0	<i>n.a</i>

4.2.3 - Principais manifestações que levaram à procura de cuidados de saúde dos pacientes com malária grave.

As principais causas de procura de cuidados de saúde das crianças admitidas ao estudo foram a febre que foi referida por 100% dos pacientes, tendo posteriormente sido confirmada em 89.1% dos casos, seguindo-se a prostração em 94.6% e a dificuldade na alimentação em 90.7%. Mais de metade dos pacientes 56.6% queixaram-se de pelo menos um episódio convulsivo. Os vômitos, a diarreia e a dor abdominal foram referidos respetivamente por 60.5%, 43.4% e 20.9% dos pacientes. A tosse foi referida em 20.2% dos casos enquanto a cefaleia e as mioartralgias foram as queixas menos prevalentes (Figura 8).

Resultados

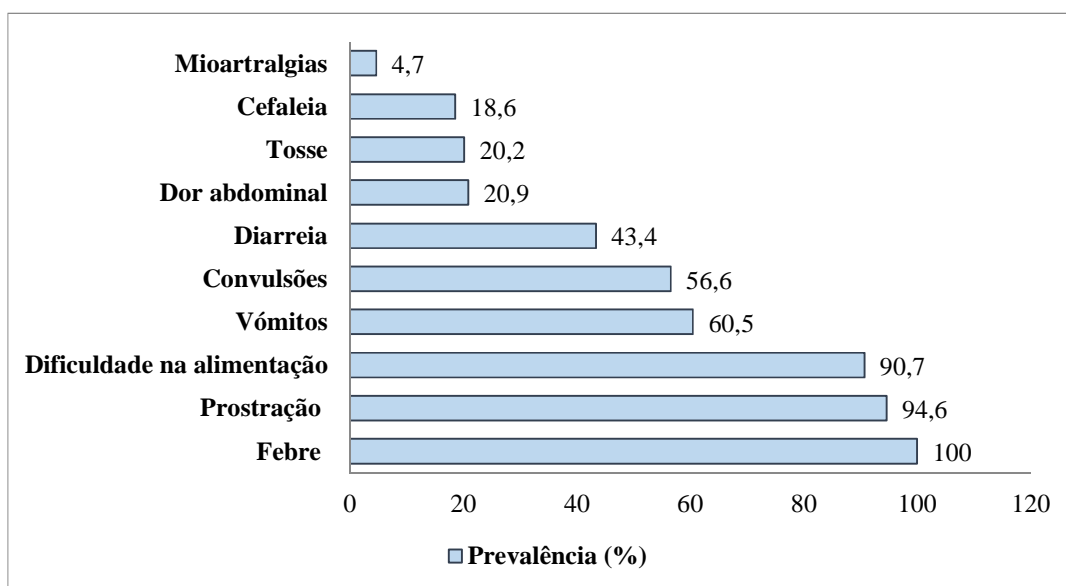


Figura 8 - Principais causas da procura de cuidados de saúde nos pacientes com malária grave admitidos ao estudo.

4.2.4 - Estudo dos achados laboratoriais nos pacientes com malária grave durante o internamento.

4.2.4.1 - Achados hematológicos e bioquímicos em D₀ e em D₃ nos pacientes com malária grave

A frequência dos achados laboratoriais na malária grave (MG) é apresentada na Tabela 25. À admissão (D₀), a maior parte dos pacientes apresentou-se com parasitêmias entre 2 e 3 cruzes (respectivamente entre 5.000-19.999 e 20.000-99.999 parasitas/ μ l de sangue) e cerca de 22% tinha mais de 4 cruzes (\geq 100.000 parasitas/ μ l de sangue). Dos 129 incluídos, 10 pacientes (8%), tinham 1 cruz (1-4.999 parasitas/ μ l de sangue), um dos quais resultou em óbito nas primeiras 24 horas.

Resultados

Tabela 25 - Frequência dos achados laboratoriais em D₀ e em D₃ nos pacientes com malária grave. * Sem avaliação em D₃

Resultado		D0 (n=129) %	D3 (n=124) %
Densidade parasitária	+	7.8	3.2
	++	34.9	1.6
	+++	31.8	0.0
	++++	25.5	0.0
Anemia	Ausente	7.8	14.5
	Ligeira	10.9	19.4
	Moderada	23.3	46.7
	Grave	19.4	19.4
	Muito grave	38.6	0.0
Trombocitopénia	Ausente	16.2	12.9
	Ligeira	33.3	62.9
	Moderada	23.3	17.7
	Grave	23.3	6.5
	Muito grave	3.9	0.0
Outros parâmetros laboratoriais	Macrocitose	78.3	78.2
	Leucocitose	20.9	6.5
	Leucopenia	3.8	0.8
	Hiperbilirrubinémia conjugada	3.8	*
	Hiperbilirrubinémia não conjugada	23.3	*
	Aumento da AST	13.2	*
	Aumento da ALT	8.5	*
	Aumento da ureia	25.6	3.2
	Aumento da Creatinina	0.0	0.0
	Hematúria	6.2	*
Proteinúria	2.3	*	

A maior parte dos pacientes (92.2%) apresentou anemia, sendo a anemia muito grave (Hgb<5g/dl; secção 3.1.5) o tipo mais prevalente, registado em cerca de 40% dos pacientes. A trombocitopénia foi observada em 83.8% dos pacientes. Destes, cinco pacientes (3.9%) apresentaram trombocitopénia muito grave (secção 3.1.5). Um único paciente desenvolveu um quadro de sangramento espontâneo agudo e resultou em óbito nas primeiras 24 horas. Neste paciente o valor de plaquetas registado foi de 82.000 x 10⁹/l. O aumento do volume plaquetário médio foi observado em 78.3% dos pacientes. Relativamente à função hepática registou-se uma hiperbilirrubinemia predominantemente não conjugada em 85.7% dos pacientes. O aumento das transaminases (AST e ALT) foi registado respetivamente em

Resultados

13.2% (17/129) e 8.5% (11/129) dos casos, sendo que em nenhum caso o valor máximo foi superior ao triplo do valor normal de referência. O aumento dos níveis de ureia plasmática foi observado em 25.6% dos pacientes, com um valor máximo de 12 mmol/l. Em relação à creatinina, não foram registados valores acima do intervalo normal. A hematúria e a proteinúria apresentaram frequências abaixo de 10%.

4.2.4.2 - Evolução do grau de parasitémia nos pacientes com malária grave durante o internamento

Durante o período de internamento foi efetuada uma avaliação das parasitémias aos pacientes nos quais foi possível obter resultados para uma análise sequenciada. Em 47 pacientes foi possível recolher informação referente a D₀, D₁, D₂, D₃ e D₇, cujos resultados são apresentados na Figura 9A. Analisando apenas os dias D₀, D₃ e D₇ foi possível recolher dados referentes a 114 pacientes (Figura 9B). Em D₃, 5 pacientes ainda apresentavam parasitémia positiva e no dia 7 todos os avaliados foram negativos.

Resultados

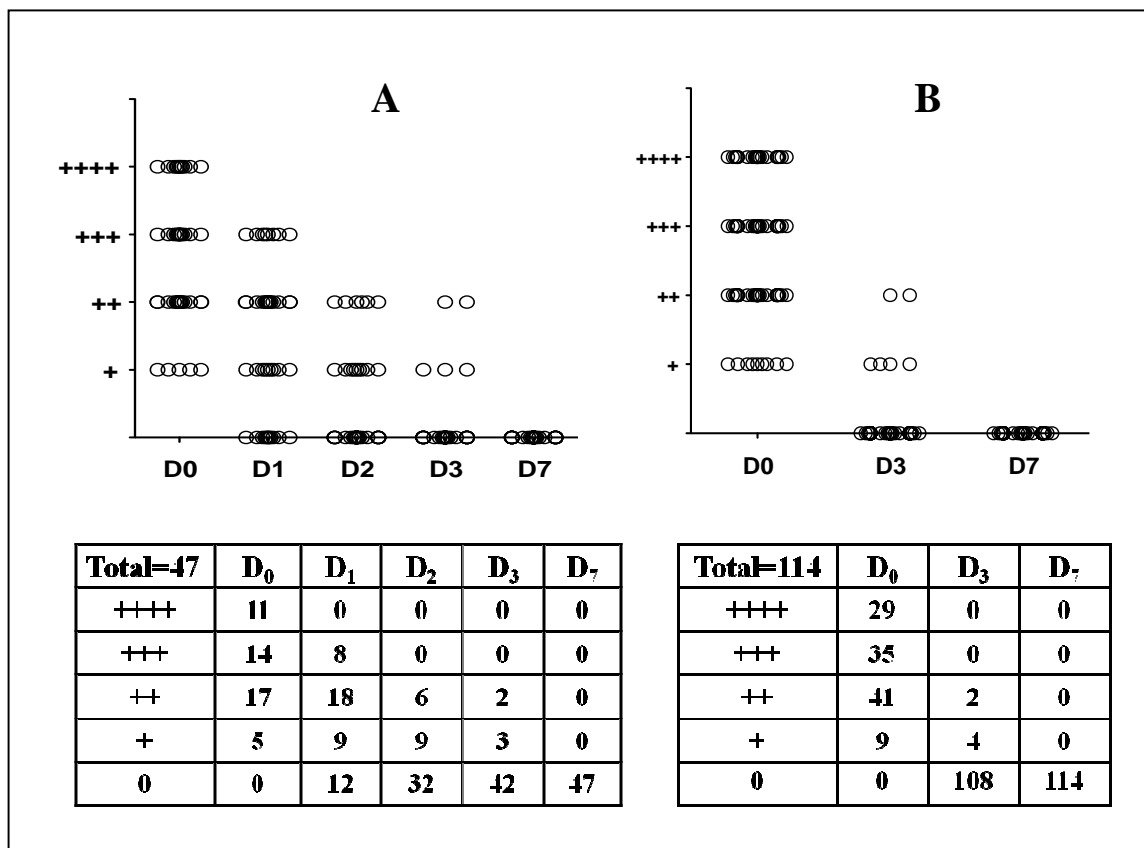


Figura 9 - Evolução da parasitêmia dos pacientes com malária grave durante o período de internamento (A- resultados dos pacientes avaliados em D₀, D₁, D₂, D₃ e D₇; B- resultados dos pacientes avaliados em D₀, D₃ e D₇).

4.2.4.3 - Avaliação dos parâmetros hematológicos em diferentes graus de parasitêmia

De acordo com alguns autores⁽²⁹¹⁾, algumas alterações hematológicas características da infecção pelo *Plasmodium* são influenciadas pela densidade parasitária. Assim, foi efetuada uma comparação entre os diferentes níveis de parasitêmia apresentados pelos pacientes com malária grave em D₀ e os respectivos parâmetros hematológicos estudados. Os valores na Tabela 26 representam a mediana das avaliações para cada parâmetro. Nos pacientes deste estudo com MG não foram encontradas alterações significativas entre as diferentes densidades parasitárias e os valores dos parâmetros hematológicos em D₀ (Tabela 26).

Resultados

Tabela 26 - Parâmetros hematológicos em diferentes níveis de parasitemia

	Parasitemia			
	+	++	+++	++++
Hgb (g/dl)	6,2500	5,2000	7,8000	6,0000
HCT (%)	18,250	16,800	25,100	18,900
MCV (fl)	77,7500	78,7000	78,3000	77,0000
MCH (pg)	24,9500	24,7000	25,2000	25,6000
MCHC (g/dl)	32,6500	32,1000	32,0000	32,7000
RDWcv (%)	16,3000	16,4000	16,2000	16,3000
Plaquetas (x10 ⁹ /l)	71,00	83,00	56,00	68,00
MPV (fl)	10,1000	9,8000	9,4000	9,6000
PDW	13,3500	13,1000	12,8000	13,5000
Leucócitos totais (x10 ⁹ /l)	7,4500	8,7000	8,2000	9,7000
Neutrófilos (x10 ⁹ /l)	3,8000	4,4000	4,0000	5,5000
Linfócitos (x10 ⁹ /l)	3,2000	2,3000	2,3000	2,3000
Mix (x10 ⁹ /l)	1,1500	0,8000	0,6000	0,8000

4.2.5 - Evolução do estado de consciência dos pacientes com malária grave

A avaliação do nível de consciência dos pacientes internados com malária grave está representada na Figura 10. Verifica-se que com exceção de um paciente, dos 124 pacientes que recuperaram da malária, todos os restantes apresentavam-se ao 5º dia um nível de consciência normal (Glasgow score 15/15).

Resultados

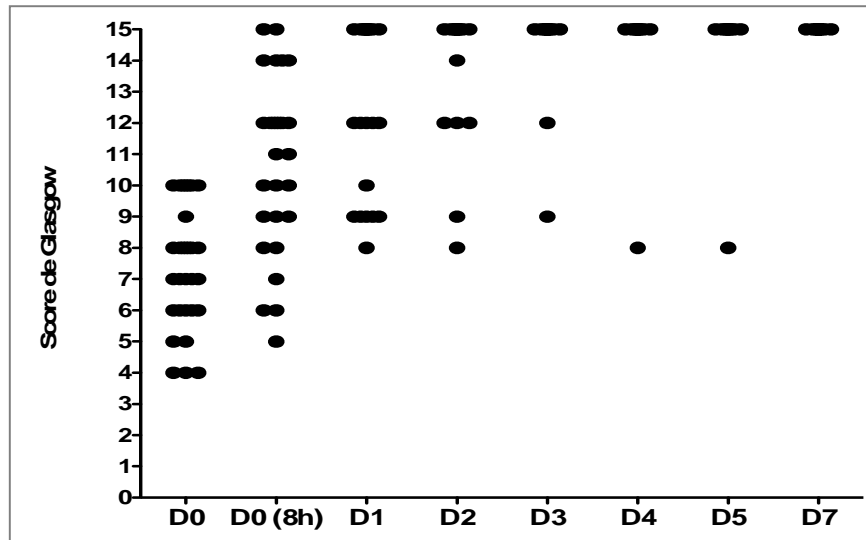


Figura 10 - Evolução do estado de consciência dos pacientes com malária grave determinado pela escala de Glasgow (*Glasgow score*).

4.2.6 - Estudo dos pacientes com malária cerebral

No grupo de pacientes internados com MG, 30 (23.3%) tiveram o diagnóstico de malária cerebral (MC), 70% dos quais foram do sexo masculino. Do total, 56.7% tinham menos de 5 anos e 43.3% entre 5 e 14 anos. Neste grupo dos doentes com MC foram registados 5 óbitos, tendo todos ocorrido em crianças menores de 5 anos e nas primeiras 24 horas após o internamento. A Tabela 27 apresenta a frequência dos achados laboratoriais à admissão nos pacientes com MC.

Resultados

Tabela 27 - Frequência dos achados laboratoriais à admissão e 3 dias após internamento em pacientes com malária cerebral. *Sem avaliação em D3; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase.

Resultado		D0 (n=30)	D3 (n=25)
		%	%
Densidade parasitária	+	10.0	12.0
	++	36.7	8.0
	+++	40.0	0.0
	++++	13.3	0.0
Anemia	Ausente	10.0	44.0
	Ligeira	3.3	28.0
	Moderada	43.4	20.0
	Grave	20.0	24.0
	Muito grave	23.3	4.0
Trombocitopénia	Ausente	16.7	44.0
	Ligeira	40.0	40.0
	Moderada	26.6	16.0
	Grave	16.7	0.0
	Muito grave	0.0	0.0
Outros parâmetros laboratoriais	Macrocitose	83.3	80.0
	Leucocitose	19.4	0.0
	Leucopenia	0.0	0.0
	Hiperbilirrubinémia conjugada	19.4	*
	Hiperbilirrubinémia não conjugada	9.7	*
	Aumento da AST	22.6	*
	Aumento da ALT	16.1	*
	Aumento da ureia	25.6	7.6
	Aumento da creatinina	0.0	0.0
	Hematúria	9.7	*
	Proteinúria	6.5	*

Resultados

4.2.7 - Estudo do polimorfismo na posição 371 do gene *RNAse3* potencialmente associado à gravidade da doença.

A malária cerebral é o resultado mais grave da infeção por *P. falciparum* e uma das principais causas de morte em crianças com menos de cinco anos de idade. O presente estudo teve como objetivo estudar a possível associação entre o polimorfismo G371C e a ocorrência de MG e/ou CM num grupo de crianças de Maputo (Anexo 9). Foi incluído um grupo controlo de 46 pacientes com malária não complicada (MnC). Na Tabela 28 encontram-se descritas as características gerais dos pacientes incluídos no estudo do polimorfismo do gene *RNAse3*.

Tabela 28 - Características gerais dos pacientes incluídos no estudo do polimorfismo do gene *RNAse3*. MC: malária cerebral; MG: outros critérios de malária grave; MnC: malária não complicada; Hgb: hemoglobina; *número e percentagem de pacientes com anemia muito grave (hemoglobina <5g/dl); DP: desvio padrão em relação à média.

	MC (n=30)	MG (n=99)	MnC (n=46)
Idade (anos)	4.8 (DP=3.8)	4.4 (DP=2.9)	4.9 (DP=2.6)
Sexo masculino	21 (70%)	62 (62.6%)	25 (54.3%)
Hgb (g/dl)	7.7 (DP=2.6)	6.7 (DP=2.9)	9.3 (DP=1.7)
Anemia grave (Hgb <g/dl)	7 (23.3%)	44 (44.4%)	na
Score Glasgow	7.4 (DP=1.9)	14.1 (DP=1.2)	15 (DP=0.0)
Genótipo <i>RNAse3</i> (%)			
CC	36.7%	40.4%	47.8%
CG	40.0%	49.5%	34.8%
GG	23.3%	10.1%	17.4%

Resultados

Os pacientes com MnC, MG e MC, incluídos nesta parte do estudo constituem parte da amostra de pacientes incluídos nas secções 3.1.2. e 3.2.2 do nosso trabalho. As características dos grupos MC, MG, MnC, os valores de score Glasgow e a ocorrência do polimorfismo G371C, foram comparadas pelo teste de Mann Whitney. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se $p < 0.05$. No total 129 pacientes foram classificados como portadores de malária grave ou cerebral (MG ou MC) no momento da admissão (D_0) e tipados com sucesso para a posição 371 do gene *RNAse3*. Os pacientes com MG e/ou MC tinham idade compreendida entre 0.75-14 anos (média de 4.5 ± 3.1) e o grupo de pacientes com MnC entre 2-12 anos (média de 4.9 ± 2.6). Entre os pacientes com malária grave (MG), 30 apresentavam critérios de malária cerebral (MC) (score Glasgow < 11), os restantes 99 tinham outros critérios de malária grave (OMS, 2010) (secção 1.4.2). A idade dos pacientes para cada um dos 3 grupos (MG, MC e MnC) variou entre 0.75 e 14 anos, sendo que as médias foram idênticas (ANOVA, $p=0.395$) nos 3 grupos (Tabela 28). Como esperado, o genótipo GG foi relativamente mais prevalente nos pacientes com MC do que nos pacientes com MG ($p=0.049$) ou com MnC ($p=0.376$) embora não tenha atingido significância estatística.

Assim, mesmo os pacientes que apresentavam MG e/ou MC e com genótipo homozigótico GG ($n=17$), apresentaram um *score* Glasgow mais baixo que os portadores do genótipo CC ($n=51$) (Figura 11), embora esta relação não tenha alcançado significância no teste de Mann-Whitney ($p = 0.195$).

Do total de 129 pacientes diagnosticados com MG e/ou MC no momento da admissão (D_0), 51 (39.5%) apresentavam anemia grave (AG), com uma média de 4.3 ± 0.9 g/dl de hemoglobina. O genótipo GG foi menos prevalente nos pacientes com AS do que nos pacientes sem AS ($p=0.747$).

Resultados

4.3 - Estudo de polimorfismos genéticos de *P. falciparum* associados à resposta aos ACTs em Maputo.

4.3.1 - Frequência de polimorfismos no gene *pfmdr1*.

O estudo da frequência dos polimorfismos genéticos no gene *pfmdr1* (N86Y, Y184F e D1246Y) associados à resposta aos ACTs foi realizado mediante análise do ADN isolado a partir das amostras de sangue recolhidas de pacientes participantes nos estudos referidos nas secções 3.1.2 e 3.2.2. As amostras de ADN incluídas foram extraídas de sangue colhido antes do tratamento antimalárico, pelo que não se considerou relevante analisar em separado as amostras provenientes de pacientes tratados com AL e com ASAQ. O número de amostras, bem como a frequência relativa de cada polimorfismo encontram-se discriminados por grupo de pacientes no Anexo 10. As amostras foram analisadas separadamente por local de proveniência (Boane ou 1º de Maio); por gravidade da doença (MnC ou MG) e finalmente em conjunto.

No que respeita ao grupo de pacientes com MnC (secção 3.1.2), a frequência dos polimorfismos N86Y, Y184F e D1246Y foi idêntica nas amostras provenientes de Boane e do 1º de Maio (Figura 12).

Resultados

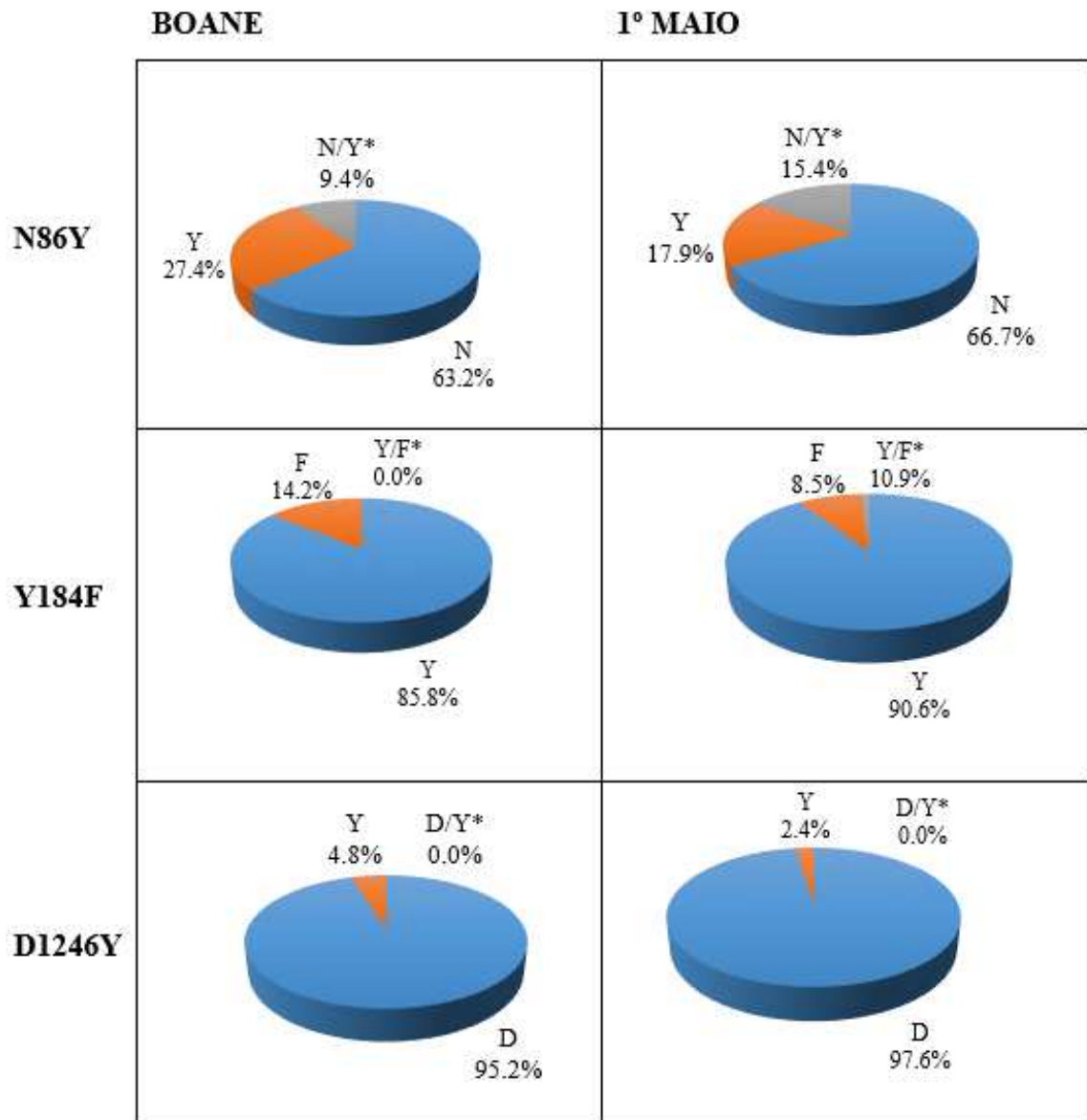


Figura 12 - Representação gráfica da frequência dos polimorfismos no gene *pfmdr1* em doentes com malária não complicada, analisada separadamente em amostras provenientes de Boane e 1º de Maio.* infecções mistas.

Resultados

No que respeita ao grupo de pacientes com MG (secção 3.2.2), foram analisadas 139 amostras de ADN, nas quais só foram pesquisados os polimorfismos nos codões 86 e 1246 (Figura 13). Em relação ao codão 1246 não foi detectado o alelo 1246Y simples ou em infeção mista com 1246D, provavelmente devido ao facto da sua frequência ser baixa (como observado na Figura 13) e apenas terem sido analisadas 30 amostras para o mesmo.

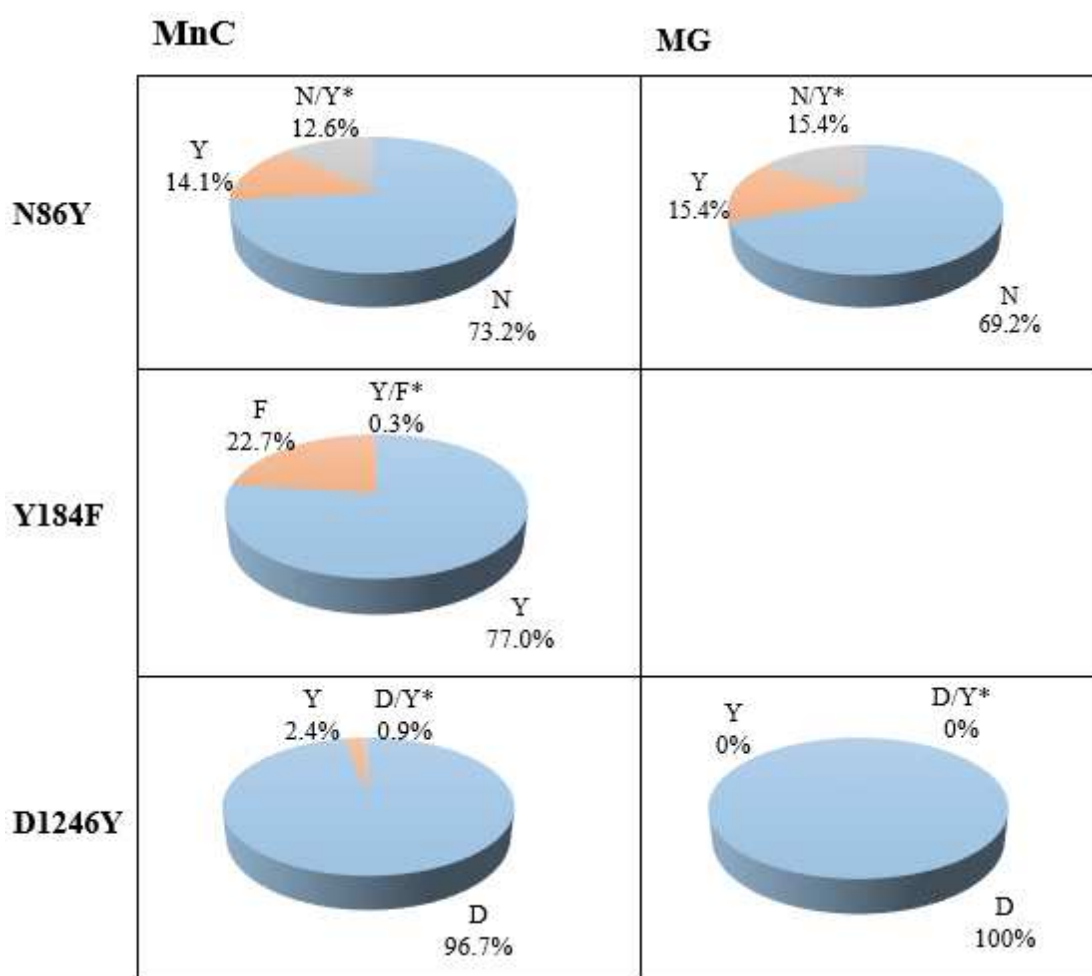


Figura 13 - Representação gráfica da frequência dos polimorfismos no gene *pfmdr1* analisada separadamente em amostras provenientes de doentes com malária não complicada e malária grave. MnC, malária não complicada; MG, malária grave*

Resultados

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa (teste de X^2 ; $p < 0.05$ para $\alpha = 0.05$) na frequência dos polimorfismos N86Y e D1246Y entre o grupo de pacientes com MnC e o grupo com MG (Anexo 8).

No geral a frequência dos polimorfismos no gene *pfmdr1* em Maputo encontra-se resumida na Figura 14. A identificação dos polimorfismos N86Y, Y184F e D1246Y foi realizada por PCR-RFLP. Devido a problemas experimentais e técnicos, nem sempre se obtiveram resultados para todas as amostras. Assim, do total de amostras analisadas o sucesso de amplificação e análise foi respectivamente de 96.5%, 72.4 e 76.5 para os codões 86, 184 e 1246. Neste estudo o polimorfismo N86 (selvagem) do gene *pfmdr1* encontrado em 72.1% das amostras foi o mais prevalente. Contrariamente, o alelo mutante 86Y foi encontrado em proporção mais baixa quer isoladamente (14.5%) ou em infeção mista com o N86 (13,5%). Em relação ao polimorfismo Y184F, nas 348 amostras analisadas para este codão apenas foi identificada infeção mista em uma amostra, sendo a proporção de amostras com alelo mutante, cerca de 1/3 das amostras com alelo selvagem (77%). Das 367 amostras analisadas para o codão 1246, 3 eram infeções mistas (0.8%), 8 apresentavam a forma mutante 1246Y e as restantes 268 (97.8%) possuíam o alelo selvagem 1246D. Assim, em Maputo, em amostras de *P. falciparum* isoladas após a introdução dos ACTs como primeira linha de tratamento no País, observamos uma elevada frequência dos alelos selvagens N86 e D1246 e moderada do alelo mutante 184F (Figura 14).

Resultados

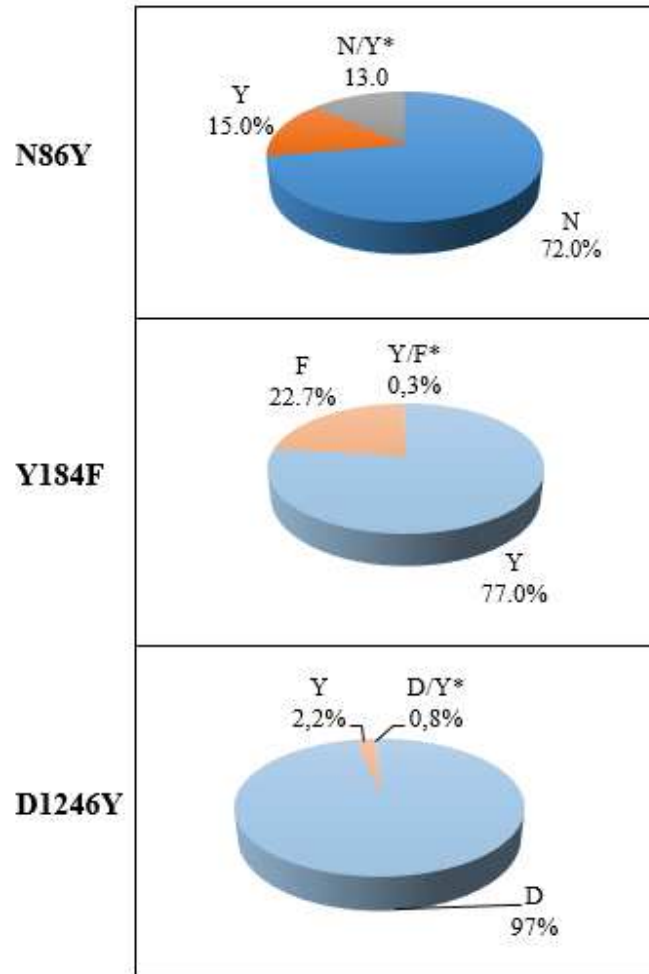


Figura 14 -Representação gráfica da frequência dos polimorfismos N86Y, Y184F e D1246Y no gene *pfmdr1* em Maputo.*infeções mistas.

Dado que a presença do haplótipo N86-184F-D1246 tem vindo a ser associada à resposta aos ACTs, de seguida analisamos a frequência dos diferentes haplótipos no gene *pfmdr1*. A frequência dos haplótipos foi analisada com base em grupos de dois (86/184, 86/1246, 184/1246) e de três codões (86/184/1246). Os resultados desta análise estão representados na Tabela 29. As infeções mistas foram excluídas na análise de haplótipos.

Resultados

Tabela 29 - Frequência de haplótipos de *pfmdr1* nos codões N86Y, Y184F e D1246Y em Maputo após a introdução dos ACTs (2010-2012).

Codão	Haplótipo	Frequência %
86/184 (n=293)	NF	28.6
	YF	0.4
	NY	70.2
	YY	16.0
86/1246 (n=309)	ND	82.2
	NY	0.3
	YD	15.9
	YY	1.6
184/1246 (n=330)	FY	0.0
	FD	23.3
	YY	2.4
	YD	74.2
86/184/1246 (n=282)	NYD	59.2
	NFD	24.8
	NYY	0.4
	NFY	0.0
	YYY	1.8
	YFD	0.4
	YFY	0.0
	YYD	13.5

Na análise com base em dois codões verifica-se que os haplótipos contendo os alelos selvagens N86-Y184 (70.2%), N86-D1246 (82.2%) e Y184-D1246 (74.2%) apresentam uma frequência muito superior destacando-se das restantes combinações (Tabela 29). Embora em menor percentagem, todas as combinações estão representadas, excepto o haplótipo com ambos os alelos mutantes 184F-1246Y.

Na análise dos haplótipos com base em 3 codões manteve-se a tendência para uma maior frequência da combinação do haplótipo contendo os alelos selvagens N86-Y184-D1246 (cerca de 60%) seguida no entanto (em 24.8%), da combinação de alelos associada a uma

Resultados

elevada capacidade de suportar altas concentrações de lumefantrina por parte do *P. falciparum* o haplótipo N86-184F-D1246 (Tabela 29).

4.3.2 - Estudo comparativo da frequência dos polimorfismos N86Y, Y184F e D1246Y no gene *pfmdr1* em Maputo antes e depois da introdução dos ACTs

O alelo mutante 86Y (associado à resistência à cloroquina) apresentou uma baixa frequência e o alelo mutante 184F uma elevada frequência (1/4 dos isolados) (Tabela 30). Estes resultados estão de acordo com o que vem sendo referido por outros autores recentemente ^(170, 198, 199, 292-299), indicando que a introdução dos ACTs pode estar a alterar as frequências destes polimorfismos. Assim, foi efectuado um estudo comparativo da frequência dos polimorfismos antes e depois da introdução dos ACTs em Moçambique. Para isso recorremos ao banco de amostras do Laboratório de Malária do IHMT, de onde seleccionamos um grupo de amostras de ADN de um estudo realizado anteriormente em Maputo, cujos resultados se encontram publicados ⁽²⁸²⁾.

Para o estudo comparativo da frequência dos polimorfismos N86Y, Y184F e D1246Y no gene *pfmdr1* em Maputo antes e depois da introdução dos ACTs foram incluídas no total 133 amostras colhidas entre 2003 e 2005 e 480 amostras colhidas entre 2010 e 2012 provenientes de pacientes com malária por *P. falciparum*. As amostras correspondentes ao período 2003-2005 encontravam-se genotipadas para os codões 86 e 1246. O codão 184 foi genotipado durante o presente trabalho. A frequência de SNPs individuais nos codões 86, 184 e 1246 em 2003-2005 e 2010-2012, incluindo as infeções mistas, é apresentada na Figura 15. Em 2010-2012 as infeções mistas foram menos frequentes, tendo-se registado uma diminuição de 58% em infeções mistas para o codão 86 e mais de 80% para os codões 184 e 1246.

Resultados

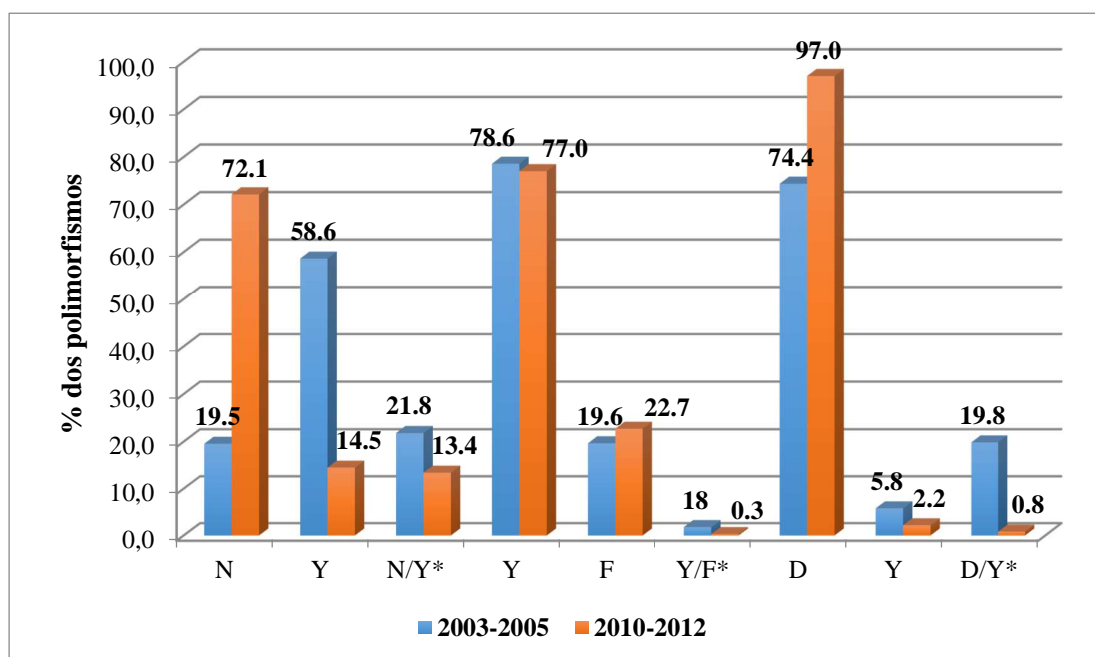


Figura 15 - Frequência dos polimorfismos nos codões 86, 184 e 1246 do gene *pfmdr1* antes e depois da introdução dos ACTs em Moçambique. * infecções mistas.

Verifica-se que o alelo do tipo selvagem N86 recuperou em frequência de 19.5% em 2003-2005 para 72.1% em 2010-2012. Embora menos acentuadamente o alelo selvagem D1246 também sofreu aumento em frequência (22,6%) em 2010-2012 em relação ao período antes da introdução dos ACTs (2003-2005). Na posição 184 o alelo selvagem sofreu um ligeiro decréscimo na frequência de 78.6% para 77.0% após a introdução dos ACTs (Figura 15).

Para examinar a significância da variação temporal das frequências dos SNPs nos codões 86, 184 e 1246, as infecções mistas foram analisadas em conjunto com o polimorfismo não associado com a tolerância aos ACTs, ou seja, o alelo 86Y foi analisado em conjunto com as infecções mistas NY, o alelo Y184 com as infecções YF e o alelo 1246Y com as infecções DY (Figura 16). Assim, verificamos que os alelos do tipo selvagem N86 e D1246 sofreram um aumento significativo em frequência após a introdução dos ATCs em Maputo de 19.5% para 72.1% ($p < 0,000$) e de 74.4% para 97.0% ($p < 0,000$) respectivamente. Quanto ao mutante da posição 184 (184F) associado com a tolerância aos ACTs, embora a frequência

Resultados

tenha subido ligeiramente após a introdução dos ACTs (de 19.5% para 22.7%) esse aumento não atingiu níveis estatisticamente significativos ($p=0.609$).

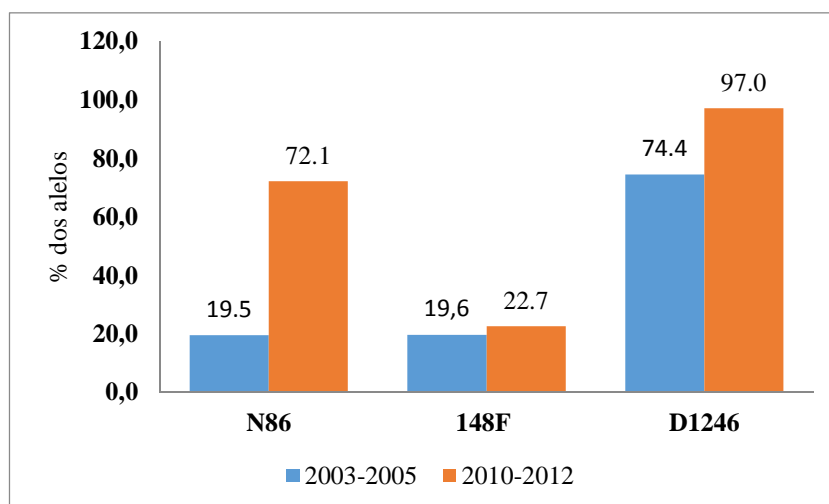


Figura 16 - Variação temporal das frequências dos alelos associados com a tolerância aos ACTs nos codões 86, 184 e 1246 do gene *pfmdr1*.

Neste estudo foi também analisada a variação temporal da frequência dos diferentes haplótipos com base em grupos de dois (86/184, 86/1246, 184/1246) e de três codões (86/184/1246). As infecções mistas foram excluídas da análise de haplótipos. Os resultados desta análise estão apresentados na Tabela 30.

Na análise com base em dois codões verifica-se que os haplótipos contendo os alelos selvagens N86-Y184 59.4%, N86-D1246 82.2% e Y184-D1246 74.2% apresentam uma proporção muito superior, destacando-se das restantes combinações (Tabela 30). Embora em menor percentagem, todas as combinações estão representadas excepto o haplótipo com ambos os alelos mutantes 184F-1246Y.

Na análise dos haplótipos com base em 3 codões manteve-se a tendência para a maior frequência da combinação do haplótipo contendo os alelos selvagens N86-Y184-D1246 (cerca de 60%) seguida no entanto, da combinação de alelos associada a elevada

Resultados

capacidade de suportar altas concentrações de lumefantrina por parte do *P. falciparum* – o haplótipo N86-184F-D1246 (24.8%) (Tabela 30).

Tabela 30 - Frequência dos haplótipos de *pfmdr1* para os codões N86Y, Y184F e D1246Y em Maputo, antes e depois da introdução de ACTs. Os números entre parênteses representam o número de amostras correspondentes a 2003-2005; 2010-2012.

Codão	Haplótipo	Frequência	
		2003-2005 %	2010-2012 %
86/184 (49;293)	NF	10.2	24.3
	YF	8.2	0.3
	NY	12.2	59.4
	YY	69.4	16.0
	ND	27.3	84.4
86/1246 (77;286)	NY	1.3	0.3
	YD	64.9	13.6
	YY	6.5	1.7
	FY	0.0	0.0
184/1246 (53;330)	FD	20.8	23.3
	YY	7.5	2.4
	YD	71.7	74.3
86/184/1246 (45;282)	NFD	11.1	24.8
	NFY	0.0	0.0
	NYY	2.2	0.4
	NYD	11.1	59.2
	YYY	4.4	1.8
	YFD	8.9	0.4
	YFY	0.0	0.0
	YYD	62.2	13.5

Resultados

4.3.3 - Determinação do número de cópias do gene *pfmdr1*

A estimativa do número de cópias do gene *pfmdr1* foi efetuada após a optimização das reacções e validação do método PCR em Tempo Real usando *SYBR Green I* (descrito na secção 3.3.4 de Material e Métodos). Foram seleccionadas aleatoriamente 99 amostras, nas quais foi estimado o número de cópias do *pfmdr1*. A linha descontínua do gráfico permite separar visualmente, os isolados em que foi detectada mais de uma cópia do gene (n° de cópias ≥ 2 indica mais de uma cópia). Nos clones 3D7 e Dd2 foi encontrado o número de cópias do gene esperado: 3D7 1 cópia e Dd2 4 cópias⁽³⁰⁰⁾. Nas amostras de ADN provenientes das 99 amostras seleccionadas, apenas 3 apresentam um número de cópias de *pfmdr1* acima de 2, sendo que o máximo número de cópias encontrado foi de 2,48 cópias. Pelo que consideramos que no geral não foram obtidos isolados com alteração do número de cópias do gene *pfmdr1* em Maputo.

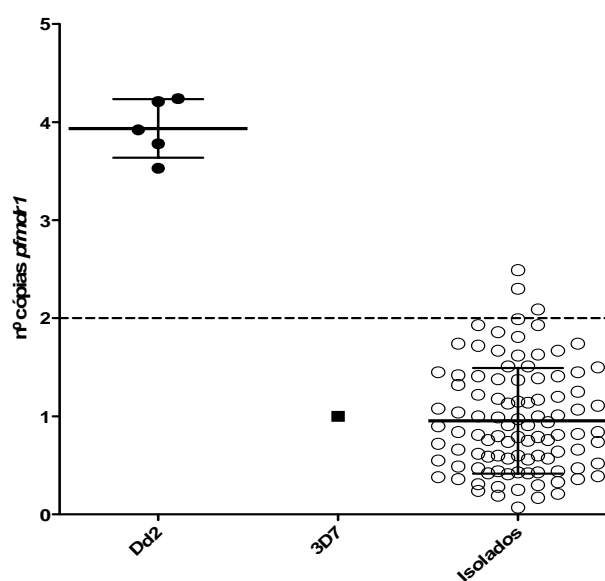


Figura 17 - Número de cópias do gene *pfmdr1* estimado por RT-PCR usando *SYBR Green I*. Clones de *P. falciparum*: círculos a cheio; Dd2 e quadrados a cheio: 3D7; círculos abertos: isolados obtidos dos pacientes; linha descontínua: n° de cópias igual a 2.

Resultados

4.3.4 - Determinação da frequência dos polimorfismos no gene *pfatp6* nas amostras colhidas nos pacientes com malária não complicada em Maputo.

A pesquisa de mutações no gene *pfatp6* (ID:PF3D7_0106300; PlasmoDB, <http://plasmodb.org>), proposto como o principal alvo dos derivados da artemisinina foi efetuada por PCR e sequenciação. Foram amplificadas por PCR e sequenciadas, 3 regiões do *pfatp6* que aqui designamos: fragmento 1, fragmento 2 e fragmento 3 (Anexo 11). A escolha destas regiões foi feita com base em estudos anteriores nos quais foram identificadas mutações com possível associação à suscetibilidade aos derivados da artemisinina: fragmento 1 incluindo o a.a. 263, fragmento 2 a.a. 623 e fragmento 3 a.a. 769^(220, 226). Nas amostras sequenciadas, não foram encontradas as mutações nos a.a. 263, 623 nem 769. No entanto no fragmento 2 na posição 569 foi detetada a alteração do a.a. asparagina (N, AAT) para lisina (K, AAA), já anteriormente descrita em África nomeadamente em Zanzibar (com frequência de 36%) e na Tanzânia (com frequência de 29%)⁽²²⁶⁾. No nosso trabalho, em Maputo o polimorfismo N569K foi detectado em 6 das 15 amostras sequenciadas (correspondendo a uma frequência de 40%). No fragmento 3, a mutação sinónima para o a.a. isoleucina na posição 898 (ATT -> ATA) foi detetada em 6 (6/9; frequência 66.6%). Ambas as mutações N569K e I898I tinham já sido identificadas no Sudeste-Asiático, África e América do Sul (87, 226, 301). Quatro das amostras possuíam a mutação em ambas posições 569 e 898 em simultâneo (Anexo 11). Em Dezembro de 2013 foi publicado o trabalho de Arieu e colaboradores⁽²³²⁾ no qual se descreve identificação de 3 mutações pontuais no gene *pfK13* de *P. falciparum* (ID: PF3D7_1343700; PlasmoDB<http://plasmodb.org>), as quais fazem (desde 2014) parte da definição de resistência e de suspeita de resistência propostas pela OMS. Neste trabalho, os autores puderam verificar que o gene *pfatp6* (quer nos clones seleccionados por pressão de fármaco quer nos isolados de pacientes que demonstraram falência terapêutica) não possuía as mutações que anteriormente haviam sido propostas como potencialmente associadas à resposta à artemisinina. Dado que nas 15 amostras analisadas não foi detetada nenhuma das mutações de *pfatp6* anteriormente descritas como associadas com a resposta de *P. falciparum* à artemisinina (nomeadamente L263E, A623E e S769N) e em face à

Resultados

identificação do novo marcador molecular de resistência à artemisinina o gene *pfK13* decidimos não prosseguir a análise das restantes amostras no que respeita aos polimorfismos no gene *pfatp6*.

4.3.5 - Determinação da frequência de polimorfismos no gene *pfK13*

A partir de 2014, a presença de mutações no gene *pfK13*, nomeadamente Y493H, R539T, C580Y passa a fazer parte da definição de *resistência* e de *suspeita de resistência* propostas pela OMS. Assim, foi estudada a presença de polimorfismos associados à resistência aos ACTs no gene que codifica a proteína *kelch K13* em *P. falciparum*, antes e depois da introdução desta classe terapêutica, em Moçambique. Para isto, foram selecionadas 50 amostras correspondentes ao período posterior à introdução dos ACTs (2010-2012) a partir dos doentes com malária não complicada referidos na secção 2.1. Um segundo grupo de 50 amostras correspondendo ao período anterior à introdução dos ACTs (2003-2005) foi aleatoriamente selecionado a partir dos doentes com malária não complicada referidos na secção 3.1. No âmbito do trabalho realizado foi analisado o gene *pfK13*, que codifica a proteína *kelch K13*, para pesquisa de polimorfismos. A distribuição espacial e temporal encontra-se resumida na Figura 18.

A identificação de polimorfismos foi efetuada pela comparação da sequência nucleotídica de *pfK13* de cada amostra com a sequência do gene da estirpe de referência 3D7. Nas nossas amostras não foram observados os polimorfismos C580Y, R539T, Y493H e I543T, quer nas amostras correspondentes ao período antes quer depois da introdução dos ACTs.

Resultados

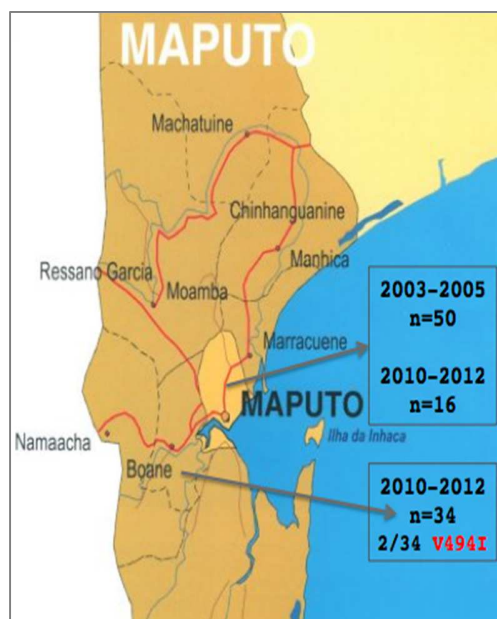


Figura 18 - Distribuição das amostras e polimorfismos estudados por localidade e em cada período.

Não foram identificados polimorfismos nas amostras isoladas antes da introdução dos ACTs em Moçambique. No entanto foi identificado em duas amostras provenientes de Boane isoladas após a introdução dos ACTs, um polimorfismo não descrito anteriormente no aminoácido 494 (nucleótico 1480) (Figura 18). O polimorfismo é não sinónimo e resulta da substituição de uma guanina (g) por uma adenina (a), resultando na alteração do aminoácido valina (V) para uma isoleucina (I).

As sequências dos fragmentos contendo polimorfismos encontram-se depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) com os códigos de acesso: KP262066 e KP262067.

Resultados

3.3.6 - Avaliação de polimorfismos genéticos de *P. falciparum* associados à resposta aos ACTs nos pacientes que não responderam à terapêutica no D7

Quando analisados, os dois pacientes que apresentavam exame parasitológico positivo e sintomas em D7 após tratamento com ASAQ (referidos na secção 3.1.3), apresentaram respectivamente genótipo misto (N/Y) e mutante (Y) para a posição 86 do *pfmdr1* e selvagem para as posições 184 (Y) e 1246 (D). Quanto ao número de cópias do gene *pfmdr1*, os mesmos apresentaram 1 cópia. A análise do gene *pfK13* revelou um alelo selvagem (idêntico ao clone 3D7).

Tabela 31 - Genótipos apresentados pelos dois pacientes de Boane que revelaram sintomas e parasitémia positiva em D7.

Pacientes	Genótipo <i>pfmdr1</i>			Nºde cópias	<i>pfK13</i>
	86	184	1246		
1º	N/Y	Y	D	1	alelo selvagem
2º	Y	Y	D	1	(idêntico ao clone 3D7)

5- DISCUSSÃO

Discussão

Em Moçambique a malária é endémica em todo o país e na maioria das regiões, a sua transmissão ocorre ao longo de todo o ano, atingindo o ponto mais alto durante a época chuvosa. As atividades de controlo da malária no país remontam da década de 50. Em 1982 foi criado o Programa Nacional de Controlo da Malária (PNCM), cujos objetivos específicos se centram na prevenção e erradicação da doença. Atualmente, de acordo com dados do Ministério de Saúde, embora haja uma redução das taxas de frequência, a malária continua sendo a principal causa de mortalidade nos hospitais, respondendo por cerca de 30% de todos os óbitos^(284, 285).

O problema da malária é complexo e inclui aspetos específicos ligados ao hospedeiro, ao vetor e ao parasita. Estudos ligados a estas áreas são importantes para a implementação com sucesso de medidas ideais de tratamento e controlo. Como forma de contribuir para estes objetivos, no presente trabalho foi feita a caracterização clínica e evolutiva de dois grupos de pacientes com malária (1-malária não complicada e 2- malária grave). Esta pesquisa envolveu também a determinação da frequência de mutações em genes potencialmente associados à resposta aos fármacos utilizados para o tratamento da malária, em particular as associações com os derivados da artemisinina, cujo uso como tratamento de primeira linha da malária em Moçambique foi iniciado em 2006. Em função dos objetivos iniciais e das linhas de trabalho realizadas, a discussão dos resultados deste trabalho será apresentada em três sub-capítulos.

5.1 - Estudo da malária não complicada

O estudo clínico da malária não complicada incluiu adultos e crianças e foi realizado em dois, o Centro de Saúde de Boane, localizado numa área semi-urbana da Província de Maputo, e o Centro de Saúde 1º de Maio localizado no centro da cidade de Maputo. Durante o período de estudo a percentagem de pacientes com malária foi mais elevada no Centro de Saúde de Boane do que Centro de Saúde 1º de Maio. Embora este resultado possa denotar a existência de maior frequência da malária nesta zona, este facto pode

Discussão

dever-se à existência de uma elevada densidade populacional que reside à volta desta Unidade Sanitária e a ela recorre. Contrariamente, o Centro de Saúde 1º de Maio localiza-se no centro da cidade e possui à sua volta vários outros com a mesma função. Além disso este centro encontra-se próximo a dois Hospitais Gerais (Hospital Geral de Mavalane e Hospital Geral de Chamanculo) e de um Hospital Central (Hospital Central do Maputo), dotados de serviços de especialidade em pediatria, facto que para além de explicar a menor frequência, também pode explicar a menor afluência de crianças em particular neste último centro, relativamente a Boane.

Em geral, as principais características clínicas da infeção pelo *P. falciparum* são semelhantes às de outras doenças infecciosas e neste estudo estas não diferiram das descritas por outros autores^(302, 303). A febre foi a queixa mais comum e a principal causa da procura de cuidados clínicos em todos os grupos etários, ocorrendo em maior percentagem nas crianças. A frequência de outras manifestações como cefaleia, anorexia e mioartralgias foi registada maioritariamente no grupo acima dos 15 anos, facto que pode estar relacionado com a menor capacidade de expressão das crianças em relação aos adultos. A hepatomegália e a esplenomegália foram observadas em baixas percentagens e só em crianças, o que está de acordo com os resultados de outros estudos clínicos^(304, 305). Adicionalmente a baixa frequência da esplenomegália pode ser explicada pela redução dos ataques repetidos de malária na população estudada⁽²⁸⁴⁾ e neste caso, os poucos casos observados podem estar relacionados a uma situação aguda transitória e não a uma situação de hiperreactividade como a que é normalmente descrita como consequência de episódios repetidos de malária⁽³⁰⁶⁾.

Os distúrbios hematológicos na malária envolvendo as principais linhas celulares (eritrócitos, plaquetas e leucócitos), são reconhecidos como característicos da infeção^(68, 70, 307). O perfil destas alterações pode variar com o nível de endemicidade; fatores demográficos e de imunidade; com o estado nutricional e ainda com a presença de distúrbios genéticos nas populações^(308, 309). Embora a ausência de valores laboratoriais de referência específicos para a idade nas diferentes localizações geográficas torne difícil quantificar o seu significado clínico, as alterações hematológicas na malária aguda, em

Discussão

particular a anemia e a trombocitopénia, são descritas como as mais comuns e em conjunto com os dados clínicos, podem auxiliar na suspeita e avaliação da resposta terapêutica⁽⁷⁰⁾.

Adiminuição transitória da hemoglobina tal como ocorreu ao 7º dia nos pacientes deste estudo tem sido descrita em pacientes tratados com combinações à base de artemisinina verificando-se de seguida uma subida gradual^(68, 310). Em Moçambique estão descritas elevadas frequências de anemia na população infantil, relacionadas sobretudo com a desnutrição crónica, parasitoses intestinais e introdução precoce de alimentação mista⁽²⁸⁴⁾. Contudo, embora desconhecendo os valores iniciais de hemoglobina pré infeção na população estudada, os resultados mostraram uma redução significativa da anemia com o tratamento, mesmo nas crianças abaixo dos 5 anos denotando o efeito positivo do tratamento. A recuperação da anemia após tratamento com as combinações à base de artemisinina foi também descrita mais recentemente por outros autores⁽³¹¹⁾.

Estudos realizados em diferentes locais apresentam resultados heterogéneos, indicando a complexidade das alterações hematológicas na malária de forma que estes não devem ser generalizados e a abordagem deve ser dirigida de forma específica para cada local. Além disso este tipo de análise não distingue os efeitos provocados pela malária e os resultantes de possíveis efeitos adversos de cada tipo de medicação. Assim esforços devem ser dirigidos para se obter e compilar a informação de vários estudos em diferentes locais, que possibilitem uma análise sistematizada.

Embora seja uma complicação comum em infeções bacterianas, virais e por protozoários, a trombocitopénia é descrita como sendo muito mais frequente nas infeções causadas pelo *P. falciparum*^(70, 307, 312, 313). Em alguns casos a redução das plaquetas atinge níveis bastante baixos mas que em geral não se associam a sangramento anormal^(70, 313, 314). Tipicamente a trombocitopénia ocorre precocemente e melhora alguns dias após o início do tratamento tal como observado neste estudo^(68, 315).

Há mais de duas décadas a hiperparasitémia foi considerada pela OMS como um critério de malária grave^(316, 317). A relação entre a densidade parasitária e a gravidade da malária, permanece um facto controverso e merecedor de estudos mais profundos uma vez que se

Discussão

tem observado que alguns indivíduos com graus elevados de parasitemia não desenvolvem complicações, enquanto outros com parasitemias mais baixas desenvolvem quadros fatais^(317, 318). O desenvolvimento de imunidade clínica e parasitológica para a malária é marcado pela capacidade de controlo da doença assim como da densidade parasitária. Apesar de as principais características da imunidade natural adquirida para a malária estarem definidas⁽³¹⁹⁾, pouco se sabe sobre os seus mecanismos subjacentes. A densidade parasitária está ligada à doença, e embora o número de parasitas quase certamente contribua para a mesma, outros fatores, como por exemplo as respostas associadas à presença de citocinas pró-inflamatórias, desempenham um papel importante⁽⁶⁴⁾. Em áreas endémicas, a doença como tal muitas vezes não se associa ao grau de parasitemia, mas ambas têm relação com a idade dos pacientes. Nestas áreas, a imunidade é adquirida lenta e progressivamente após estímulos antigénicos constantes determinados por infeções repetidas o que pode reduzir a gravidade dos sintomas e as complicações. Em crianças muito expostas, a parasitemia elevada pode ocorrer na ausência de sintomas clínicos aparentes e nestas crianças a maior complicação relaciona-se sobretudo com a anemia. Por seu turno, os adultos raramente apresentam parasitemias altas densidade, mas quando o fazem, os sintomas parecem ser mais graves do que aqueles em crianças com densidade igual⁽³²⁰⁾. Adicionalmente, a densidade de parasitas na circulação periférica, medida por avaliação microscópica de esfregaços de sangue nem sempre reflete a carga parasitária, uma vez que os parasitas maduros podem estar sequestrados em órgãos profundos⁽³²⁰⁾. No presente estudo, a proporção de pacientes com maior densidade parasitária (acima de 100.000 parasitas/mm³) foi de 9%, dos quais nenhum apresentou sinais de complicações. De acordo com os resultados globais obtidos no estudo dos pacientes com MnC, verificou-se que todos os pacientes observados no dia de controlo (D₁₄) apresentaram-se sem sintomas e com parasitemias negativas. Relativamente à volução dos valores dos parâmetros hematológicos estudados, esta seguiu uma tendência idêntica para ambos os tratamentos em todos os grupos etários estudados (AL ou ASAQ) com redução da anemia e melhoria das contagens plaquetárias, refletindo uma boa resposta às duas combinações terapêuticas usadas.

Discussão

5.2 - Estudo da malária grave

Nos últimos anos registaram-se avanços consideráveis na compreensão, da patogénese da malária, tendo-se tornado evidente que a malária grave é uma doença complexa, muito semelhante à sepsis⁽⁶⁴⁾. Diversos fatores exercem influência no desenvolvimento de complicações clínicas na malária entre os quais o nível de endemicidade, grau de imunidade e perfil clínico-laboratorial da população estudada⁽³²¹⁾. Como descrito por outros autores, os resultados deste trabalho mostram que as complicações graves da malária por *P. falciparum* envolvem principalmente três principais sistemas nomeadamente o sistema nervoso central, o sistema hematopoiético e o sistema respiratório^(66, 99, 322)

Embora a febre represente um sinal importante como demonstrado neste e em vários outros estudos^(19, 89; 78, 323), a clínica da malária grave, varia desde manifestações inespecíficas e ligeiras que se confundem com as de outra infeções como ocorre na malária não complicada, até complicações que levam à morte em pouco tempo, principalmente nos casos da infeção pela espécie *P. falciparum*^(59, 99, 323).

As alterações neurológicas constituem um grupo importante na malária por *P. falciparum*, sendo malária cerebral a alteração mais grave e a principal causa de óbitos em crianças menores de cinco anos^(76, 77, 99). Na avaliação dos pacientes com malária grave deve ser feita uma distinção entre os pacientes com “alteração da consciência” e os que apresentam sinais de “malária cerebral”, dado que embora o tratamento inicial seja similar em ambos os grupos, os pacientes com malária cerebral estão sujeitos a um pior prognóstico^(76, 99). Na nossa análise verificamos que mais de metade (55.4%) dos pacientes admitidos com malária grave apresentaram alteração da consciência e 22.3% foram classificados como padecendo de malária cerebral segundo os critérios definidos pela OMS⁽⁷⁹⁾. Dos óbitos registados todos tinham malária cerebral. Todos óbitos ocorreram em crianças menores de 5 anos e nas primeiras 24 horas após a admissão, dados estes que concordam com os descritos por outros autores⁽⁷⁶⁾. Embora todos os casos fatais tenham recorrido à unidade sanitária dentro dos primeiros três dias após o início dos sintomas é recomendável que em particular nas regiões endémicas, perante a mínima suspeita, o despiste da malária seja

Discussão

efetuado precocemente, uma vez que a evolução para formas graves pode ocorrer em poucas horas⁽⁷⁸⁾.

As convulsões constituem uma manifestação comum na malária por *P. falciparum* e neste estudo registaram uma elevada frequência tanto antes como após a admissão. Estas, muitas vezes estão associadas ao coma e à malária cerebral, e são uma importante causa de admissão aos hospitais^(325, 326). Em geral, a maioria das convulsões nas crianças ocorre associada à febre na ausência de comprometimento neurológico, apresentando um bom prognóstico imediato⁽⁹⁹⁾. No entanto crises convulsivas múltiplas ocorrem muitas vezes como resultado de encefalopatia difusa devendo por isso ser distinguidas das convulsões febris da infância uma vez que, além do mau prognóstico imediato⁽³²⁶⁾ estas podem desenvolver sequelas a longo prazo⁽³²⁷⁾.

Em relação à anemia, aproximadamente 40% dos pacientes com malária grave apresentou anemia grave com níveis de hemoglobina inferiores a 5 g/dl à admissão. Este número aumentou durante o internamento de forma que um total de 61.1% dos pacientes admitidos necessitou de pelo menos uma transfusão de eritrócitos, demonstrando o efeito do parasita da malária sobre a hemólise dos eritrócitos e sobre a redução da hemoglobina plasmática. Alguns estudos têm demonstrado elevadas taxas de mortalidade por anemia em crianças com malária grave particularmente nas mais pequenas (abaixo de 5 anos), sendo esta complicação considerada, uma das maiores causas de morbidade, de hospitalização e de mortalidade na Africa sub-Sahariana^(46, 48, 328, 329). Neste estudo, tal como ocorreu com os pacientes com malária não complicada, após o tratamento verificou-se uma subida dos níveis médios de hemoglobina. Contudo a interpretação desta subida deve ter em conta o facto de que algumas crianças foram submetidas a transfusões de concentrado de eritrócitos durante o período em que permaneceram internadas.

Embora não seja um critério de malária grave, a trombocitopénia é uma das complicações mais comuns na malária por *P. falciparum*⁽¹¹¹⁾. Neste estudo, a trombocitopénia, foi registada à admissão em 84.2% das crianças, tendo-se verificado uma importante melhoria das contagens plaquetárias após o início do tratamento. É de salientar que o único paciente

Discussão

que teve sangramento maciço possuía um nível de plaquetas de $82.000 \times 10^9/l$ enquanto outros pacientes com contagens abaixo deste nível não apresentaram sangramento, apoiando a hipótese de que além do efeito quantitativo, fatores qualitativos ligados às plaquetas podem ser determinantes⁽⁷⁰⁾. Um outro fator proposto como protetor do sangramento nos casos de trombocitopénia parece estar relacionado com a resposta medular. À admissão foi registado um aumento do volume médio das plaquetas (VPM) em 94% das crianças com malária grave, sugerindo que a libertação compensatória de megaplaquetas é provavelmente um fator importante para a manutenção da hemostase e pode explicar a baixa frequência de sangramentos nos pacientes com malária e trombocitopénia^(111, 313, 330).

Na malária vários resultados controversos têm sido relatados em relação aos leucócitos incluindo leucopénia e leucocitose^(70, 307, 313). Apesar dos resultados controversos alguns estudos associam a leucocitose à malária grave e ao mau prognóstico^(313, 331). Adicionalmente tem sido demonstrada a presença concomitante de leucocitose e bacterémia na malária grave^(49, 332-334) associando-as ao aumento da mortalidade^(331, 335).

O envolvimento pulmonar na malária é uma situação grave que se manifesta pela síndrome de desconforto respiratório agudo (SDRA) clinicamente indistinguível da que ocorre em outras infeções sistémicas ou pulmonares^(59, 97). Um achado consistente é a sua rápida melhoria com o tratamento antimalárico apropriado⁽⁹¹⁾. A tosse e a dispneia nos pacientes estudados foram manifestações comuns e apresentaram melhoria com o tratamento. Contudo, uma vez que estas podem resultar de outras co-morbilidades, na ausência de outros exames específicos (hemoculturas e avaliação do estado ácido-base) e pelo facto de todos os pacientes terem sido submetidos a antibioterapia desde a admissão, do mesmo modo que para a leucocitose, torna-se difícil avaliar a causa real do comprometimento respiratório.

As alterações hepáticas na malária são comuns e manifestam-se principalmente por icterícia, hepatomegália e elevação normalmente discreta do nível sérico das transaminases. A icterícia é menos comum nas crianças em relação aos adultos⁽⁵⁹⁾. As suas causas incluem

Discussão

principalmente hemólise e colestase resultantes de vários mecanismos patogénicos^(16, 336). Afreqüência da icterícia neste estudo não diferiu da descrita por outros autores⁽¹⁶⁾. Não se registaram níveis de transaminases clinicamente sugestivos de lesão hepatocelular apoiando a sua baixa freqüência na malária contrariamente ao que ocorre em outras infeções como por exemplo na hepatite viral^(59, 99, 337).

Embora a lesão renal na malária por *P. falciparum* seja mais freqüente em relação às infeções pelas outras espécies de *Plasmodium*, ainda assim, esta raramente causa quadros de insuficiência renal aguda^(338, 339). A insuficiência renal aguda na malária é mais comum nos adultos e em regiões de baixa transmissão como o sudoeste asiático e o subcontinente indiano^(71, 72). No presente estudo embora se tenham registado alguns casos de hematúria e proteinúria denotando provável lesão da membrana glomerular ou de não foi observado nenhum caso de insuficiência renal.

A hipoglicémia é uma situação comum nos pacientes com malária grave, sobretudo em crianças^(59,71). Os seus sintomas clássicos podem resultar de hiperestimulação do sistema nervoso simpático (sudorese, taquicardia, fraqueza, tremor, ansiedade) e/ou da alteração da função do sistema nervoso central (alteração da consciência, convulsões, alteração da postura) o que faz com que muitas vezes estes se confundam com os sintomas da malária^(59, 78). Ao contrário de outros estudos realizados em África nos quais se encontraram freqüências elevadas de hipoglicémia⁽³⁴⁰⁾ e embora uma elevada percentagem de crianças tenha apresentado vômitos e dificuldade alimentar, neste estudo observou-se uma baixa percentagem de crianças com hipoglicémia. Uma explicação para esta baixa freqüência de hipoglicémia pode dever-se ao facto de muitas crianças receberem um “*bolus*” de glicose a 10% (5ml/Kg) logo à sua chegada nas unidades sanitárias sobretudo quando estão graves e/ou quando necessitam de ser transferidas.

Atualmente em Moçambique a malária e as infeções oportunistas associadas à infeção pelo Vírus de Imunodeficiência Adquirida (HIV) estão entre as principais causas de morte. Embora os estudos relativos à malária e HIV não sejam conclusivos, dados sugerem a existência de uma interação entre estas duas patologias que interfere com os seus cursos

Discussão

clínicos⁽³⁴¹⁾. De acordo com alguns autores, a coinfeção malária-VIH aumenta a gravidade e mortalidade da malária em crianças e adultos⁽³⁴²⁻³⁴⁴⁾. Uma vez que estas duas patologias (malária e HIV) são atualmente as mais prevalentes e causam as mais elevadas taxas de mortalidade em Moçambique estudos mais aprofundados sobre a sua interação seriam recomendados.

Neste estudo constatamos que 21.7% das crianças com malária grave apresentaram uma história de medicação tradicional antes da procura de cuidados hospitalares. Este facto pode indicar que muitos pacientes provavelmente ainda não reconhecem os sinais de alerta da malária ou não estão conscientes do perigo que a doença representa. Por outro lado, fatores culturais podem atrasar a procura precoce de cuidados de saúde convencionais, facto que, para além de atrasar a chegada aos hospitais, predispõe os pacientes aos efeitos desconhecidos das “terapias” tradicionais. Na malária por *P. falciparum*, a progressão das complicações pode ser rápida, produzindo mau prognóstico de tal forma que todos os pacientes deveriam ser avaliados e tratados logo ao início dos sintomas como forma de reduzir a mortalidade.

Existem evidências de aumento da atividade dos eosinófilos em pacientes com malária cerebral (CM), independentemente do seu número absoluto no plasma⁽²⁴⁹⁾. Adicionalmente, a proteína catiónica do eosinófilo (ECP, codificada pelo gene *RNAse3*) possui atividade citotóxica podendo matar protozoários e outros microorganismos *in vitro*⁽²⁵⁰⁻²⁵³⁾ e tem sido associada à patogénia da malária^(249, 251, 255, 256). O polimorfismo de nucleótido único G371C no gene *RNAse3*, resulta na substituição de uma arginina (R) por uma treonina (T) e suprime a citotoxicidade de ECP.

Polimorfismos de nucleótido único (SNPs) em proteínas codificadas pelo gene da *RNAse3* mais precisamente o polimorfismo G371G>C que resulta em substituição do aminoácido arginina (R) pela Treonina (T) (R124T) foi associado à susceptibilidade à malária cerebral⁽²⁵⁶⁾. Assim a análise de polimorfismos neste gene pode-se tornar uma ferramenta essencial para estudos de susceptibilidade à malária grave.

No nosso trabalho, como esperado, o genótipo GG foi relativamente mais prevalente nos

Discussão

pacientes com MC do que nos pacientes com MG ($p=0,049$) ou com MnC ($p= 0,376$) embora não tenha atingido significância estatística. De forma idêntica os pacientes que apresentavam MG e/ouMC e com genótipo homozigótico GG também apresentaram um *Glasgow score* mais baixo que os portadores do genótipo CC, embora esta relação também não tenha alcançado significância ($p = 0,195$). Este facto pode dever-se ao facto do reduzido número de doentes da nossa amostra 30 doentes com MC.

5.3 - Estudo de polimorfismos genéticos de *P. falciparum* associados à resposta aos ACTs em Maputo.

Nos últimos anos tem-se registado uma diminuição significativa da morbidade e mortalidade associadas à malária na maioria dos países endémicos⁽³⁵⁾. Esta redução é atribuída em grande parte aos esforços de controlo, destacando-se a melhoria nas medidas de prevenção e a implementação de terapias combinadas de elevada eficácia baseadas nos derivados da artemisinina (ACT)^(35,345). Entretanto, apesar de se tratar de uma doença evitável e tratável, a malária continua a ser um grande problema de saúde no mundo⁽³⁵⁾. Um dos principais fatores que contribuem para este grande desafio é o surgimento e propagação da tolerância/resistência do parasita a vários antimaláricos, incluindo os ACTs^(172, 199, 293)

Nos países endémicos em geral, as políticas de tratamento contra a malária têm sido regularmente alteradas em função do surgimento de falências terapêuticas resultantes do desenvolvimento de estirpes resistentes aos diversos antimaláricos na população parasitária. Um dos resultados esperados com estas mudanças é que, em conjunto com outras medidas sobretudo profiláticas, se possa garantir um controlo eficaz e duradouro da malária no mundo. Contudo, historicamente, à medida que novos fármacos vão sendo introduzidos, o perfil molecular dos parasitas responde rapidamente às mudanças de pressão dos antimaláricos, através da seleção de polimorfismos genéticos resultando em sensibilidade reduzida aos mesmos⁽³⁴⁶⁻³⁴⁸⁾.

Discussão

Tendo em vista que já foram registados indícios de redução da eficácia aos ACTs no Sudeste Asiático, teme-se que tal como aconteceu com os fármacos anteriormente usados como a cloroquina (CQ) e a sulfadoxina+pirimetamina (SP), a eficácia dos ACTs não seja duradoura, o que na ausência de fármacos alternativos se pode transformar numa catástrofe.

A resistência de *P. falciparum* aos ACTs foi recentemente documentada na Tailândia, Camboja, Myanmar, Laos e Vietnam^(35, 279, 280; 349, 350). Evidências históricas mostram que estirpes resistentes de *P. falciparum* se disseminaram para o continente africano a partir do sudeste asiático⁽³⁵¹⁾, como foi o caso da CQ e SP^(183, 352). Em consonância com este facto, existem relatos de diminuição das taxas de cura do AI em África^(353, 354) e de falhas terapêuticas em relação ao ASAQ⁽³⁵⁵⁻³⁶⁴⁾.

A adequada cura clínica e parasitológica da malária pelos ACTs, relaciona-se com o efeito terapêutico do derivado da artemisinina (semivida reduzida), que permite a rápida redução da biomassa parasitária mas também do fármaco acompanhante de ação mais prolongada responsável pela subsequente eliminação dos parasitas residuais⁽²⁵⁷⁾. Da mesma forma que ocorreu com os restantes antimaláricos, a pressão de seleção exercida pelos ACTs não impede o desenvolvimento e propagação de marcadores de resistência à artemisinina, particularmente se na região já houver resistência aos antimaláricos usados na combinação, resultando em aumento do risco de falha terapêutica⁽³⁴⁶⁾. Assim, infeções que ocorram após eliminação da artemisinina, enquanto a droga combinada se mantém em circulação, podem selecionar parasitas resistentes a esta⁽³⁶⁵⁾.

5.3.1 - Polimorfismos no gene *pfmdr1*

Atualmente as duas combinações mais comumente utilizadas no mundo são o artemeter+lumefantrina (AL) e o artesunato+amodiaquina (ASAQ)⁽³⁶⁵⁾. Embora a eficácia ajustada de ambas permaneça elevada na maior parte das regiões⁽³⁶⁶⁻³⁶⁸⁾, dados indicam que o desenvolvimento de polimorfismos em alguns genes de *P. falciparum* nomeadamente o gene *pfmdr1* estão associados à diminuição da sensibilidade à amodiaquina e à lumefantrina^(369, 370).

Discussão

Em África vários estudos têm documentado os polimorfismos no gene *pfmdr1* sobretudo após terapia com AL^(170, 263, 293, 371). O gene *pfmdr1* e particularmente, os polimorfismos pontuais (SNPs), resultando numa alteração de aminoácido nos codões 86 (N86Y), 184 (Y184F), e 1246 (D1246Y) foram associadas a alterações na susceptibilidade de *P. falciparum* a vários medicamentos, incluindo aos ACTs^(172, 198, 199, 293). Inicialmente, estes SNPs em *pfmdr1* foram associados com a resistência à cloroquina (CQ) e a amodiaquina (AQ)⁽¹⁹⁸⁾. Por exemplo, a mutação *pfmdr1* 86Y tem sido associada a resistência à CQ^(167, 272), e sugere-se que o haplótipo 86Y-Y184-1246Y foi provavelmente selecionado pela utilização de AQ em regimes de monoterapia, estando provavelmente associado ao aumento do risco de falha terapêutica^(172, 293).

Embora os SNPs nas posições 1034 e 1042 de *pfmdr1* tenham sido relacionados com a modulação do fenótipo de resistência, estes são pouco frequentes em África⁽³⁶⁹⁾ e por essa razão não lhes foi dada preferência neste estudo.

No presente trabalho foram estudadas as frequências dos SNPs e dos haplótipos *pfmdr1* N86Y, Y184F e D1246Y na área de Maputo no período 2010-2012, (correspondente a 5 a 7 anos após a introdução dos ACTs). A elevada frequência do tipo selvagem N86 (72.1%) e D1246 (96.9%) e o já moderado aumento da frequência do mutante 184F (23%) está de acordo com os resultados de vários estudos em África^(148, 170, 198, 199, 292-299).

Na análise comparativa efetuada com as amostras colhidas na mesma região (Maputo), antes da introdução dos ACTs (2002-2003 ou pré-ACTs) verificou-se que houve um aumento estatisticamente significativo da frequência dos alelos do tipo selvagem N86 e D1246 associados à alteração da sensibilidade do parasita à lumefantrina. Além disso, o período pré-ACTs caracterizou-se por elevada frequência do mutante 86Y e do tipo selvagem Y184 (Figura 16). A redução da frequência do 86Y e reversão para o tipo selvagem N86 sugerida como o primeiro passo para a tolerância à lumefantrina⁽³⁴⁸⁾ verificada após a introdução dos ACTs, já havia sido observada em Moçambique em dois recentes estudos realizados respectivamente nas províncias de Inhambane e Gaza^(345, 348).

Discussão

Em Moçambique os alelosmutantes 86Y associados a resistência à cloroquina aproximaram-se da fixação atingindo 74,7% em 2006, tendo reduzido para 31% em 2010⁽³⁴⁸⁾. É possível que esta alteração tenha resultado daremoção dapressão da cloroquinaapós a introdução dos ACTs, como ocorreu no Malawi⁽³⁷³⁾. A reversão do *pfmdr1* para o tipo selvagem no codão 86 (86N) predispõe os parasitas ao desenvolvimento de resistência à lumefantrina⁽³⁴⁸⁾, um facto preocupante, uma vez que o AL é actualmente o tratamento de primeira linha na maioria dos países na África sub-Sahariana incluindo Moçambique. Adicionalmente, o aumento da pressão exercida pelo tratamento com AL pode influenciar a eficácia da combinação a nível regional como anteriormente visto em Moçambique com o Fansidar⁽³⁴⁸⁾.

No que respeita à análise dos haplótipos de *pfmdr1*, os resultados estão de acordo com os de outros estudos em África onde as frequência do haplótipo 86Y-Y184 também eram altas antes da introdução dos ACTs^(148, 170, 198, 199, 292-299). Isto sugere que a redução deste haplótipo (86Y-Y184) após a introdução dosACTs pode indicar que o mesmo não confere vantagem de adaptativa sob pressão exercida pelos ACTs⁽³⁷⁴⁾. Um estudo na Tailândia sugeriu que a seleção do haplótipo N86-184F foi provavelmente causada pelo artesunato⁽³⁷⁵⁾.

Em África descrevem-se duas variantes principais de haplótipos *pfmdr1* mais comumente selecionadas emtrêsresíduos de aminoácidos: N86Y, F184YeD1246Y. O haplótipoYYY está associado à diminuição da sensibilidade às 4-aminoquinolinas e tem sido selecionado pela AQ ou CQ^(172, 293, 373, 376) e o haplótipo NFD associado à diminuição da sensibilidade do parasita aos aril-aminoalcoois como a mefloquina ou a lumefantrina. A frequência deste deste haplótipo tem sido observada em áreas ondea combinação AL é amplamente usada^(170, 194, 198, 199, 377).

No presente estudo, a análise da frequência dos triplos haplótipos de N86Y, Y184F e D1246Y na população de Maputo em 2011-2012 manteve-se uma maior frequência dos alelos selvagens NYD (aproximadamente 59.2%) e uma moderada frequência do haplótipo NFD (24.8%) que confere ao *P. falciparum* uma maior capacidade para suportar elevadas

Discussão

doses de lumefantrina indicando uma seleção significativa dos mesmos no período após implementação dos ACTs. Em geral, os nossos resultados da frequência dos SNPs de *pfmdr1* são consistentes com os do estudo referido anteriormente realizado em Inhambane, no qual a frequência do haplótipo, único mutante YYD diminuiu significativamente de 2009 para 2010, enquanto a frequência do haplótipo único mutante NFD aumentou significativamente no mesmo período⁽³⁴⁵⁾.

Estas constatações não indicam para já um potencial risco imediato de falha clínica com o tratamento com AL. O haplótipo NFD em particular pode ser considerado como um “marcador” de maior tolerância ao AL indicando uma vantagem de sobrevivência destes parasitas⁽³⁴⁵⁾. No entanto, apesar de o AL continuar eficaz em África e em Moçambique, estes resultados sugerem que este não é suficientemente robusto para evitar a seleção de mutantes⁽¹⁹⁸⁾ particularmente em Moçambique onde foi usado inicialmente como segunda linha, mas que faz parte do tratamento da malária não complicada desde 2004.

5.3.2 - Amplificação do gene *pfmdr1*

No Sudeste Asiático, estudos têm mostrado que a amplificação do gene *pfmdr1* se correlaciona com a falência terapêutica à mefloquina⁽²²³⁾. Mais recentemente, a amplificação deste gene foi também associada à resistência à lumefantrina *in vitro*⁽³⁷⁵⁾. Nas amostras analisadas neste estudo foi detectado o aumento do número de cópias em 3 isolados, apoiando a hipótese de que a amplificação *pfmdr1* é rara em África^(198,370). Outros autores encontram em África amplificação do nº de cópias de *pfmdr1* superiores às encontradas no nosso estudo^(348, 378). Esta aparente discrepância pode também dever-se ao *cut-off* usado pelos diferentes autores para considerar o aumento do nº de cópias. No nosso trabalho estabelecemos o *cut-off* de 2. Recentemente um estudo com isolados de *P. falciparum* provenientes de África não encontrou correlação entre o aumento do nº de cópias de *pfmdr1* e o IC₅₀ (medida de susceptibilidade *in vitro*) nem com o tempo médio de eliminação da parasitemia⁽³⁷⁹⁾. No referido estudo, Ngalah e colaboradores usaram metodologia baseada em RTPCR idêntica à usada por nós, no entanto estabelecem o *cut-off* a ≥ 1.75 . Se aplicado aos nossos resultados, 8 doentes apresentariam um aumento do nº de cópias de *pfmdr1*.

Discussão

5.3.3 - Polimorfismos no gene *pfatp6*

Nas 15 amostras analisadas não foi detetada nenhuma das mutações de *pfatp6* anteriormente descritas como associadas com a resposta de *P. falciparum* à artemisinina (nomeadamente L263E, A623E e S769N). Em Dezembro de 2013⁽²³²⁾ foi identificado um novo marcador molecular de resistência à artemisinina o gene *pfK13*. Nesse trabalho, os autores puderam verificar que o gene *pfatp6* (quer nos clones selecionados por pressão de fármaco quer nos isolados de pacientes que demonstraram falência terapêutica) não possuía as mutações que anteriormente haviam sido propostas como potencialmente associadas à resposta à artemisinina. Assim, decidimos neste estudo não prosseguir a análise das restantes amostras no que respeita aos polimorfismos no gene *pfatp6*.

5.3.4 - Polimorfismos no gene *pfK13*

Em Dezembro de 2013 foi publicado o trabalho de Arieu e colaboradores⁽²³²⁾ no qual se descreve identificação de 3 mutações pontuais no gene *pfK13* de *P. falciparum* (ID: PF3D7_1343700; PlasmoDB<http://plasmodb.org>), as quais fazem (desde 2014) parte da definição de resistência e de suspeita de resistência propostas pela OMS.

Os SNPs Y493H, R539T e C580Y identificados como sendo o marcador molecular de resposta aos ACTs não foram identificados nas amostras isoladas antes ou depois da introdução dos ACTs em Moçambique. No entanto foi identificado, em duas amostras provenientes de Boane isoladas após a introdução dos ACTs, um polimorfismo não descrito anteriormente no aminoácido 494 (nucleótico 1480) (Figura 18). O polimorfismo é não sinónimo e resulta da substituição de uma guanina (g) por uma adenina (a), resultando na alteração do aminoácido valina (V) para uma isoleucina(I).

O SNP não-sinónimo V494I é adjacente ao codão marcador molecular de resistência aos ACTs Y493H. Além disso, o V494I foi identificado em duas amostras coletadas em Moçambique após a introdução dos ACTs. Moçambique está localizado na África Oriental, uma região reconhecida como sendo um dos principais focos de entrada e disseminação de parasitas resistentes a antimaláricos na África sub-saariana, provenientes do Sudeste

Discussão

Asiático⁽¹⁸³⁾. A mutação V494I por nós identificada em Moçambique não está identificada no Sudeste Asiático, embora especulativo, justifica maior atenção.

6 - CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Conclusões e Perspetivas Futuras

O presente trabalho incluiu três capítulos nos quais foram estudados aspetos clínicos e moleculares associados à malária.

Os resultados desta investigação revelaram um perfil clínico da malária não complicada com predominância de febre, anemia e trombocitopenia. Verificou-se uma baixa frequência de esplenomegália e hepatomegália que foram evidenciadas apenas nos pacientes com idade inferior a 15 anos e uma baixa frequência de icterícia em todas as faixas etárias.

Embora devido a algumas limitações enfrentadas no trabalho de campo, a monitorização da parasitemia nos pacientes com malária não complicada só tenha sido efetuada ao 7º e ao 14º dias, de acordo com os resultados globais obtidos no estudo, verificou-se uma resposta adequada pelo menos até ao dia 14 nos dois grupos de tratamento (artemeter-lumefantrina ou artesunato-amodiaquina) com ausência de sintomas, melhoria dos parâmetros hematológicos estudados e ausência de parasitemia ao 14º dia.

Apenas 2 pacientes com malária não complicada tratados com ASAQ, apresentaram sintomas e parasitemia ao 7º dia. Nestes pacientes a análise de marcadores de diversidade de *P. falciparum* revelou tratar-se da mesma infeção.

Os resultados revelaram uma maior frequência de malária grave em crianças menores de 5 anos de idade, na sua maioria vindas diretamente do domicílio e com uma média de 3 dias de evolução dos sintomas. Em geral os pacientes com malária grave apresentaram um perfil com predomínio de febre, prostração, dificuldade na alimentação, alteração do estado de consciência, e anemia com Hgb < 5 mg/dl. Aproximadamente um terço dos pacientes apresentou-se com malária cerebral, com um score Glasgow entre 4-10. Os 5 óbitos registados ocorreram nas primeiras 24 horas após admissão, no grupo de crianças com malária cerebral e em menores de 5 anos.

Em relação ao estudo de polimorfismos associados à malária grave, não foi observada associação significativa entre o polimorfismo na posição 371 do gene humano RNase3 e a presença de malária grave / cerebral.

Conclusões e Perspetivas Futuras

A avaliação da frequência de polimorfismos genéticos potencialmente associados à resposta de *P. falciparum* aos ACTs revela que após a introdução dos ACTs em Maputo houve um aumento significativo da frequência dos alelos N86 e 1246D e dos haplótipos NFD e NYD associados à tolerância à lumefantrina.

No que respeita aos polimorfismos no gene *pfk13* o marcador molecular recentemente relacionado com o fenótipo de resistência à artemisinina, nas amostras analisadas (quer referentes ao período antes quer após a introdução de ACTs em Moçambique), não foram identificados os polimorfismos anteriormente associados à resistência aos derivados da artemisinina no sudeste Asiático. No entanto, em duas amostras (colectadas após a introdução dos ACTs) provenientes de Boane, foi identificado um novo polimorfismo no gene *pfk13* (V494I) não descrito até então.

Embora não haja indícios de redução da eficácia das combinações baseadas em derivados de artemisinina, o perfil molecular do *Plasmodium falciparum* apresentado neste estudo em amostras provenientes de Maputo indica a necessidade de monitorização regular de forma a permitir a deteção precoce de resistências emergentes.

Pretende-se pois que os resultados obtidos nesta análise possam servir de base para futuros estudos mais abrangentes. Assim, considera-se importante a extensão da análise dos polimorfismos aqui estudados e de outros que eventualmente venham a ser identificados a outras regiões do país, de forma a permitir a deteção precoce de resistências emergentes e a tomada de medidas atempadas.

Paralelamente medidas básicas como a divulgação da informação às populações para o reconhecimento das manifestações da doença e procura precoce de cuidados de saúde; melhoria no diagnóstico e tratamento adequado dos casos de malária devem ser incentivadas de forma a reduzir as mortes atribuíveis à malária.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

1. Carter R, Mendis KN. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002; 15 (4): 564-594.
2. França TC, Santos MJ, Figueroa-Villar JD. Malária: Aspectos históricos e quimioterapia. *Química Nova*. 2008; 31 (5): 1271-1278.
3. Cox-Sing J, Hiu J, Lucas SB, Divis PC, Zulkarnaen M, Chandran P, et al. Severe malaria - a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: a case report. *Malaria J*. 2010; 9:10.
4. Bruce-Chwatt LJ. Alphonse Laveran's discovery 100 years ago and today's global fight against malaria. *J R Soc Med*. 1981; 74: 531-536.
5. Shortt HE, Garnham PCC, Covell G, Shute PG. Pre-erythrocytic stage of human malaria, *Plasmodium vivax*. *British Med J*. 1948; 1 (4550): 547.
6. Shortt HE, Fairley NH, Covell G, Shute PG, Garnham PCC. A preliminary note on the pre-erythrocytic stage of *Plasmodium falciparum*. *British Med J*. 1949; 2:1006-1008.
7. Shortt HE. Recent advances in our knowledge of the malaria parasite. *British Med J*. 1950; 2 (4679): 606-608.
8. Garnham C, Bray RS, Cooper W, Lainson R, Awad FI, Williamson J. Preerythrocytic stages of human malaria: *Plasmodium ovale*. A preliminary note. *British Med J*. 1954; 1 (4856): 257.
9. Bray RS. Pre-erythrocytic stages of human malaria parasites: *Plasmodium malariae*. *British Med J*. 1959; 2 (5153): 679-680.
10. Singh B, Sing LK, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsu SSG, Cox-Singh J, et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium Knowlesi* infections in human beings. *Lancet*. 2004; 363: 1017-1024.

Referências Bibliográficas

11. Patarroyo ME, Amador R, Clavijo P, Moreno A, Tascon R, Franca MA, et al. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *P. falciparum* malaria. *Nature*.1988; 332:158.
12. Moorthy VS, GoodMF, Hill AVS. Malaria vaccine developments. *Lancet* 2004; 363: 150-156.
13. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2002; 419 (6906): 498-511.
14. Carlton JM, Escalante AA, Neafsey D, Volkman SK. Comparative evolutionary genetics of human malaria parasites. *Trends Parasitol*. 2008; 24:545-550.
15. Pain A, Bohme U, Berry AE, Mungall K, Finn RD, Jackson AP, et al. The genome of the simian and human malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *Nature*. 2008; 455 (9): 799-804.
16. Hoffman SL, Campbell CC, White NJ. Malaria. Section II, Part H, Chapter 96.In Guerrant RL, Walker DH, Weller PF. *Tropical Infect diseases: Principles, Pathogens and Practice* (Third edition). Elsevier 2010. Availabbe at: <http://www.expertconsult.com>.
17. Sinden RE, Hartley RH, Winger L. The development of *Plasmodium* ookinetes in vitro: an ultrastructural study including a description of meiotic division. *Parasitology*.1985; 91 (2): 227-244.
18. Gilles HM. Malaria-an overview. *J Infect*. 1989; 18 (1): 11-23.
19. Knell AJ. Origin of falciparum. *Parasitol Today*. 1988; 4 (1): 20
20. Bruce-Chwatt L J, Garnham PC, Shute PG, Draper CC. Induced double infection with *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* in a splenectomized chimpanzee. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1970; 64, 2.

Referências Bibliográficas

21. Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JCR, Frevert U, Nussenzweig RS, et al. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before Infection. *Science*. 2001; 291: 141-144.
22. Feagin JE, Werner E, Gardner MJ, Williamson DH, Wilson RJ. Homologies between the contiguous and fragmented rRNAs of the two *Plasmodium falciparum* extrachromosomal DNAs are limited to core sequences. *Nucleic Acids Res*. 1992; 20: 879-887.
23. Hikosaka K, Watanabe Y, Kobayashi F, Waki S, Kita K, Tanabe K. Highly conserved gene arrangement of the mitochondrial genomes of 23 *Plasmodium* species. *Parasitol Int*. 2011; 60 (2): 175-180.
24. Feagin JE, Harrell MI, Lee JC, Coe KJ, Sands BH, Cannone JJ, et al. The fragmented mitochondrial ribosomal RNAs of *Plasmodium falciparum*. *PLoS One*. 2012; 7 (6): e38320.
25. Gupta A, Mir SS, Jackson KE, Lim EE, Shah P, Sinha A, et al. Recycling factors for ribosome disassembly in the apicoplast and mitochondrion of *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*. 2013; 88 (5): 891-905.
26. Wilson RJM, Williamson DH. Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa. *Microbiol Molec Biol Rev*. 1997; 61 (1): 1-16.
27. Hyman RW, Fung E, Conway A, Kurdi O, Mao J, Miranda M, Nakao B, Rowley D, Tamaki T, Wang F, Davis RW. Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosome 12. *Nature*. 2002; 419 (6906): 534-537.
28. Roberts DJ, Craig AG, Berendt AR, Rinches R, Nashes G, March K, Newbold CI. Rapid switching of multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature*. 1992; 357: 689-692.
29. Baruch DI. Adhesive receptors on malaria-parasitized red cells. *Baillière's Clinic Haematol*. 1999; 12 (4): 747-761.

Referências Bibliográficas

30. Chen Q, Schlichtherle M, Wahlgren M. Molecular Aspects of Severe Malaria. Clin Microbiol Rev. 2000; 13: 439-450.
31. Smith JD, Chitniq't CE, Craig AG, Roberts DJ, Hudson-Taylor DE, Peterson DS, et al. Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. Cell. 1995; 82:101-110.
32. Su X, Heatwoie VM, Wertheimer SP, Guinet F, Hertfeldt JA, Peterson DS, et al. The large diverse gene family w encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. Cell.1995; 82: 89-100.
33. Driss A, Hibbert JM, Wilson NO, Iqbal SA, Adamkiewicz TV, Stiles JK. Genetic polymorphisms linked to susceptibility to malaria. Malaria J. 2011;10:271
34. Mwingira F, Nkwengulila G, Schoepflin S, Sumari D, Beck HP, Snounou G, et al. *Plasmodium falciparum*msp1, msp2 and glurp allele frequency and diversity in sub-Saharan Africa. Malaria J. 2011; 10:79.
35. World Health Organization: The World Malaria Report 2014. Geneva. WHO; 2014.
36. Gething PW, Patil AP, Smith DL, Guerra CA, Elyazar IRF, Johnston GL, et al. A new world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2010. Malaria J. 2011; 10: 378.
37. Feachem RGA, Phillips AA, Hwang J, Cotter C, Wielgosz B, Greenwood BM, et al. Malaria elimination 1. Shrinking the malaria map: progress and prospects. Lancet. 2010; 376: 1566-1578.
38. Cox FG. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. Parasites & Vectors. 2010; 3:5.
39. Daneshvar C, Davis TME, Cox-Singh J, Rafa'ee MZ, Zakaria SK, Divis PCS, et al. Clinical and laboratory features of human *Plasmodium knowlesi* infection. Clin Infect Dis. 2009; 49 (6): 852-860.

Referências Bibliográficas

40. Ministério da Saúde (MISAU), Instituto Nacional de Estatística (INE) e ICF International (ICFI). Moçambique Inquérito Demográfico e de Saúde 2011. Calverton, Maryland, USA: MISAU, INE e ICFI.
41. Saúte F, Aponte J, Almeda J, Ascaso C, Abellana R, Vaz N, e tal. Malaria in southern Mozambique: malariometric indicators and malaria case definition in Manhiça district. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003; 97: 661-666.
42. Murray CJ, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, et al. "Global malaria mortality between 1980 and 2010: A systematic analysis". *Lancet.* 2012; 379 (9814): 413-431.
43. Relatório final do Inquérito sobre Indicadores Múltiplos. Moçambique. Instituto Nacional de Estatística 2009.
44. Abacassamo F, Enosse S, Aponte JJ, Gómez-Olivé F.X, Quintó L, Mabunda S, et al. Efficacy of choloquine, amodiaquine, sulphadoxine-pirimethamine and combination therapy with artesunate in Mozambican children with non complicated malaria. *Trop Med Int Health.* 2004; 9 (2): 200-208.
45. Abellana R, Ascaso C, Aponte J, Saute F, Nhalungo D, Nhacolo A, et al. Spatio-seasonal modeling of the incidence rate of malaria in Mozambique. *Malaria J.* 2008; 3:7:228.
46. Guinovart C, Bassat Q, Sigaúque B, Aide P, Sacarlal J, Nhampossa T, et al. Malaria in rural Mozambique. Part I: Children attending the outpatient clinic. *Malaria J.* 2008; 7:36
47. Varandas L, Julien M, Lerberche WV, Gonçalves L, Ferrinho P. Independent indicators of outcome in severe paediatric malaria: maternal education, acidotic breathing and convulsions on admission. *Annals Trop Paed.* 2000; 20: 265-271.
48. Bassat Q, Guinovart C, Sigaúque B, Aide P, Sacarlal J, Nhampossa T, et al. Malaria in rural Mozambique. Part II: children admitted to hospital. *Malaria J.* 2008; 7:37.

Referências Bibliográficas

49. Bassat Q, Guinovart C, Sigaúque B, Mandomando I, Aide P, Sacarlal J, et al. Severe malaria and concomitant bacteraemia in children admitted to a rural Mozambican hospital. *Trop Med Int Health*. 2009; 14 (9): 1011-1019.
50. Mayor A, Aponte JJ, Fogg C, Saúte F, Greenwood B, Dgedge M, et al. The epidemiology of malaria in adults in a rural area of southern Mozambique. *Malaria J*. 2007; 6:3
51. Chandramohan D, Carneiro I, Kavishwar A, Brugh AR, Desai V, Greenwood B. A clinical algorithm for the diagnosis of malaria: results of an evaluation in an area of low endemicity. *Trop Med Int Health*. 2001; 6 (7): 505-510.
52. Mwangi TW, Mohammed M, Dayo H, Snow RW, Marsh K. Clinical algorithms for malaria diagnosis lack utility among people of different age groups. *Trop Med Int Health*. 2005; 10 (6): 530-536.
53. Ashley EA, White NJ. The duration of *Plasmodium falciparum* infections. *Malaria J*. 2014; 13:500.
54. Marques HH, Vallada MG, Sakane PT, Boulos M. Malária congênita. Descrição de casos e breve revisão da literatura. *J. Pediatria*. 1996; 72 (2): 103-105.
55. Tangpukdee N, Duangdee C, Wilairatana P, Krudsood S. Malaria diagnosis: a brief review. *Korean J Parasitol*. 2009; 47 (2): 93-102.
56. Bloland PB. Drug resistance in malaria. World Health Organization, Department of Communicable Disease Surveillance and Response. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.4
57. Greenwood BM. Control to elimination: implications for malaria research. *Trends in Parasitol*. 2008; 24 (10): 449-454.
58. Saiki RK, Gefand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-Directed Enzymatic Amplification of ADN with a Thermostable ADN Polymerase. *Science*. 1988, 239: 487-491.

Referências Bibliográficas

59. Bartoloni A, Zammarchi L. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterranean J Hematol Infec Dis*. 2012; 4 (1): e2012026.
60. Giobbia M, Tonon E, Zanatta A, Cesaris L, Vaglia A. Late recrudescence of *Plasmodium falciparum* malaria in a pregnant woman: a case report. *Int J Infec Dis*. 2005; 9: 234-235.
61. Szmitko PE, Magdie L, Kohn L, Simor AE. *Plasmodium falciparum* malária occurring 8 years after leaving an endemic area. *Diag Microbiol Infec Dis*. 2009; 63: 105-107.
62. Babiker HA, Pringle SJ, Abdel-Muhsin A, Mackinnon M, Hunt P, Walliker D. High-level chloroquine resistance in Sudanese isolates of *Plasmodium falciparum* is associated with mutations in the chloroquine resistance transporter gene *pfcr1* and the multidrug resistance Gene *pfmdr1*. *J Infect Dis*. 2001; 183 (10): 1535-1538.
63. Odolini S, Apostoli A, Casari S, Matteelli A, Castelli F. Recrudescence of *Plasmodium falciparum* malaria in a primigravid woman with anaemia as the only sign of disease. *J Obstetrics and Gynaecol*. 2014; Early Online: 1-2.
64. Clark IA, Budd AC, Alleva LM, Cowden WB. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malaria J*. 2006; 10 (5): 85.
65. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 2002; 415: 673-679.
66. Idro R, Aloyo J. Manifestations, quality of emergency care and outcome of severe malaria in Mulago Hospital, Uganda. *African Health Sci*. 2004; 4:50-57.
67. Jairajpuri ZS, Rana S, Hassan MJ, Nabi F, Jetley S. An analysis of hematological parameters as a diagnostic test for malaria in patients with acute febrile illness: An institutional experience. *Oman Medical J*. 2014; 29 (1): 12-17.
68. Olliaro P, Djimde A, Dorsey G, Karema C, Mårtensson A, Ndiaye J, et al. Hematologic Parameters in Pediatric Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria in Sub-Saharan Africa. *American J Trop Med Hyg*. 2011; 85 (4): 619-625.

Referências Bibliográficas

69. White NJ. Malaria. In: Manson's tropical diseases. Edited by Cook GC, Manson P, Zumla A. Twenty-second edition: Saunders. 2009: 1201-1300.
70. Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium malariae*: Parasite and disease. Clin Microbiol Rev. 2007; 20 (4): 579-592.
71. White NJ. Malaria: a molecular marker of artemisinin resistance. Lancet. 2014; 383 (9927): 1439-1440.
72. Das BS. Renal failure in malaria. J Vector Borne Dis. 2008; 83-97.
73. Lee KS, Cox-Singh J, Singh B. Morphological features and differential counts of *Plasmodium knowlesi* parasites in naturally acquired human infections. Malaria J. 2009; 8:73.
74. Clark IA, Alleva LM, Mills AC, Cowden WB. Pathogenesis of Malaria and Clinically Similar Conditions. Clin Microbiol Reviews. 2004; 17 (3): 509-539.
75. Mackintosh CL, Beeson JG, Marsh K. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. Trends in Parasitol. 2004; 20 (12): 597-603
76. Idro K, Jenkins NE, Newton CRJC. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. Lancet Neurology. 2005; 4: 827-840.
77. Newton CRJC, Taylor TE, Whitte RO. Pathophysiology of fatal *falciparum* malaria in African children. Am J Trop Med Hyg. 1998; 58 (5): 673-683.
78. Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I, Prabhu RM. Clinical review: Severe malaria. Critical Care.2003; 14; 7: 315-323.
79. World Health Organization 2010. Guidelines for the treatment of malaria. Second Edition: World Health Organization; 2010. Available at: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241547925/en/>.
80. Gomes AP, Vitorino RR, Costa AP, Mendonça EG, Oliveira MGA, Siqueira-Batista R. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. Severe *Plasmodium falciparum* malaria. Rev Bras de Terapia Int. 2011; 23 (3): 358-369.

Referências Bibliográficas

81. Gay F, Zougbedé S, N'Dilimabaka N, Rebollo A, Mazier D, Moreno A. Cerebral malaria: What is known and what is on research. *Neuropaludisme: ce que l'on sait et ce que l'on cherche. Revue Neurologique.* 2012; 168: 239-256.
82. Lou J, Lucas R, Grau GE. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14 (4): 810-820.
83. Kochar DK, Saxena V, Singh N, Kochar SK, Kumar SV, Das A. *Plasmodium vivax* Malaria. *Emerging Infect Dis.* 2005; 11 (4): 132-134.
84. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. *Vivax* Malaria: Neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77 (6): 79-87.
85. Genton B, D'Acromont V, Rare L, Baea K, Reeder JC, Alpers MP, et al. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Med.* 2008, 5 (6): e127.
86. Cox-Singh J, Singh B. Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance? *Trends Parasitol.* 2008; 24 (9): 406-410.
87. Rajahram GS, Barber BE, William T, Menon J, Anstey NM, Yeo TW. Deaths due to *Plasmodium knowlesi* malaria in Sabah, Malaysia: association with reporting as *Plasmodium malariae* and delayed parenteral artesunate. *Malaria J.* 2012; 11:284.
88. Sermwittayawong N, Singh B, Nishibuchi M, Sawangjaroen N, Vuddhakul V. Human *Plasmodium knowlesi* infection in Ranong province, southwestern border of Thailand. *Malaria J.* 2012; 11:36.
89. Newton CRJC, Hien TT, White N, Neurological aspects of tropical disease. *Cerebral Malaria. J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2000; 69: 433-441.
90. White NJ. Antimalarial drug resistance. *J Clin Investig.* 2004; 113 (8): 1084-1092.
91. Maitland K, Marsh K. Pathophysiology of severe malaria in children. *Acta Tropica.* 2004, 90: 131-140.

Referências Bibliográficas

92. Dondorp AM. Pathophysiology, clinical presentation and treatment of cerebral malaria. *Neurology Asia*. 2005; 10: 67-77.
93. Taylor TE, Fu WJ, Carr RA, Whittens RO, Mueller JG, Fosico NG, et al. Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nature*. 2004; 10 (2): 143-145.
94. Eisenhut M. The evidence for a role of vasospasm in the pathogenesis of cerebral malaria. *Malaria J*. 2015; 14:405
95. White NJ. *Manson's Tropical Diseases*. Elsevier Science. 2003; 21th edition: 1205-1295
96. Boulos M, Costa JM, Tosta CE, Pulmonary involvement in malária. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1993; 35 (1): 93-102.
97. Maguire GP, Handojo T, Pain MCF, Kenangalem E, Price RN, Tjitra E, et al. Lung injury in uncomplicated and severe *falciparum* malaria: A longitudinal study in Papua, Indonésia. *The J Infec Dis*. 2005; 192:1966-1974.
98. White NJ, Ho M. *The pathophysiology of malaria*. Academic Press Limited. 1992; 31: 85-149.
99. Marsh K, Forster D, Waruiru C, Mwangi I, Winstanley M, Marsh V, et al. Indicators of life-threatening malaria in African children. *N Engl J Med*. 1995, 332: 1399-1404.
100. English M, Sauerwein R, Waruiru C, Mosobo M, Obiero J, Lowe B, Marsh K: Acidosis in severe childhood malaria. *QJM*. 1997; 90: 263-270.
101. White NJ, Warell DA, Chanthavanich P, Looreesuwan S, Warrel MJ, Krishna S, et al. Severe hypoglycaemia and hyperinsulinaemia in *falciparum* malaria. *New Engl J Medicine*. 1983; 309: 61-66.
102. Dondorp AM, Angus BJ, Hardeman MR, Chotivanich KT, Silamut K, Ruangveerayuth R, et al. Prognostic significance of reduced red blood cell deformability in severe *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 1997; 57: 507- 511.

Referências Bibliográficas

103. Agbenega T, Planche T, Bedu-Addo G, Ansong D, Owusu-Ofori A, Bhattaram VA, Nagaraja NV, Shroads AL, Henderson GN, Hutson AD, Derendorf H, Krishna S, Stacpoole PW Population kinetics, efficacy, and safety of dichloroacetate for lactic acidosis due to severe malaria in children. *J Clin Pharmacol*. 2003; 43: 386-396.
 104. Day NP, Phu NH, Mai NT, Chau TT, Loc PP, Chuong LV, Sinh DX, Holloway P, Hien TT, White NJ. The pathophysiologic and prognostic significance of acidosis in severe adult malaria *Crit. Care Med*. 2000; 28: 1833-1840.
 105. Weatherall DJ., Miller LH., Baruch DI., Marsh K., Doumbo OK., Casals-Pascual C, et al. Malaria and the Red Cell. *Hematology*. 2002; 1: 35-57.
 106. Vander JDL, Hunsaker LA, Campos NM, Baack BR. D-lactate production in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1990; 42: 277-284.
 107. Waller D, Krishna S, Crawley J, Miller K, Nosten F, Chapman D, et al. Clinical features and outcome of severe malaria in Gambian children. *Clin Infect Dis*. 1995; 21 (3): 577-587.
 108. Elsheikha HM, Sheashaa HA. Epidemiology, pathophysiology, management and outcome of renal dysfunction associated with plasmodia infection. *Parasitol Research*. 2007; 101:1183-1190.
 109. Ashley EA, White NJ. Malaria. Diagnosis and Treatment. Section 3, Chapter 19: 304-321.
 110. Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nature Reviews/Imunology*. 2005; 5: 722-735.
 111. Quintero JP, Siqueira AM, Tobón A, Blair S, Moreno A, Arévalo-Herrera M, et al. Malaria-related anaemia: a Latin American perspective. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011; 106 (1): 91-104.
 112. Wickramasinghe SN, Abdalla SH. Blood and bone marrow changes in malaria. *Baillière's Clinical Haematology*. 2000; 13 (2): 277-299.
-

Referências Bibliográficas

113. Krishna S, Waller DW, ter Kuile F, Kwiatkowski D, Crawley J, Craddock CFC, et al. Lactic acidosis and hypoglycaemia in children with severe malaria: pathophysiological and prognostic significance. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994; 88 (1): 67-73.
114. World Health Organization: Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000, 94 (suppl1): S1-S90.
115. Maitland K, Levi M, English M, Mithwani S, Pesh N, Marsh K, et al. Severe *P.falciparum* malaria in Kenyan children: evidence of hipovolemia. *QJM: International J Medicine.* 2003; 96: 429-434.
116. Lacerda MVGL, Mourão MPG, Santos PJT, Alecrim MGC. Malária algida: um diagnóstico sindrômico. Algid malaria: a syndromic diagnosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2009; 42 (1): 79-81.
117. Meshnick SR, Dobson MJ. The history of antimalarial drugs. In: Rosenthal PJ, ed. *Antimalarial chemotherapy: mechanisms of action, modes of resistance, and new directions in drug development.* NJ Humana Press. 2001: 15-25.
118. Butler AR, Khan S, Fergusson E. A brief history of malaria chemotherapy. *J R Coll Physicians Edinb.* 2010; 40:172-177.
119. Woodrow CJ, Haynes RK, Krishna S. Artemisinins. *Postgraduate. Medical J.* 2005; 81: 71-78.
120. Cowman AF, Foote, S. Chemotherapy and drug resistance in malaria. *Int J Parasitol.* 1990; 20: 503-513.
121. Arav-Boger, R. & Shapiro, T.A. Molecular mechanisms of resistance in antimalarial chemotherapy: the unmet challenge. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005; 45: 565-585.
122. Geary TG, Divo AA, Jensen JB. Stage specific actions of antimalarial drugs on *Plasmodium falciparum* in culture. *Am J Trop Med Hyg.* 1989; 40: 240-244.

Referências Bibliográficas

123. Skinner TS, Manning LS, Johnston WA, Davis TM. In vitro stage-specific sensitivity of *Plasmodium falciparum* to quinine and artemisinin drugs. *Int J Parasitol.* 1996; 26: 519-25.
124. Orjih AU. Heme polymerase activity and the stage specificity of antimalarial action of chloroquine. *J Pharmacol Exp Therapeutics.* 1997; 282 (1): 108-112.
125. Krogstad DJ, Gluzman IY, Herwaldt BL, Schlesinger PH, Wellems TE. Energy dependence of chloroquine accumulation and chloroquine efflux in *Plasmodium falciparum*. *Biochem Pharmacol.* 1992; 43 (1): 57-62.
126. Aikawa M, Rabbeg, JR, Welde BT. Junctional apparatus in erythrocytes infected with malarial parasites. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1972; 124: 72-75.
127. Yayon A, Timberg R, Friedman S, Ginsburg H. Effects of chloroquine on the feeding mechanism of the intraerythrocytic human malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *J Protozool.* 1984; 31: 367-372
128. Sullivan AD, Ittarat I, Meshnick SR. Patterns of haemozoin accumulation in tissue. *Parasitology.* 1996; 112 (3): 285-294.
129. Gligorijevic B, Bennett T, McAllister R, Urbach JS, Roepe PD. Spinning disk confocal microscopy of live, intraerythrocytic malarial parasites. 2. Altered vacuolar volume regulation in drug resistant malaria. *Biochemistry.* 2006; 45: 12411-12423.
130. Sanchez CP, Stein W, Lanzer M. Trans stimulation provides evidence for a drug efflux carrier as the mechanism of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry.* 2003; 42: 9383-9394.
131. Krogstad DJ, Gluzman IY, Kyle DE, Oduola AM, Martin SK, Milhous WK, et al. Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. *Science.* 1987; 238 (4831): 1283-128.
132. Foley M, Tilley L. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. *Pharmacol Therapeutics.* 1998; 79 (1): 55-87.

Referências Bibliográficas

133. Wellems TE, Panton LJ, Gluzman IY, do Rosario VE, Gwadz RW, Walker-Jonah A, et al. Chloroquine resistance not linked to *mdr*-like genes in a *Plasmodium falciparum* cross. *Nature*. 1990; 345; 253-255.
134. Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, Cowman AF. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2000; 403 (6772): 906-909.
135. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, et al. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell*. 2000; 6:861-871.
136. Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y, et al. A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 2001; 344, 257-263.
137. Djimde A, Doumbo OK, Steketee RW, Plowe CV. Application of a molecular marker for surveillance of chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *Lancet*. 2001; 358:890-891.
138. Babiker HA, Gadalla AAH, Ranford-Cartwright LC. The role of asymptomatic *P. falciparum* parasitaemia in the evolution of antimalarial drug resistance in areas of seasonal transmission. *Drug Resist updates*. 2013; 16: 1-9.
139. Labbe AC, Bualombai P, Pillai DR, Zhong KJ, Vanisaveth V, Hongvanthong B, et al. Molecular markers for chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Thailand and Laos. *Am J Trop Med Hyg*. 2001; 95, 781-788.
140. Durand R, Le Bras J. *Plasmodium falciparum*: point mutations of *pfprt* and chloroquine susceptibility. *Ann Pharm Fr*. 2001; 59, 312-318.
141. Mayor AG, Gómez-Olivé X, Aponte JJ, Casimiro S, Mabunda S, Djedje M, et al. Prevalence of the K76T Mutation in the Putative *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter (*pfprt*) Gene and Its Relation to Chloroquine Resistance in Mozambique. *J Infect Dis*. 2001; 183:1413-1416.

Referências Bibliográficas

142. Lopes D, Nogueira F, Gil JP, Ferreira C, do Rosario VE, Cravo P. pfcrt and pfmdr1 mutations and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* from Sao Tome and Principe, West Africa. *Annals of Trop Med Parasitol*. 2002; 96 (8): 831-834.
143. Sidhu AB, Verdier-Pinard D, Fidock DA. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by pfcrt mutations. *Science*. 2002; 298 (5591): 210-213.
144. Cojean S, Noel A, Garnier D, Hubert V, Le Bras J, Durand R. Lack of association between putative transporter gene polymorphisms in *Plasmodium falciparum* and chloroquine resistance in imported malaria isolates from Africa. *Malaria J*. 2006; 5:24.
145. Menard D, Yapou F, Manirakiza A, Djalle D, Matsika-Claquin D, Talarmin A. Polymorphisms in pfcrt, pfmdr1, dhfr genes and in vitro responses to antimalarials in *Plasmodium falciparum* isolates from Bangui, Central African Republic. *Am J Trop Med Hyg*. 2006; 75 (3): 381-387.
146. Ojurongbe O, Ogungbamigbe TO, Fagbenro-Beyioku AF, Fendel R, Kremsner PG, Kun JF. Rapid detection of Pfcrt and Pfmdr1 mutations in *Plasmodium falciparum* isolates by FRET and in vivo response to chloroquine among children from Osogbo, Nigeria. *Malaria J*. 2007; 6:41.
147. Ursing J, Kofoed PE, Rodrigues A, Rombo L, Gil JP. *Plasmodium falciparum* genotypes associated with chloroquine and amodiaquine resistance in Guinea-Bissau. *Am J Trop Med Hyg*. 2007; 76 (5): 844-848.
148. Duah NO, Wilson MD, Ghansah A, Abuaku B, Edoh D, Quashie NB, et al. Mutations in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter and multidrug resistance genes, and treatment outcomes in Ghanaian children with uncomplicated malaria. *J Tropical Pediatrics*. 2007; 53 (1): 27-31.
149. Hyde JE. Drug-resistant malaria- an insight. *Fed Europ Biochem Soc J*. 2007; 274: 4688-4698.

Referências Bibliográficas

150. Cooper RA, Ferdig MT, Su X, Ursos LB, Mu J, Nomura T, et al. 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*. *Molec Pharmacol*. 2002; 61:35-42.
151. Cooper RA, Lane KD, Deng B, Mu J, Patel JJ, Wellems TE, et al. 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 (1), 270-282.
152. Griffin CE, Hoke JM, Samarakoon U, Duan J, Mu J, Ferdid MT, et al. Mutation in *Plasmodium falciparum* CRT protein determines the stereospecific activity of antimalarial chinchona alkaloids. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56: 5356-5364.
153. Johnson DJ, Fidock DA, Mungthin M, Lakshmanan V, Sidhu AB, Bray PG, et al. Evidence for a central role for PfCRT in conferring *Plasmodium falciparum* resistance to diverse antimalarial agents. *Mol Cell*. 2004; 15; 867-877.
154. Lakshmanan V, Bray PG, Verdier-Pinard D, Johnson DJ, Horrocks P, Muhle RA, et al. A critical role of PfCRT K76T in *Plasmodium falciparum* verapamil reversible chloroquine resistance. *Embo J*. 2005; 24: 2294-2305.
155. Sa JM, Twu O, Hayton K, Reyes S, Fay MP, Ringwald P, et al. Geographic patterns of *Plasmodium falciparum* drug resistance distinguished by differential responses to amodiaquine and chloroquine. *Proc Natl Acad Sci*. 2009; 106, 18883-9.
156. Cowman AF, Karcz S, Galatis D, Culvenor JG. A P-glycoprotein homologue of *Plasmodium falciparum* is localized on the digestive vacuole. *J Cell Biology*. 1991; 113 (5): 1033-1042.
157. Higgins CF. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature*. 2007; 446: 749-757.

Referências Bibliográficas

158. Martin SK, Oduola AM, Milhous WK. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. *Science*. 1987; 235, 899-901.
159. Foote SJ, Thompson JK, Cowman AF, Kemp DJ. Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P. falciparum*. *Cell*. 1989; 57 (6): 921-930.
160. Foote SJ, Kyle DE, Martin RK, Oduola AM, Forsyth K, Kemp DJ, et al. Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 1990; 345 (6272): 255-258.
161. von Seidlein L, Duraisingh MT, Drakeley CJ, Bailey R, Greenwood BM, Pinder M. Polymorphism of the *Pfmdr1* gene and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* in The Gambia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997; 91:450-453.
162. Gomez-Saladin E, Fryauff DJ, Taylor WR, Laksana BS, Susanti AI, Purnomo SB, et al. *Plasmodium falciparum* *mdr1* mutations and in vivo chloroquine resistance in Indonesia. *AmJ Trop Med Hyg*. 1999; 61 (2): 240-244.
163. Nagesha HS, Din-Syafruddin, Casey GJ, Susanti AI, Fryauff DJ, Reeder JC, et al. Mutations in the *pfmdr1*, *dhfr* and *dhps* genes of *Plasmodium falciparum* are associated with in-vivo drug resistance in West Papua, Indonesia. *Trans R Trop Med Hyg*. 2001; 95 (1): 43-49.
164. Ngo T, Duraisingh M, Reed M, Hipgrave D, Biggs B, Cowman AF. Analysis of *pfprt*, *pfmdr1*, *dhfr*, and *dhps* mutations and drug sensitivities in *Plasmodium falciparum* isolates from patients in Vietnam before and after treatment with artemisinin. *Am J Trop Med Hyg*. 2003; 68 (3): 350-356.
165. Cojean S, Hubert V, Le Bras J, Durant R. Resistance to dihydroartemisinin. *Emerging Infec Dis*. 2006; 12 (11): 1798-1799.
166. 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

Referências Bibliográficas

- increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Molec Biochem Parasitol.* 2000; 108: 13-23.
167. Duraisingh MT, Cowman AF. Contribution of the *pfmdr1* gene to antimalarial drug-resistance. *Acta Trop.* 2005; 94:181-190.
168. Pickard AL, Wongsrichanalai C, Purfield A, Kamwendo D, Emery K, Zalewski C, et al. Resistance to antimalarials in Southeast Asia and genetic polymorphisms in *pfmdr1*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47 (8): 2418-2423.
169. Ginsburg H, Famin O, Zhang J, Krugliak M. Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action. *Biochem Pharmacol.* 1998; 56, 1305-1313.
170. Dokomajilar C, Lankoande ZM, Dorsey G, Zongo I, Ouedraogo J, Rosenthal PJ. Roles of specific *Plasmodium falciparum* mutations in resistance to amodiaquine and sulfadoxine-pyrimethamine in Burkina Faso. *Am Soc Trop Med Hyg.* 2006; 75 (1): 162-165.
171. Happi CT, Gbotosho GO, Folarin OA, Bolaji OM, Sowunmi A, Kyle DE, et al. Association between mutations in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter and *P. falciparum* multidrug resistance 1 genes and in vivo amodiaquine resistance in *P. falciparum* malaria-infected children in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 75 (1): 155-161.
172. Holmgren G, Hamrin J, Svärd J, Mårtensson A, Gil JP, Björkman A. Selection of *pfmdr1* mutations after amodiaquine monotherapy and amodiaquine plus artemisinin combination therapy in East Africa. *Infection, Genetics and Evolution.* 2007; 7: 562-569.
173. Tinto H, Guekoun L, Zong, I, Guiguemde R, D'Alessandro U, Oue'draogo JB. Chloroquine-resistance molecular markers (*Pfcr* T76 and *Pfmdr-1* Y86) and amodiaquine resistance in Burkina Faso. *Trop Med Int Health.* 2008; 13 (2): 238-240.
-

Referências Bibliográficas

174. Barennes H, Nagot N, Valea I, Koussoube-Balima T, Ouedraogo A, Sanou T, et al. A randomized trial of amodiaquine and artesunate alone and in combination for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in children from Burkina Faso. *Trop Med Int Health*. 2004; 9: 438-444.
175. O'Neill P, Barton VE, Ward SA, Chadwick J. 4-Aminoquinolines: Chloroquine, Amodiaquine and Next-Generation Analogues. In Staines HM, Krishna S editors. *Treatment and prevention of malaria. Antimalarial drug action and use*. Springer Science & Business Media. 2012; pg 19-61.
176. Talisuna AO, Nalunkuma-Kazibwe A, Bakayita N, Langi P, Mutabingwa TK, Watkins WW, et al. Efficacy of sulphadoxine-pyrimethamine alone or combined with amodiaquine or chloroquine for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in Ugandan children. *Trop Med Int Health*. 2004; 9: 222-229.
177. Geary TG, Bonanni LC, Jensen JB, Ginsburg H. Effects of combinations of quinoline-containing antimalarials on *Plasmodium falciparum* in culture. *Anat Trop Med Parasitol*. 1986; 80: 285-291.
178. Sanchez CP, Stein WD, Lanzer M. Dissecting the components of Quinine accumulation in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*. 2008; 67: 1081-1093.
179. Achan J, Talisuna AO, Erhart A, Yeka A, Tibenderana JK, Baliraine FN, et al. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria Achan et al. *Malaria J*. 2011; 10:144.
180. Zalis MG, Pang L, Silveira MS, Milhous WK, Wirth DF. Characterization of *Plasmodium falciparum* isolated from the amazon region of Brasil: Evidence for quinine resistance. *Am J Trop Med Hyg*. 1998; 58 (5): 630-637.
181. Ward SA, Bray PG. Definitive proof for a role of pfmdr 1 in quinoline resistance in *Plasmodium falciparum*. *Drug Resist Updat*. 2000; 3: 80-81.

Referências Bibliográficas

182. Poyomtip T, Suwandittakul N, Sitthichot N, Khositnithikul R, Tan-ariya P, Mungthin M. Polymorphisms of the *pfmdr1* but not the *pfnhe-1* gene is associated with in vitro quinine sensitivity in Thai isolates of *Plasmodium falciparum*. *Malaria J.* 2012; 11:7
183. Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2 (4): 209- 218.
184. Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, Deng B, Joy DA, Su XZ, et al. Dissecting the loci of low-level quinine resistance in malaria parasites. *Mol Microbiol.* 2004; 52: 985-97.
185. Sidhu A, Uhlemann A, Valderramos S, Valderramos J, Krishna S, Fidock DA. Decreasing *pfmdr1* Copy Number in *Plasmodium falciparum* Heightens Susceptibility to Mefloquine, Lumefantrine, Halofantrine, Quinine, and Artemisinin. *J Infect Dis.* 2006; 194: 528-535.
186. Raj DK, Mu J, Jiang H, Kabat J, Singh S, Sullivan M, et al. Disruption of a *Plasmodium falciparum* multidrug resistance-associated protein (PfMRP) alters its fitness and transport of antimalarial drugs and glutathione. *J Biol Chemistry* 2009; 284 (12): 7687-7696.
187. Henry M, Briolant S, Zettor A, Pelleau S, Baragatti M, Baret E, et al. *Plasmodium falciparum* Na/H exchanger 1 transporter is involved in reduced susceptibility to quinine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 52 (5): 1926-1930.
188. Peters W: Antimalarial drug resistance: an increasing problem. *Br Med Bull* 1982, 38(2): 187-192.
189. Mayxay M, Barends M, Brockman A, Jaidee A, Nair S, Sudimack D, et al. In vitro antimalarial drug susceptibility and *pfert* mutation among fresh *Plasmodium falciparum* isolates from the Lao PDR (Laos). *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 76 (2): 245-250.
190. Legrand E, Volney B, Meynard JB, Mercereau-Puijalon O, Esterre P: In vitro monitoring of *Plasmodium falciparum* drug resistance in French Guiana: a synopsis

Referências Bibliográficas

- of continuous assessment from 1994 to 2005. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52 (1): 288-298.
191. Jelinek T, Schelbert P, Löscher T, Eichenlaub D. Quinine resistant *falciparum* malaria acquired in east Africa. *Trop Med Parasitol.* 1995; 46 (1): 38-40.
192. Pradines B, Mabika M, Parzy D, Owono M, Lebeau C, Mourou JR, et al. In vitro susceptibility of Gabonese wild isolates of *Plasmodium falciparum* to artemether, and comparison with chloroquine, quinine, halofantrine and amodiaquine. *Parasitol.* 1998; 117 (6): 541-545.
193. Mutanda LN: Assessment of drug resistance to the malaria parasite in residents of Kampala, Uganda. *East Afr Med J.* 1999; 76 (8): 421-424.
194. Tinto H, Rwagacondo C, Karema C, Mupfasoni D, Vandoren W, Rusanganwa E, et al. In vitro susceptibility of *Plasmodium falciparum* to monodesethylamodiaquine, dihydroartemisinin and quinine in an area of high chloroquine resistance in Rwanda. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006; 100 (6): 509-514.
195. Toure AO, Kone LP, Jambou R, Konan TD, Demba S, Beugre GE, et al. In vitro susceptibility of *P. falciparum* isolates from Abidjan (Cote d'Ivoire) to quinine, artesunate and chloroquine. *Sante.* 2008; 18 (1): 43-47.
196. Schmidt LE, Dalhoff K. Food-Drug Interactions. *Drugs.* 2002; 62 (10): 1481-1502.
197. Pinheiro PNQ, Peniche JSR, Schalche TR, Ferreira MES, Campos ARF. Aspectos farmacológicos do antimalárico lumefantrina. *Rev Paraense Medicina.* 2013; 27 (1): 63-67.
198. Sisowath C, Stromberg J, Martensson A, Msellem M, Obondo C, Bjorkman A, et al. In vivo Selection of *Plasmodium falciparum* pfm_{dr1} 86N coding Alleles by Artemether-Lumefantrine (AL). *J Infect Dis.* 2005; 191: 1014-1017.
199. Sisowath C, Ferreira EP, Bustamente LY, Dahlstrom S, Martensson A, Bjorkman A, et al. The role of *mdr1* in *Plasmodium falciparum* tolerance to artemether-lumefantrine in Africa. *Trop Med Int Health.* 2007; 12 (6): 736-742.
-

Referências Bibliográficas

200. Meshnick SR. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *Int J Parasitol.* 2002; 32: 1655-1660.
201. Tang Y, Dong Y, Vennerstrom JL. Synthetic peroxides as antimalarials. *Med Research Rev.* 2004; 24 (4): 425-448.
202. Opsenica DM, Solaja BA. Artemisinins and synthetic peroxides as highly efficient antimalarials. *Macedonian J Chem and Chemical Engineering.* 2012; 31 (2): 137-182.
203. Illett KF, Batty KT, Powell SM, Binh TQ, Thu LTA, Phuonh HL, et al. The pharmacokinetic properties of intramuscular artesunate and rectal dihydroartemisinin in uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *J Clin Pharmacol.* 2002; 53: 23-30.
204. Krishna S, Uhlemann A, Haynes RK. Artemisinins: Mechanisms of action and potential for resistance. *Drug Resistance Updates.* 2004; 7: 233-244.
205. Ploypradith P. Development of artemisinin and its structurally simplified trioxane derivatives as antimalarial drugs. *Acta Tropica.* 2004; 89: 329-342.
206. Pukrittayakamee S, Chotivanich K, Chantha A, Clemens R, Looareesuwan S, White NJ. Activities of artesunate and primaquine against asexual and sexual-stage parasites in falciparum malaria. *Antimicrob Ag Chemother.* 2004; 48 (4): 1329-1334.
207. Woodrow CJ, Krishna S. Artemisinins. *Postgrad Med J.* 2005; 81:71-78.
208. Okell LC, Drakeley CJ, Ghani AC, Bousema T, Sutherland CJ. Reduction of transmission from malaria patients by artemisinin combination therapies: a Pooled Analysis of Six Randomized Trials. *Malaria J.* 2008; 7:125.
209. Winstanley P, Ward S. Malaria Chemotherapy. *Advances in Parasitol.* 2006; 61: 47-76.
210. Cui L, Su XZ. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009; 7: 999-1013.
211. Klonis N, Crespo-Ortiz MP, Bottova I, Abu-Bakar N, Kenny S, Rosenthal PJ, et al. Artemisinin activity against *Plasmodium falciparum* requires hemoglobin uptake and

Referências Bibliográficas

- digestion. Proceedings Nat Academy Sciences of the USA. 2011; www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1104063108.
- 212.** Olliaro PL, Haynes RK, Meunier B, Yuthavong Y. Possible modes of action of the artemisinin-type compounds. Trends Parasitol. 2001; 17, 122-126.
- 213.** Krishna, S. Woodrow CJ, Staines HM, Haynes RK, Mercereau-Puijalon O. Re-evaluation of how artemisinins work in light of emerging evidence of in vitro resistance. Trends in Molec. Med. 2006; 12 (5): 200-205.
- 214.** Golenser J, Waknine JH, Krugliak M, Hunt NH, Grau GE. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. Int J Parasitol. 2006; 36 (14): 1427-1441
- 215.** O'Neill PM, Barton VE, Ward SA. The molecular mechanism of action of artemisinin—the debate continues. Molecules. 2010; 15: 1705-1721.
- 216.** Walker DJ, Pitsch JL, Peng MM, Robinson BL, Peters W, Bhisutthibhan J, et al. Mechanisms of artemisinin resistance in the rodent malaria pathogen *Plasmodium yoelii*. Antimicrob Ag Chemother. 2000; 44 (2): 344-347.
- 217.** Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, van Goethem IDA, East JM, Lee AG, Kimura M, et al Krishna S. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. Nature. 2003; 424: 957- 961.
- 218.** Ding XC, Beck H, Raso G. *Plasmodium* sensitivity to artemisinins: magic bullets hit elusive targets. Trends Parasitol. 2011; 27 (2): 73-81.
- 219.** Mita T, Tanabe K. Evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance: implications for the development and containment of artemisinin resistance. Japanese J Infec Dis. 2012; 65: 465-475.
- 220.** Jambou R, Legrand E, Niang M, Khim N, Lim P, Volney B, et al. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. Lancet. 2005; 366 (9501): 1960-1963.
-

Referências Bibliográficas

221. Anderson TJC, Nair S, Qin H, Singlam S, Brockman A, Paiphun L, et al. Are transporter genes other than the chloroquine resistance locus (*pfcr1*) and multidrug resistance gene (*pfmdr1*) associated with antimalarial drug resistance. *Antimicrob Ag Chemother*. 2005; 49 (6): 2180-2188.
222. Hunt P, Afonso A, Creasey A, Culleton R, Sidhu ABS, Logan J, et al. Gene encoding a deubiquitinating enzyme is mutated in artesunate- and chloroquine-resistant rodent malaria parasites. *Molec Microbiol*. 2007; 65 (1): 27-40.
223. Price RN, Uhlemann AC, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, et al. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet*. 2004; 264: 438-447.
224. Dokomajilar C, Nsohya 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. *Antimicrob Ag Chemother*. 2006; 50:1893-1895.
225. Holmgren G, Bjorkman A, Gil P. Amodiaquine resistance is not related to rare findings of *pfmdr1* gene amplifications in Kenya. *Trop Med Int Health*. 2006; 11(12): 1808-1812.
226. Dahlstrom S, Veiga MI, Ferreira P, Martensson A, Kaneko A, Andersson B, et al. Diversity of sarco/endoplasmic reticulum Ca⁺⁺ATPase orthologue of *Plasmodium falciparum* (*PfATP6*). *Infection Genetics and Evolution* 2008, 8: 340-345.
227. Ibrahim ML, Khim N, Adam HH, Ariey F, Duchemin JB. Polymorphism of PfATPase in Niger: detection of three new point mutations. *Malaria J*. 2009; 8: 28.
228. Uhlemann A C, Cameron A, Eckstein-Ludwig U, Fischbarg J, Iserovich P, Zuniga FA, et al. A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinin. *Nature Struct Molec Biol*. 2005; 12 (7): 628-629.

Referências Bibliográficas

229. Valderramos SG, Scanfeld D, Uhlemann A, Fidock DA, Krishna S. Investigations into the role of the *Plasmodium falciparum* SERCA (PfATP6) L263E mutation in artemisinin action and resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54, 3842-3852.
230. Jambou R, Martinelli A, Pinto J, Gribaldo S, Legrand E, Niang M, et al. Geographic Structuring of the *Plasmodium falciparum* Sarco (endo) plasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase (PfSERCA) Gene Diversity. *PLoS One*. 2010; 5 (2): e9424.
231. 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; 2 (3): 353-362.
232. Arieu F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2014, 505:50-55.
233. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, et al. A global map of dominant malaria vectors. *Parasites & Vectors* 2012; 5:69.
234. Wernsdorfer WH. Epidemiology of drug resistance in malaria. *Acta Tropica*. 1994; 56 (2-3): 143-156
235. Verra F, Mangang VD, Modiano D: Genetics of susceptibility to *Plasmodium falciparum*: from classical malaria resistance genes towards genome-wide association studies. *Parasite Immun*. 2009, 31:234-253.
236. Allison AC. Genetic control of resistance to human malaria. *Cur Opin Immunol*. 2009; 21 (5): 499-505.
237. Hedrick PW. Population genetics of malaria resistance in humans. *Heredity*. 2011; 107: 283-304.
238. Williams TN, Mwangi TW, Wambua S, Alexander ND, Kortok M, Snow RW, et al. Sick cell trait and the risk of *Plasmodium falciparum* malaria and other childhood diseases. *J Infect Dis*. 2005; 192:178-86.
-

Referências Bibliográficas

239. Wambua S, Mwangi TW, Kortok M, Uyoga SM, Macharia AW, Mwacharo JK, et al. The effect of α -thalassaemia on the incidence of malaria and other diseases in children living on the coast of Kenya. *PLoS Med.* 2006; 3 (5): 0643-0651.
 240. Mockenhaupt FP, Ehrhardt S, Gellert S, Otchwemah RN, Dietz E, Anemana SD, et al. α -thalassemia protects african children from severe malaria. *Blood.* 2004; 104:7.
 241. Machado C, Mendes C, do Rosário VE, Arez AP. A contribuição dos polimorfismos humanos do eritrócito na proteção contra a malária. *Revista Pan-Amaz de Saúde.* 2010; 1 (4): 85-96.
 242. Ruwende C, Hill A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria. *J Mol Med.* 1998; 76:581-588.
 243. Carter N, Pamba A, Duparc S, Waitumbi JN. Frequency of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in malaria patients from six African countries enrolled in two randomized anti-malarial clinical trials. *Malaria J.* 2011; 10:241.
 244. Durand PM, Coetzer TL. Pyruvate kinase deficiency protects against malaria in humans. *Haematologica.* 2008; 93: 939-940.
 245. Min-Oo G, Fortin A, Tam MF, Nantel A, Stevenson MM, Gross P. Pyruvate kinase deficiency in mice protects against malaria. *Nature Gen.* 2003; 35: 357-362.
 246. Machado P, Manco L, Gomes C, Mendes C, Fernandes N, Graça S, et al. Pyruvate Kinase deficiency in sub-Saharan Africa: Identification of a highly frequent missense mutation (G829A; Glu277 Lys) and association with malaria. *PLoS One.* 2012; 7 (10): e47071.
 247. Mackinnon MJ, Mwangi TW, Snow RW, Marsh K, Williams TN. Heritability of malaria in Africa. *PLoS Med.* 2005; 2 (12): e340.
 248. Sambo MR, Trovoada MJ, Benchimol C, Quinhentos V, Gonçalves L, Velosa R, et al. Transforming growth factor beta 2 and heme oxygenase 1 genes are risk factors for the cerebral malaria syndrome in Angolan children. *Plos One.* 2010; 16; 5: e1114 (1-10).
-

Referências Bibliográficas

249. Kurtzhals JA, Reimert CM, Tette E, Dunyo SK, Koram KA, Akanmori BD, et al. Increased eosinophil activity in acute *Plasmodium falciparum* infection-association with cerebral malaria. Clin Exp Immunol. 1998, 112: 303-307.
250. Young JD, Peterson CG, Venge P, Cohn ZA: Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. Nature. 1986, 321: 613-616.
251. Waters LS, Taverne J, Tai P, Spray CJF, Targett GAT, Playfair JHL. Killing of *Plasmodium falciparum* by eosinophil secretory products. infection and immunity. 1987, 55 (4): 877-881.
252. Lehrer RI, Szklarek D, Barton A, Ganz T, Hamann KJ, Gleich GJ: Antibacterial properties of eosinophil major basic protein and eosinophil cationic protein. J Immunol. 1989; 142:4428-4434.
253. Hamann KJ, Gleich GJ, Checkel JL, Loegering DA, McCall JW, Barker RL. *In vitro* killing of microfilariae of *Brugia pahangi* and *Brugia malayi* by eosinophil granule proteins. J Immunol. 1990; 144: 3166-3173.
254. Walsh GM. Eosinophil granule proteins and their role in disease. Curr Opin Hematol. 2001; 8: 28-33.
255. Kim Y, Kumaraswami V, Choi E, Mu J, Follmann DA, Zimmerman P, et al. Genetic polymorphisms of eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein in tropical pulmonary eosinophilia. Am J Trop Med Hyg. 2005; 73 (1): 125-130.
256. Adu B, Doodoo D, Adukpo S, Gyan BA, Hedley PL, Goka B, et al. Polymorphisms in the RNASE3 gene are associated with susceptibility to cerebral malaria in Ghanaian children. PLoS One. 2011; 6 (12): e29465.
257. White NJ. Assessment of the pharmacodynamic properties of antimalarial drugs in vivo. Antimicrob Ag Chemother. 1997; 41 (7): 1413-1422.
258. Wernsdorfer WH, Payne D. The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. Pharmacol Ther. 1991; 50 (1): 95-121

Referências Bibliográficas

259. White NJ. Cerebral malaria. *Practical Neurol.* 2004; 4: 20-29.
260. Ballereau F, Prazuck T, Schrive I, Lafleuriet MT, Rozec D, Fisch A, et al. Stability of essential drugs in the field: results of a study conducted over a two-year period in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg.* 1997, 57 (1): 31-6.
261. Shakoor O, Taylor RB, Behrens RH. Assessment of the incidence of substandard drugs in developing countries. *Trop Med Int Health.* 1997; 2 (9): 839-45.
262. Djimdé A, Lefèvre G. Understanding the pharmacokinetics of AL. *Malaria J.* 2009; 8 (1): S4.
263. Valderramos SG, Fidock, DA. Transporters involved in resistance to antimalarial drugs. *Trends Pharm Sci.* 2006; 27 (11): 594-601.
264. Woodrow CJ, Krishna S. Antimalarial drugs: recent advances in molecular determinants of resistance and their clinical significance. *Cell Mol Life Sci.* 2006; 63: 1586-1596.
265. Trotta RF, Brown ML, Terrell JC, Geyer JA. Defective DNA repair as a potential mechanism for the rapid development of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry.* 2004; 43 (17): 4885-91.
266. Mita T, Tanabe K, Kita K. Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance. *Parasitol Int.* 2009; 58: 201-209.
267. Ekland EH, Fidock DA. Advances in understanding the genetic basis of antimalarial drug resistance. *Current Op Microbiol.* 2007; 10 (4): 363-370.
268. Sibley CH, Price RN. Monitoring antimalarial drug resistance: Applying lessons learned from the past in a fast-moving present. *Int J Parasitol: Drugs Drug Resist.* 2012; 126-133.
269. Baird JK. Effectiveness of antimalarial drugs. *N Engl J Med.* 2005; 352:1565-1577.

Referências Bibliográficas

270. Alker AP, Lim P, Sem R, Shah NK, Yi P, Bouth DM, Tsuyuoka R, et al. Pfm^{dr1} and in vivo resistance to artesunate-mefloquine in *falciparum* malaria on the Cambodian-Thai border. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 76 (4): 641-647.
271. Uhlemann AC, Krishna S. Antimalarial multi-drug resistance in Asia: mechanisms and assessment. *Curr Trop Microbiol Immunol.* 2005; 295:39-53.
272. World Health Organization 2006. WHO guidelines for the treatment of malária. WHO/HTM/MAL/2006.1108
273. Miller LH, Su K. Artemisinin: Discovery from the Chinese Herbal Garden. *Cell.* 2011; 146 (6): 855-858.
274. Price RN, Nosten F, Luxemburger C, ter Kuile FO, Paiphun L, Chongsuphajaisiddhi T, et al. Effects of artemisinin derivatives on malaria transmissibility. *Lancet.* 1996; 347:1654-1658.
275. Bousema T, Okell L, Shekalaghe S, Griffin JT, Omar S, Sawa P, et al. Revisiting the circulation time of *Plasmodium falciparum* gametocytes: molecular detection methods to estimate the duration of gametocyte carriage and the effect of gametocytocidal drugs. *Malaria J.* 2010; 9:136.
276. Luxemburger C, Brockman A, Silamut K, Nosten F, van Vugt M, Gimenez F, et al. Two patients with *falciparum* malaria and poor in vivo responses to artesunate. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1998; 92: 668-669.
277. Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM. Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia. *New Engl J Med.* 2008; 359 24: 2619-2620
278. Noedl H, Socheat D, Satimai W. Artemisinin-Resistant Malaria in Asia. *New Engl J Med.* 2009; 361 (5): 540-541.
279. Noedl H, Se Y, Sriwichai S, Schaecher K, Teja-Isavadharm P, Smith B, et al. Artemisinin Resistance in Cambodia: A Clinical Trial Designed to Address an
-

Referências Bibliográficas

- Emerging Problem in Southeast Asia. *Oxford J Med Clin Inf Dis*. 2010; 51 (11): e 82-88.
280. Dondorp AM, Nsten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 2009; 361: 455-467.
281. Ferreira PE, Culleton R, Gil JP, Meshnick SR. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*: what is it really? *Trends in Parasitol*. 2013; (7): 318-320.
282. Fernandes NE, Cravo P, do Rosário VE. [Sulfadoxine-pyrimethamine resistance in Maputo, Mozambique: presence of mutations in the dhfr and dhps genes of *Plasmodium falciparum*]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007; 40 (4): 447-450.
283. Enosse S, Magnussen P, Abacassamo F, Gómez-Olivé X, Ronn AM, Thompson R, et al. Rapid increase of *Plasmodium falciparum* dhfr/dhps resistant haplotypes, after the adoption of sulphadoxine-pyrimethamine as first line treatment in 2002, in southern Mozambique. *Malaria J*. 2008; 7:115.
284. Programa Nacional de Controlo da Malária. Inquérito nacional sobre indicadores de malária em Moçambique; 2007. http://www.malariasurveys.org/documents/IMM_Inquerito_Malaria_2007.
285. INE - Instituto Nacional de Estatística. Ministério da Saúde. Maputo, Moçambique. MEASURE DHS/ICF International, Março 2013.
286. WHO 2011. Hemoglobin concentration for the diagnosis of anemia and assessment of severity. In: System VMNIS/Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Editor: Geneva. WHO 2011. (<http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin>).
287. Zwang J, Ndiaye J, Djimde A, Dorsey G, Martensson A, Karen C, et al. Comparing changes in haematologic parameters occurring in patients included in randomized controlled trials of artesunate-amodiaquine vs single and combination treatments of uncomplicated *falciparum* in sub-Saharan Africa. *Malaria J*. 2012; 11:25.
-

Referências Bibliográficas

288. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu X, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario V E, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol.* 1993; 61, 315-320.
289. Viriyakosol S, Siripoon N, Petcharapirat C, Jarra W, Thaithong S, Brown KN, et al. Genotyping of *Plasmodium falciparum* isolates by the polymerase chain reaction and potential uses in epidemiological studies. *Bulletin WHO.* 1995; 73 (1): 85-95.
290. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res.* 1988; 16 10881-10890.
291. Kotepui M, Phunphuech B, Phiwklam N, Chupeerach C, Duangmano S. Effect of malarial infection on haematological parameters in population near Thailand-Myanmar border. *Malaria J.* 2014; 13:218.
292. Schneider AG, Premji Z, Felger I, Smith T, Abdulla S, Beck H-P, et al. A point mutation in codon 76 of *pfert* of *P. falciparum* is positively selected for by Chloroquine treatment in Tanzania. *Infect Gen Evol.* 2002; 1:183-189.
293. Humphreys GS, Merinopoulos I, Ahmed J, Whitty CJM, Mutabingwa TK, Sutherland CJ, et al. Amodiaquine and artemether-lumefantrine select distinct alleles of the *Plasmodium falciparum* *mdr1* gene in Tanzanian children treated for uncomplicated malaria. *Antimicrob Ag Chemother.* 2007; 51:991-997.
294. Lekana-Douki JB, Boutamba SDD, Zatra R, Edou SEZ, Ekomy H, Bisvigou U, et al. Increased prevalence of the *Plasmodium falciparum* *pfmdr1* 86N genotype among field isolates from Franceville, Gabon after replacement of chloroquine by artemether-lumefantrine and artesunate-mefloquine. *Infect Genet Evol.* 2011; 11: 512-517.
295. Thomsen TT, Ishengoma DS, Mmbando BP, Lusingu JP, Vestergaard LS, Theander TG, et al. Prevalence of single nucleotide polymorphisms in the *Plasmodium falciparum* Multidrug resistance gene (*pfmdr-1*) in Korogwe district in Tanzania before and after introduction of Artemisinin-Based Combination therapy. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 85: 979- 983.
-

Referências Bibliográficas

296. Froberg G, Jornhagen L, Morris U, Shakely D, Msellem M, Gil J, et al. Decreased prevalence of *Plasmodium falciparum* resistance markers to amodiaquine despite its wide scale use as ACT partner drug in Zanzibar. *Malaria J.* 2012; 11:321.
297. Amor A, Toro C, Fernandez-Martinez A, Baquero M, Benito A, Berzosa P: Molecular markers in *P. falciparum* linked to resistance to anti-malarial drugs in samples imported from Africa over an eight-year period (2002–2010): impact of the introduction of artemisinin combination therapy. *Malaria J.* 2012, 11:100.
298. Gadalla N, Abdallah T, Atwal S, Sutherland C, Adam I. Selection of pfdhfr/pfdhps alleles and declining artesunate/sulphadoxine- pyrimethamine efficacy against *Plasmodium falciparum* eight years after deployment in eastern Sudan. *Malaria J.* 2013; 12:255.
299. Duah N, Matrevi S, de Souza D, Binnah D, Tamakloe M, Opoku V, et al. Increased *pfmdr1* gene copy number and the decline in pfcrt and *pfmdr1* resistance alleles in Ghanaian *Plasmodium falciparum* isolates after the change of antimalarial drug treatment policy. *Malaria J.* 2013; 12:377.
300. Wellems TE, Plowe CV. Chloroquine-resistant malaria. *J Infec Dis.* 2001; 184 (6): 770-776.
301. Miao M, Wang Z, Yang Z, Yuan L, Parker DM, Putaporntip C, et al. Genetic diversity and lack of artemisinin selection signature on the *Plasmodium falciparum* ATP6 in the Greater Mekong Subregion. *PLoS One.* 2013; 8 (3): e59192.
302. Lathia TB, Joshi R: Can hematological parameters discriminate malaria from non malarious acute febrile illness in the tropics? *Indian J Med Sci.* 2004; 58 (6): 239-244.
303. Patel U, Gandhi G, Friedman S, Niranjana S: Thrombocytopenia in malaria. *J Nat Med Association.* 2004; 96 (9): 1212-1214.

Referências Bibliográficas

304. Jallow M, Casals-Pascual C, Ackerman H, Walther B, Walther M, Pinder M, et al. Clinical Features of Severe Malaria Associated with Death: A 13-Year Observational Study in The Gambia. *PLoS One*. 2012; 7(9): e45645.
 305. Noronha E, Alecrim MGC, Romero GAS, Macêdo V. Estudo clínico da malária *falciparum* em crianças em Manaus, AM, Brasil Clinical study of *falciparum* malaria in children in Manaus, AM. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000; 33 (2):185-190.
 306. Moraes MF, Soares M, Arroz M J, do Rosário VE, da Graça JP, Abecasis P. Novos conceitos na esplenomegália malárica hiperreactiva. *Acta Médica Port*. 2003; 16: 41-46.
 307. Jairajpuri ZS, Rana S, Hassan MJ, Nabi F, Jetley S. An analysis of hematological parameters as a diagnostic test for malaria in patients with acute febrile illness: An institutional experience. *Oman Med J*. 2014; 29 (1):12-17.
 308. Erhart LM, Yingyuen K, Chuanak N, Buathong N, Laoboonthai A, Miller RS, et al. Hematologic and clinical indices of malaria in a semi-immune population of Western Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 2004; 70 (1): 8-14.
 309. Price RN, Simpson JA, Nosten F, Luxemburger C, Hkirjaroen L, ter Kuile F, et al. Factors contributing to anemia after uncomplicated *falciparum malaria*. *Am J Trop Med Hyg*. 2001; 65 (5): 614-622.
 310. Sagara I, Piarroux R, Djimde A, Giorgi R, Kayentao K, Doumbo OK, et al. Delayed anemia assessment in patients treated with oral artemisinin derivatives for uncomplicated malaria: a pooled analysis of clinical trials data from Mali. *Malaria J*. 2014; 13:358.
 311. Oguche S, Okafor HU, Watila I, Meremikwu M, Agomo P, Ogala W, et al. Efficacy of Artemisinin-Based combination treatments of uncomplicated *falciparum* malaria in under-five-year-old Nigerian children. *Am J Trop Med Hyg*. 2014; 91(5): 925-935.
 312. Bashawri LAM, Mandil AA, Bahnassy AA, Ahmed MA: Malaria: Hematological aspects. *Annals of Saudi Med*. 2002; 22 (5-6): 372-376.
-

Referências Bibliográficas

313. Ladhani S, Lowe B, Cole AO, Kowuondo K, Newton CRJC. Changes in white blood cells and platelets in children with *falciparum* malaria: relationship to disease outcome. *British J Haematology*. 2002; 119: 839-847.
314. Gerardin P, Rogier C, Ka AS, Jouvencel P, Brousse V, Imbert P. Prognostic value of thrombocytopenia in African children with *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2002; 66 (6): 686-691.
315. Lacerda MVG, MourãoMPG, Coelho HCC, Santos JB. Thrombocytopenia in malaria: who cares? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011; 106 (1): 52-63.
316. World Health Organization. Severe and complicated malaria. Division of Control of Tropical Diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1990; 84: (Suppl2): S1-S65.
317. Wilairatana P, Tangpukdee N, Krudsood S. Definition of hyperparasitémia in severe *falciparum* malaria should be updated. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013; 3(7): 586.
318. Tangpukdee N, Krudsood, Kano S, Wilairatana P. *Falciparum* malaria parasitemia index for predicting severe malária. *Int Jnl Lab Hem*. 2012; 34: 320-327.
319. Marsh K, Snow R W. Host-parasite interaction and morbidity in malaria endemic areas. *Philos Tran. R Soc*. 1997; 352: 1385-1394.
320. Doolan DL, Doban C, Baird JK. Acquired Immunity to Malaria. *Clin Microbiol Rev*. 2009:13-36.
321. Reyburn H, MD Mbatia R, Drakeley C, Bruce J, Carneiro I, Olomi R, et al. Association of transmission intensity and age with clinical manifestations and case fatality of severe *Plasmodium falciparum* malaria. *JAMA*. 2005; 293 (12): 1461-70.
322. Taylor WRJ, White NJ. Malaria and lung. *Clin Chest Med*. 2002; 23: 457- 468.
323. Molyneux ME, Taylor TE, Wirima JJ, Borgsteinj A. Clinical features and prognostic indicators in pediatric cerebral malaria: A study of 131 comatose Malawian children. *QJM*.1989; 71: 441-459.

Referências Bibliográficas

324. Lacerda-Queiroz N, Teixeira MM, Teixeira AL. Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Rev Bras Neurol.* 2008; 44 (1): 13-19.
325. Idro R, Gwer S, Kahindi M, Gatakaa H, Kazungu T, Ndiritu M, et al. The incidence, aetiology and outcome of acute seizures in children admitted to a rural Kenyan district hospital *BMC. Pediatrics.* 2008; 8:5.
326. Kariuki SM, Ikumi M, Ojal J, Sadarangani M, Idro R, Olotu A, et al. Acute seizures attributable to *falciparum* malaria in an endemic area on the Kenyan coast. *Brain.* 2011; 134: 1519-1528.
327. Opoka RO, Bangirana P, Boivin MJ, John CC, Byarugaba J. Seizure activity and neurological sequelae in Ugandan children who have survived an episode of cerebral malaria. *African Health Sci.* 2009; 9 (2): 75-81.
328. Zucker JR, Lackritz EM, Ruebush TK, Hightower AW, Adungosi JE, Were JBO, et al. Childhood mortality during and after hospitalization in Western Kenya: effect of malaria treatment regimens. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 55: 655- 665.
329. Obonyo CO, Vulule J, Akhwale WS, Grobbee DE. In-hospital morbidity and mortality due to severe malarial anemia in Western Kenya. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77 (6): 23-28.
330. Farias MG, Bó SD. The clinical and laboratory importance of mean platelet volume. *J Bras Patol Med Lab.* 2010; 46 (4): 275-281.
331. Modiano D, J Sirima BS, Konatk A, Sanou I, Sawadogo A. Leucocytosis in severe malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001; 95:175-176
332. Berkley J, Mwarumba S, Bramham K, Lowe B, Marsh K. Bacteraemia complicating severe malaria in children. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 999; 93:283-286.
333. Farnet A, Gwer S, Berlley JA. Clinical considerations for antibiotic choices in the treatment of severe malaria. *Trends Parasitol.* 2010; 26: 465-466.
-

Referências Bibliográficas

334. Scott JSG, Berkley JA, Mwangi I, Ochola L, Uyoga S, Macharia A, et al. Relation between *falciparum* malaria and bacteraemia in Kenyan children: a population-based, case-control study and a longitudinal study. *Lancet*. 2011; 378: 1316-1323.
335. Nadjm B, Amos B, Mtove G, Ostermann J, Chonya S, Wangai H, et al. WHO guidelines for antimicrobial treatment in children admitted to hospital in an area of intense *Plasmodium falciparum* transmission: prospective study. *BMJ* 2010; 340:c1350.
336. Viriyavejakulet P, Khachonsaksumet V, Punsawad C. Liver changes in severe *Plasmodium falciparum* malaria: histopathology, apoptosis and nuclear factor kappa B expression. *Malaria J*. 2014; 13: 106.
337. Amaral CN, Albuquerque YD, Pinto AYN, Souza JM. A importância do perfil clínico-laboratorial no diagnóstico diferencial entre malária e hepatite aguda viral/Importance of clinical and laboratory profiles for the differential diagnosis of malaria and acute viral hepatitis. *J Ped*. 2003; 79 (5): 429-434.
338. Baliga KV, Narula AS, Khanduja R, Manrai M, Sharma P, Mani NS. Acute cortical necrosis in *falciparum* malaria: Unusual manifestation. *Renal Failure*. 2008; 30:461-463.
339. Rajapurkar MM. Renal involvement in malaria. *J Postgrad Med*. 1994; 40:132.
340. Issifou S, Kendjo E, Missinou MA, Matsiegui PB, Dzeing-Ella A, Dissanami FA, et al. Differences in presentation of severe malaria in urban and rural Gabon. *Am J Trop Med Hyg*. 2007; 77 (6): 1015-1019.
341. Abu-Raddad LJ, Patnaik P, Kublin JG. Dual infection with HIV and malaria fuels the spread of both diseases in sub-Saharan Africa. *Science* 2006; 314:1603-1606.
342. Berkley JA, Bejon P, Mwangi T, Gwer S, Maitland C, Williams TN, Mohammed S, Osier F, Kinyanjui S, Fegan G, Lowe BS, English M, Peshu N, Marsh K, Newton CRJC. HIV, malnutrition, and invasive bacterial infection among children with severe malaria. *Clin Infect Dis*. 2009; 49:336-343.
-

Referências Bibliográficas

343. Hendriksen ICE, Ferro J, Montoya P, Chhaganlal KD, Seni A, Gomes E, et al. Diagnosis, clinical presentation, and in-hospital mortality of severe malaria in HIV-coinfected children and adults in Mozambique. *Clin Infect Dis*. 2012; 55 (8): 1144-1153.
344. Korenromp EL, Williams BG, de Vlas SJ, Gouws E, Gilks CF, Ghys PD, et al. Malaria attributable to the HIV-1 epidemic, sub-Saharan Africa. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11 (9): 1410-1419.
345. Thomsen TT, Madsen LB, Hansson HH, Tomás EVE, Charlwood D, Bygbjerg IC, et al. Rapid Selection of *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene and multidrug resistance gene-1 haplotypes associated with past chloroquine and present artemether-lumefantrine use in Inhambane district, southern Mozambique. *Am J Trop Med Hyg*. 2013; 88 (3): 536-541.
346. Allen EN, Little F, Camba T, Cassam Y, Raman J, et al. Efficacy of sulphadoxine-pyrimethamine with or without artesunate for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in southern Mozambique: a randomised controlled trial. *Malaria J*. 2009; 8: 141.
347. Mobula L, Lilley B, Tshetu AK, Rosenthal PJ. Resistance-mediating polymorphisms in *Plasmodium falciparum* infections in Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. *Am J Trop Med Hyg*. 2009; 80: 555-558.
348. Ramman J, Mauff K, Muianga P, Mussa A, Maharaj R, Barnes KI: Five years of antimalarial resistance marker surveillance in Gaza Province, Mozambique, following artemisinin-based combination therapy roll out. *PLoS One*. 2011; 6:e25992.
349. Song J, Socheat D, Tan B. Randomized trials of artemisinin-piperaquine, dihydroartemisinin-piperaquine phosphate and artemether-lumefantrine for the treatment of multi-drug resistant falciparum malaria in Cambodia-Thailand border area. *Malaria J*. 2011; 10: 231
-

Referências Bibliográficas

350. Phyo AP, Nkhoma S, Stepniwska K, Ashley EA, Nair S, McGready R, et al. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet*. 2012; 379 (9830): 1960-1966.
351. Naidoo I, Roper C: Following the path of most resistance: dhps K540E dispersal in African *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol*. 2010; 26:447-456.
352. Roper C, Pearce R, Nair S, Sharp B, Nosten F, Anderson T. Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria. *Science*. 2004; 305:1124
353. Mukhtar EA, Gadalla NB, El-Zaki SE, Mukhtar I, Mansour FA, Babiker A, et al. A comparative study on the efficacy of artesunate plus sulphadoxine/pyrimethamine versus artemether-lumefantrine in eastern Sudan. *Malaria J*. 2007; 6: 92.
354. Abuaku B, Duah N, Quaye L, Quashie N, Koram K. Therapeutic efficacy of artemetherlumefantrine combination in the treatment of uncomplicated malaria among children under five years of age in three ecological zones in Ghana. *Malaria J*. 2012; 11:388.
355. Adjuik M, Agnamey P, Babiker A, Borrmann S, Brasseur P, Cisse M, et al. amodiaquine-artesunate versus amodiaquine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in African children: a randomised, multicentre trial. *Lancet*. 2002; 359:1365-1372.
356. Mutabingwa TK, Anthony D, Heller A, Hallett R, Ahmed J, Drakeley C, et al. Amodiaquine alone, amodiaquine+sulfadoxine-pyrimethamine, amodiaquine+artesunate, and artemether-lumefantrine for outpatient treatment of malaria in Tanzanian children: a four-arm randomised effectiveness trial. *Lancet*. 2005; 365: 1474-1480.
357. Martensson A, Stromberg J, Sisowath C, Msellem MI, Gil JP, Montgomery SM, et al. Efficacy of artesunate plus amodiaquine versus that of artemether+lumefantrine for the treatment of uncomplicated childhood *Plasmodium falciparum* malaria in Zanzibar, Tanzania. *Clin Infect Dis*. 2005; 41: 1079-1086.
-

Referências Bibliográficas

358. Bonnet M, Broek I, vanHerp M, Urrutia PP, vanOvermeir C, Kyomuhendo J, et al. Varying efficacy of artesunate + amodiaquine and artesunate + sulphadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in the Democratic Republic of Congo: a report of two in-vivo studies. *Malaria J.* 2009; 8:192.
359. Hamour S, Melaku Y, Keus K, Wambugu J, Atkin S, Montgomery J, et al. Malaria in the Nuba Mountains of Sudan: baseline genotypic resistance and efficacy of the artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine and artesunate plus amodiaquine combinations. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2005; 99: 548-554.
360. Hasugian AR, Purba HL, Kenangalem E, Wuwung RM, Ebsworth EP, Maristela R, et al. Dihydroartemisinin-piperaquine versus artesunate-amodiaquine: superior efficacy and posttreatment prophylaxis against multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria. *Clin Infect Dis.* 2007; 44:1067-1074.
361. Swarthout TD, van den Broek IV, Kayembe G, Montgomery J, Pota H, Roper C. Artesunate + amodiaquine and artesunate + sulphadoxine-pyrimethamine for treatment of uncomplicated malaria in Democratic Republic of Congo: a clinical trial with determination of sulphadoxine and pyrimethamine-resistant haplotypes. *Trop Med Int Health.* 2005; 11: 1503-1511.
362. Rwagacondo CE, Karema C, Mugisha V, Erhart A, Dujardin JC, Van OC, et al. Is amodiaquine failing in Rwanda? Efficacy of amodiaquine alone and combined with artesunate in children with uncomplicated malaria. *Trop Med Int Health.* 2004; 9: 1091-1098.
363. Thwing JI, Odero CO, Odhiambo FO, Otieno KO, Kariuki S, Ord R, et al. In-vivo efficacy of amodiaquine + artesunate in children with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in western Kenya. *Trop Med Int Health.* 2009; 14: 294-300.
364. Smithuis F, Kyaw MK, Phe O, Win T, Aung PP, Oo APP, et al. Effectiveness of five artemisinin combination regimens with or without primaquine in uncomplicated
-

Referências Bibliográficas

- falciparum* malaria: an open-label randomized trial. Lancet Infect Dis. 2010; 10: 673-681.
365. Baliraine FN, Rosenthal PJ. Prolonged selection of *pfmdr1* polymorphisms after treatment of *falciparum* malaria with artemether-lumefantrine in Uganda. J Infect Dis. 2011: 1120-1124.
366. Makanga M, Krudsood S. The clinical efficacy of artemether/lumefantrine (AL). Malaria J. 2009 (Suppl 1): S5.
367. Sinclair D, Zani B, Donegan S, Olliaro P, Garner P. Artemisinin-based combination therapy for treating uncomplicated malaria. Cochrane Database Syst Rev. 2009; CD007483.
368. Stover KR, King ST, Robinson J. Artemether-lumefantrine: an option for malaria. Ann Pharmacother. 2012; 46: 567-577.
369. Ferreira PE, Holmgren G, Veiga MI, Uhle'n P, Kaneko A, Gil JP. *Pfmdr1*: mechanisms of transport modulation by functional polymorphisms. PLoS One. 2011; 6(9): e23875.
370. Venkatesan M, Gadalla NB, Stepniewska K, Dahal P, Nsanzabana C, Moriera C et al, Parasite genes and resistance to AL and ASAQ. Am Soc Trop Med Hyg. 2014; doi 10.4269/ajtmh.14-0031.
371. Happi CT, Gbotosho GO, Folarin OA, Sowunmi A, Hudson T, O'Neil M, et al. Selection of *Plasmodium falciparum* multidrug resistance gene 1 alleles in asexual stages and gametocytes by artemether-lumefantrine in Nigerian children with uncomplicated *falciparum malaria*. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53: 888-895.
372. Khalil IF, Alifrangis M, Tarimo DS, Staalsø T, Satti GMH, Theander TG, et al. The roles of the *pfprt* 76 T and *pfmdr* 186Y mutations, immunity and the initial level of parasitaemia, in predicting the outcome of chloroquine treatment in two areas with different transmission intensities. Ann Trop Med Parasitol. 2005; 99:441-448.
-

Referências Bibliográficas

373. Kublin JG, Cortese JF, Njunju EM, Mukadam GRA, Wirima JJ, Kazembe PN, et al. Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *J Infect Dis.* 2003, 187:1870-1875.
374. Fröberg G, Ferreira PE, Mårtensson A, Ali A, Björkman A, Gil JP. Assessing the cost-benefit effect of a *Plasmodium falciparum* drug resistance mutation on parasite growth in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57: 887-892.
375. Mungthin M, Suwandittakul N, Chaijaroenkul W, Rungsrihirunrat K, Harnyuttanakorn P, Seugorn A, et al. The patterns of mutation and amplification of *Plasmodium falciparum* *pfert* and *pfmdr1* genes in Thailand during the year 1988 to 2003. *Parasitol Res.* 2010; 107: 539-545.
376. Sutherland CJ, Allouche A, Curtis J, Drakeley CJ, Ord R, Duraisingh M, et al. Gambian children successfully treated with chloroquine can harbor and transmit *Plasmodium falciparum* gametocytes carrying resistance genes. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 67:578-585.
377. Zeile I, Gahutu JB, Shyirambere C, Steininger C, Musemakweri A, Sebahungu F, et al. Molecular markers of *Plasmodium falciparum* drug resistance in southern highland Rwanda. *Acta Trop.* 2012; 121: 50-54.
378. Gadalla NB, Adam I, Elzaki S, Bachir S, Mukhtar I, Oguike M et al. Increased *pfmdr1* copy number and sequence polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Sudanese malaria patients treated with artemether-lumefantrine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55, 5408-5411.
379. Ngalah BS, Ingasia LA, Cheruiyot AC, Chebon LJ, Juma DW, Muiruri P et al. Analysis of major genome loci underlying artemisinin resistance and *pfmdr1* copy number in pre-and post-ACTs in Western Kenya. *Sci.* 2015; (5): 8308.

7 - ANEXOS

Anexos

Anexo 1



Anexo 2



CONSENTIMENTO INFORMADO

Título do Estudo	Estudo da eficácia terapêutica “ <i>in vivo</i> ” das combinações baseadas em derivados da artemisinina no tratamento da malária em Maputo.
Investigadores Responsáveis	Dra. Natércia Pedro Fernandes, Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane, Moçambique, E-mail: natercia2007 natercia2007@gmail.com Tel.: +25882306789
Investigadores Participantes	Dra. Fatima de Carvalho Nogueira, UEI Medical Parasitology do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Portugal, E-mail: fnogueira@ihmt.unl.pt Tel.: +351965603013 Dra. Elsa da Conceição Lobo, Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane, Moçambique, E-mail: loboelsa@yahoo.com.br Telefone: +258847241226

Sabia que Moçambique é um dos 10 países no mundo mais afectados pela malária? A malária é causada por pequenos micróbios (uma espécie de bichinhos) chamados plasmódios. Estes plasmódios vivem dentro de umas células do sangue, e provocam doença fazendo com que a pessoa tenha febre, arrepios, dor de cabeça, vómitos, diarreia, falta de apetite e fraqueza. Em alguns casos a malária pode tornar-se grave e até provocar a morte.

Normalmente as pessoas que têm malária podem ser tratadas com comprimidos quando não estão muito graves e quando estão graves são tratadas com outros medicamentos que são dados com soros nas veias. Infelizmente os medicamentos que até agora são usados já não estão a fazer muito efeito e por isso estão a ser substituídos por outros que já foram testados em outros Países da África e da Ásia e provaram ser melhores para tratar a malária.

Gostaríamos de fazer um estudo para verificar em primeiro lugar como se apresentam os nossos doentes que tem malária e qual é o efeito dos novos medicamentos que estão atualmente a ser usados nos nossos doentes em Maputo.

Anexos

Hoje, no caso de aceitar que você próprio ou o doente que acompanha participe neste estudo, pedimos-lhe que nos autorize a usar parte do sangue que lhe é habitualmente retirado para as análises no sentido de serem realizadas mais análises e a consultar o seu processo clínico para recolher alguns dados necessários para o estudo. Se não concordar em participar neste estudo, não haverá nenhum problema nem para si nem para o seu doente. O médico continuará a tratar-lhe a si ou ao seu doente da melhor maneira possível e de acordo com as normas do hospital.

Caso tenha alguma dúvida ou perguntas sobre este estudo, pode falar com as pessoas que lhe entregaram este documento.

Declaro, que li ou me foi lida a informação acima descrita e tive a oportunidade de fazer perguntas, as quais me foram satisfatoriamente respondidas. Assim, concordo em participar no referido estudo e entendo que tenho o direito de o abandonar em qualquer momento, sem que isso afete o meu tratamento por parte dos clínicos que me atendem nesta unidade sanitária.

Nome e assinatura do membro da equipa de estudo que leu e explicou o texto

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome e assinatura ou impressão digital do responsável pelo doente ou do próprio:

Nome: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Anexos

Anexo 3

Diagnóstico de malária *P. falciparum* por Microscopia Ótica

1-Deteção e identificação parasitária

A identificação parasitária por microscopia ótica foi efetuada mediante exame da lâmina obedecendo aos seguintes passos: 1) identificação da lâmina; 2) assépsia da face lateral do dedo do paciente com algodão embebido em álcool a 70%; 3) punção digital com auxílio de uma lanceta descartável; 4) colheita de 2 gotas de sangue e colocação sobre a lâmina sendo uma para o exame da gota espessa e outra para a realização do esfregaço; 6) fixação do esfregaço com solução de álcool metílico 7) coloração da lâmina com solução de Giemsa a 15% por um período entre 20 a 30 minutos 8) lavagem da lâmina com água corrente; 9) leitura da lâmina ao microscópio ótico com auxílio da objetiva de imersão (100x). Após cada etapa procedeu-se à secagem da lâmina à temperatura ambiente. Por concentrar maior quantidade de sangue, a gota espessa foi analisada para deteção da infeção e o esfregaço para identificação da espécie de parasita infetante e determinação da densidade parasitária.

2- Determinação da densidade parasitária

A densidade parasitária foi calculada mediante observação microscópica do esfregaço sanguíneo, em função do número de parasitas por microlitro de sangue (W.H.O –BasicLaboratoryMethods in Medical Parasitology., 1991), com base na presunção da existência de 8.000 leucócitos por microlitro de sangue. Para a sua determinação foram observados vários campos microscópicos nos quais se fez a contagem de leucócitos até um número padronizado correspondente a 200 leucócitos por campo enquanto ao mesmo tempo se fez o registo do número de parasitas neles existentes, cujo número foi calculado mediante a seguinte fórmula:

$$\text{Parasitémia} = \frac{\text{número de parasitas} \times 8000 \text{ (leucócitos}/\mu\text{l)}}{200 \text{ leucócitos}}$$

A correspondência entre a densidade parasitária em número de cruces e em número de parasitas por microlitro de sangue (parasitas/ μl) foi efetuada do seguinte modo:

Correspondência entre o número de cruces e a densidade parasitária

Número de cruces	Densidade parasitária (parasitas/ μl)
+	1 - 4.999
++	5.000 - 19.999
+++	20.000 - 99.999
++++	≥ 100.000

Anexo4

Diagnóstico de malária *P. falciparum* por PCR (Polimerase Chain Reaction)

1-Extração do ADN genómico

O ADN das amostras de sangue foi obtido com recurso ao método de extração com Chelex (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (Singh B, 1996), estabelecido no laboratório da UEI Malária/IHMT/CMDT LA. Com auxílio de uma tesoura e uma pinça previamente imersas em ácido clorídrico (HCL) foi cortada uma pequena porção do papel de filtro contendo a gota de sangue (o correspondente a cerca de 50 µl de eritrócitos parasitados), a qual foi colocada em um tubo de micro-centrifuga (*ependorff*) de 1,5 ml. A hemólise dos eritrócitos parasitados foi efetuada mediante adição de 1 ml de solução tampão PBS (*phosphate buffered saline*) e 50 ml de saponina a 10% tendo-se deixado esta mistura em incubação a 4° C por cerca de 12 horas durante a noite. De seguida foi feita uma lavagem com PBS e nova incubação a 4° C por 30 minutos. A extração do ADN foi realizada mediante adição de 75 µl de solução de Chelexem Água Milli-Q a 20% (Biorad). A seguir, os tubos *ependorff* foram aquecidos em um bloco (Dryblockheater BBD-Grant-Boekel) a 99°C durante 15 minutos, após o que se procedeu à centrifugação (10000g/2min), a fim de separar o sobrenadante contendo o ADN, dos restantes componentes da mistura (papel de filtro e Chelex) através da sedimentação. O ADN extraído foi conservado em aliquotas a -20° C até à amplificação por PCR.

2-Deteção das espécies

Para deteção da espécie de *Plasmódium* presente nas amostras, foram realizadas duas reações consecutivas de PCR. Na primeira reação foi utilizado um par de *primers* específico para o género *Plasmodium* (rPLU) e na segunda foram utilizados *primers* específicos para quatro espécies de *Plasmodium*, nomeadamente: *P. falciparum* (rFAL), *P. vivax* (rVIV), *P. ovale* (rOVA) e *P. malariae* (rMAL). As condições de amplificação, mistura das reações e sequências dos *primers* encontram-se na Tabela que se segue. A mistura das reações de amplificação foi constituída por: 1µM de cada *primer*, 10X tampão de PCR (Fermentas), 1 mM MgCl₂ (Fermentas), 1 mM dNTP's (Fermentas) e 120 U/ml de *TaqADN* polimerase (Fermentas). Para a primeira reação de PCR utilizou-se 1µl e para o 2º Nested utilizou-se 1,3 µL do produto da primeira reação de PCR. Apenas os isolados onde se identificou a espécie *P. falciparum*, em D0, foram selecionados para o estudo.

Anexos

Condições de amplificação e sequências dos *primers* utilizados nas reacções de PCR para a identificação das espécies de *Plasmodium*.

Reacção de PCR	Sequência de <i>primers</i> (5' - 3')	Condições de amplificação	Tamanho do fragmento amplificado
1^a	rPLU5 -CTTGGTTGCTTAAACTTC rPLU6 - TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG	95°C – 5 min	1,2 Kb Género <i>Plasmodium</i>
		94°C – 1 min x(25)	
		58°C – 2 min x(25)	
		72°C – 2 min x(25)	
2^a	rFAL1 - TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAA rFAL2 - ACACAATGAACTCAATCATGACTA	95°C – 5 min	205pbs <i>P. falciparum</i>
		94°C – 1 min x(30)	
		58°C – 2 min x(30)	
		72°C – 2 min x(30)	
2^a	rVIV1 - CGCTTCTAGCTTATCCACATAAC rVIV2 - ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAG	95°C – 5 min	120pbs <i>P. vivax</i>
		94°C – 1 min x(35)	
		58°C – 2 min x(35)	
		72°C – 2 min x(35)	
2^a	rMAL1 - ATAACATAGTTGTACGTTAAGAAT rMAL2 - AAATTCCTGCATATAAAAAATTA	95°C – 5 min	144pbs <i>P. malariae</i>
		94°C – 1 min x(30)	
		58°C – 2 min x(30)	
		72°C – 2 min x(30)	
2^a	rOVA1 - ATCTCTTTTGCTATTTTTTAGTAT rOVA2 - GGAAAAGGACACATTAATTGTATC	95°C – 5 min	800pbs <i>P. ovale</i>
		94°C – 1 min x(35)	
		58°C – 2 min x(35)	
		72°C – 2 min x(35)	

3- Eletroforese dos produtos amplificados

Após a amplificação do ADN, os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose. O gel foi preparado mediante mistura do pó de agarose a 2% com uma solução tampão Tris/Borato/Etileno Diamina Tetra Acético (TBE) ao qual se acrescentou brometo de etídio (Sigma, Germany) para permitir a visualização do ADN. Em cada poço do gel foram colocados 10µl do produto amplificado juntamente com um marcador de peso molecular de 100pbs (Fermentas TM) após o que se aplicou uma corrente de 120 volts para a migração do ADN. A visualização dos produtos da PCR foi feita num transiluminador de luz ultravioleta EagleEye II (Stratagene).

Anexos

Anexo 5

Ficha de colheita de dados

(Malaria não complicada)

I. Dados Gerais

1. Código _____
2. Data _____
3. Centro de Saúde _____
4. Nome do entrevistador _____

II. Identificação do Doente

1. Idade: ____ (anos) 2. Sexo ____ 3. Raça ____ 4. Peso ____ 5. Altura ____
6. Local de residência _____

III. Dados clínicos

1. Motivo de Consulta/Queixas Principais

____ Febre	____ Cefaleia	____ Mioartralgia	____ Diarreia
____ Vômitos	____ Dora abdominal	____ Anorexia	

IV. Antecedentes

1. Malária nos últimos 12 meses: ____ Sim ____ Não
2. Que tratamento fez? _____
3. Quantos dias durou o tratamento? _____ Número de doses tomadas _____
4. Utiliza algum tipo de prevenção contra a Malária? ____ Sim ____ Não
Se sim qual? ____ Rede ____ Insecticidas ____

Anexos

V. Dados clínicos

Dia	Temperatura	Icterícia	Hepatomegália	Espelnomegália	desidratação
D0					
D7					
D14					

VI. Dados laboratoriais

Dia	Parasitemia (Cruzes)	Hemoglobina	Plaquetas
D0			
D7			
D14			

VII. Tratamento: AL _____ ASAQ _____

VIII. Colheita de sangue (papel de filtro) Sim _____

IX. Observações: _____

Anexos

Anexos

Anexo 6

Frequência das principais manifestações dos pacientes com malária não complicada no dia da admissão (D₀), de acordo com o grupo etário.

	<5anos (n=166) %	5-14 anos (n=127) %	≥15 anos (n=119) %	Total (n=412) %
Febre	83.7	85.8	76.5	82.2
Anemia	79.5	66.9	58.8	69.7
Trombocitopénia	55.4	59.0	63.0	58.7
Cefaleia	7.22	41.7	81.5	39.0
Anorexia	19.3	33.0	33.6	27.7
Mioartralgia	0.6	9.4	55.5	19.1
Vómitos	15.0	22.8	15.9	17.7
Dor abdominal	12.7	19.7	4.2	12.4
Diarreia	12.7	14.2	9.2	12.1
Desidratação	10.2	13.4	4.2	9.5
Esplenomegália	9.6	5.5	0.0	5.6
Icterícia	3.0	3.9	4.2	3.6
Hepatomegália	3.6	2.3	0.0	2.2

Anexos

Anexo 8

Evolução dos valores médios de hemoglobina e plaquetas nas três avaliações efetuadas aos pacientes com MnC seguidos em Boane e 1º de Maio.

Boane AL®	Valor médio de hemoglobina						<i>p-value</i>		
Idade	D ₀	EP	D ₇	EP	D ₁₄	EP	D ₀ -D ₇	D ₇ -D ₁₄	D ₀ -D ₁₄
<5 anos	9,364	0,2062	9,0860	0,1933	10,1870	0,1689	0.6715	0.0001	0.0055
5-14 anos	9,420	0,2757	9,3320	0,2784	10,3070	0,2362	0.3069	0.0001	0.0002
≥15 anos	10,619	0,4748	10,3540	0,3036	11,0690	0,2290	0.5151	0.0150	0.3968

D0- dia da admissão; D7- avaliação ao 7º dia; D14= avaliação ao 14º dia; EP- erro padrão

Boane ASAQ	Valor médio de hemoglobina						<i>p-value</i>		
Idade	D ₀		D ₇		D ₁₄		D ₀ -D ₇	D ₇ -D ₁₄	D ₀ -D ₁₄
<5 anos	8,954	0,2087	8,9510	0,2052	9,5600	0,1958	0.9206	0.0127	0.0320
5-14 anos	10,178	0,2567	9,7700	0,3632	10,0830	0,3259	0.3824	0.3422	0.9425
≥15 anos	11,838	0,3963	10,3350	0,4253	10,9120	0,2885	0.0111	0.3030	0.0743

D0- dia da admissão; D7- avaliação ao 7º dia; D14= avaliação ao 14º dia; EP- erro padrão

Boane AL®	Valor médio de plaquetas						<i>p-value</i>		
Idade	D ₀		D ₇		D ₁₄		D ₀ -D ₇	D ₇ -D ₁₄	D ₀ -D ₁₄
<5 anos	150,870	15,7950	313,0200	15,7950	294,9700	13,2350	<0.0001	0.9149	<0.0001
5-14 anos	150,009	15,9880	278,5000	15,9880	266,4800	13,7250	<0.0001	0.1638	<0.0001
≥15 anos	110,270	17,5730	224,3100	17,5730	228,3800	13,7660	<0.0001	0.8921	<0.0001

D0- dia da admissão; D7- avaliação ao 7º dia; D14= avaliação ao 14º dia; EP- erro padrão

Anexos

Boane ASAQ	Valor médio de plaquetas						<i>p-value</i>		
	D ₀		D ₇		D ₁₄		D ₀ -D ₇	D ₇ -D ₁₄	D ₀ -D ₁₄
<5 anos	178,580	10,6550	298,11 00	15,0030	266,1500	14,776 0	<0.0001	0.3866	<0.0001
5-14 anos	167,550	17,8670	315,68 00	24,4480	285,0800	17,843 0	<0.0001	0.0478	<0.0001
≥15 anos	129,080	13,4590	236,08 00	22,1990	231,3800	17,375 0	<0.0001	0.3255	<0.0002

D0- dia da admissão; D7- avaliação ao 7º dia; D14= avaliação ao 14º dia; EP- erro padrão

1º de Maio AL®	Valor médio de hemoglobina						<i>p-value</i>		
	D ₀		D ₇		D ₁₄		D ₀ -D ₇	D ₇ -D ₁₄	D ₀ -D ₁₄
<5 anos	11,750	0,6534	10,6580	0,5289	10,0750	0,5645	0.2678	0.0670	0.1120
5-14 anos	10,709	0,5217	10,4570	0,3815	9,9130	0,3055	0.0904	0.2595	0.1212
≥15 anos	11,310	0,3598	10,7730	0,3337	10,9040	0,2320	0.0356	0.6745	0.2426

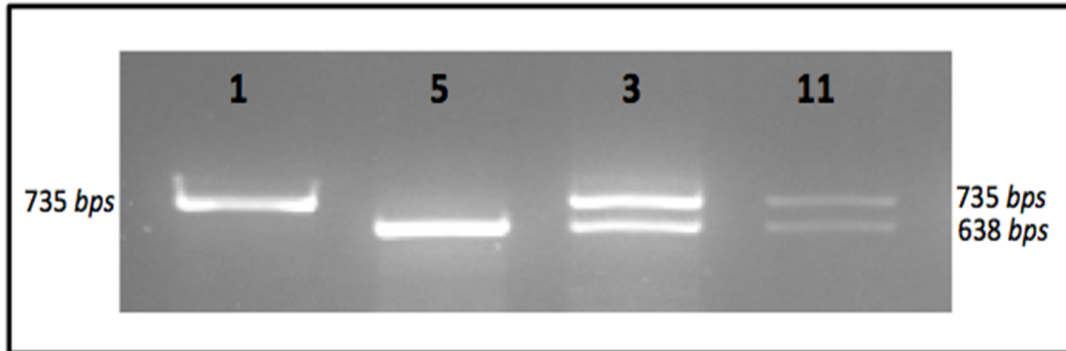
D0- dia da admissão; D7- avaliação ao 7º dia; D14= avaliação ao 14º dia; EP- erro padrão

1º de Maio AL®	Valor médio de plaquetas						<i>p-value</i>		
	D ₀		D ₇		D ₁₄		D ₀ -D ₇	D ₇ -D ₁₄	D ₀ -D ₁₄
<5 anos	123,42	15,1370	327,1 7	53,3850	318,92	49,2850	0.0013	0.7519	<0.0001
5-14 anos	159,39	20,5720	266,3	29,7780	298,87	33,3790	0.0001	0.0346	<0.0001
≥15 anos	157,25	13,3320	271,4 7	18,0040	295,35	18,7670	<0.0001	0.1823	<0.0001

D0- dia da admissão; D7- avaliação ao 7º dia; D14= avaliação ao 14º dia; EP- erro padrão

Anexos

Anexo 9



Fotografia de gel exemplificativo da electroforese dos fragmentos obtidos por PCR-RFLP para a identificação do polimorfismo 371G>C do gene *RNase3*. Gel de agarose a 2%.
1 genótipo GG (homozigótico R); 5 genótipo CC (homozigótico T); 3 e 11 genótipo misto GC (heterozigótico RT);

Anexos

Anexo 10

Frequência relativa dos polimorfismos no gene *pfmdr1* em doentes com malária não complicada, em amostras provenientes dos de Boane e 1º de Maio.* infecções mistas.

Centro de Saúde de Boane

86 (n= 106)	N	67 (63.2)
	Y	29 (27.4)
	NY*	10 (9.4)
184 (n=106)	Y	91(85.8)
	F	15 (14.2)
	YF*	0
1246 (n=104)	D	99 (95.2)
	Y	5 (4.8)
	DY*	0

Centro de Saúde 1º de Maio

86 (n= 78)	N	52 (66.7)
	Y	14 (17.9)
	NY*	12 (15.4)
184 (n=106)	Y	96(90.6)
	F	9 (8.5)
	YF*	1(0.9)
1246 (n=82)	D	80(97.6)
	Y	2 (2.4)
	DY*	0

Frequência relativa dos polimorfismos no gene *pfmdr1* em amostras provenientes de doentes com malária não complicada (Mnc) e malária grave (MG). * infecções mistas.

Malária não complicada (MnC)

86 (n= 340)	N	249 (73.2)
	Y	48 (14.2)
	NY*	43 (12.6)
184 (n=348)	Y	268 (77.0)
	F	79 (22.7)
	YF*	1(0.3)
1246 (n=337)	D	326 (96.7)
	Y	8 (2.4)
	DY*	3 (0.9)

Malária grave (MG)

86 (n= 123)	N	85(69.2)
	Y	19 (15.4)
	NY*	19 (15.4)
184 (n=0)	Y	0
	F	0
	YF*	0
1246 (n=30)	D	30 (100)
	Y	0
	DY*	0

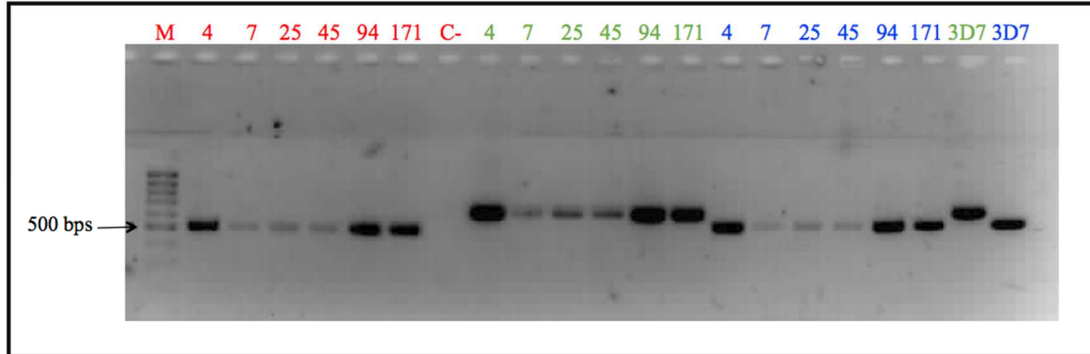
Anexos

Frequência dos polimorfismos N86Y, Y184F e D1246Y no gene *pfmdr1* em Maputo.* infecções mistas.

Codão	Alelo	Frequência n (%)
86 (n= 463)	N	334 (72.0)
	Y	67 (15.0)
	NY*	62 (13.0)
184 (n=348)	Y	268 (77.0)
	F	79 (22.7)
	YF*	1 (0.3)
1246 (n=367)	D	356 (97.0)
	Y	8 (2.2)
	DY*	3 (0.8)

Anexos

Anexo 11



Resultado da amplificação por PCR dos fragmentos do gene *pfatp6* a sequenciar. M, marcador de peso molecular(100bps); C-, controlo negativo (sem DNA genómico); **Fragmento 1**; **Fragmento 2**; **Fragmento 3**.

Alinhamentos das sequências dos fragmentos 1, 2 e3 do gene *pfatp6* de diferentes amostras e do clone 3D7

Fragmento 1

```
561                                                    630
A285F1                NTTATAAAAATTGTGAAATACAGTTGAAA
A94F1                 NTTATAAAAATTGTGAAATACAGTTGAAA
A241F1                NAGTTATAAAAATTGTGAAATACAGTTGAAA
A171F1                NGTAATAGTTATAAAAATTGTGAAATACAGTTGAAA
A45F1                 NAAGTTATAAAAATTGTGAAATACAGTTGAAA
A307F1                NAAGTTATAAAAATTGTGAAATACAGTTGAAA
A4F1                  GN NTTATAAAAATTGTGAAATACAGTTGAAA
A7F1                  NAAGTTATAAAA -TTGTGAAATACAGTTGAAA
A16F1                CTGAAAA T---GGAGAT AGTTATAAAAATTGTGAAATA-AGTTGAAA
A25F1  ATCCTGTTCA GTTGACAAAT ATGCTGAAAA AATGGAAGAT AGTTATAAAAATTGTGAAATACAGTTGAAA
3D7  ATCCTGTTCA GTTGACAAAT ATGCTGAAAA AATGGAAGAT AGTTATAAAAATTGTGAAATACAGTTGAAA
```

Anexos

Consensus agTTATAAAAATTGTGAAATACAGTTGAAA

631

700

A285F1 AAAAAATTTTATTTTCATCTACCGCTATTGTATGTGGTAGATGTATAGCTGTTGTAATCAACATAGGTA

A94F1 AAAAAATTTTATTTTCATCTACCGCTATTGTATGTGGTAGATGTATAGCTGTTGTAATCAACATAGGTA

A241F1 AAAAAATTTTATTTTCATCTACCGCTATTGTATGTGGTAGATGTATAGCTGTTGTAATCAACATAGGTA

A171F1 AAAAAATTTTATTTTCATCTACCGCTATTGTATGTGGTAGATGTATAGCTGTTGTAATCAACATAGGTA

A45F1 AAAAAATTTTATTTTCATCTACCGCTATTGTATGTGGTAGATGTATAGCTGTTGTAATCAACATAGGTA

A307F1 AAAAAATTTTATTTTCATCTACCGCTATTGTATGTGGTAGATGTATAGCTGTTGTAATCAACATAGGTA

A4F1 AAAAAATTTTATTTTCATCTACCGCTATTGTATGTGGTAGATGTATAGCTGTTGTAATCAACATAGGTA

A7F1 AAAAAATTTTATTTTCATCTACCGCTATTGTATGTGGTAGATGTATAGCTGTTGTAATCAACATAGGTA

A16F1 AAAAAATTTTATTTTCATCTACCGCTATTGTATGTGGTAGATGTATAGCTGTTGTAATCAACATAGGTA

A25F1 AAAAAATTTTATTTTCATCTACCGCTATTGTATGTGGTAGATGTATAGCTGTTGTAATCAACATAGGTA

3D7 AAAAAATTTTATTTTCATCTACCGCTATTGTATGTGGTAGATGTATAGCTGTTGTAATCAACATAGGTA

Consensus AAAAAATTTTATTTTCATCTACCGCTATTGTATGTGGTAGATGTATAGCTGTTGTAATCAACATAGGTA

701

770

A285F1 TGAAGACTGAAATAGGTCATATTCAGCATGCTGTTATAGAATCAAATAGTGAAGATACTCAAACACCTTT

A94F1 TGAAGACTGAAATAGGTCATATTCAGCATGCTGTTATAGAATCAAATAGTGAAGATACTCAAACACCTTT

A241F1 TGAAGACTGAAATAGGTCATATTCAGCATGCTGTTATAGAATCAAATAGTGAAGATACTCAAACACCTTT

A171F1 TGAAGACTGAAATAGGTCATATTCAGCATGCTGTTATAGAATCAAATAGTGAAGATACTCAAACACCTTT

A45F1 TGAAGACTGAAATAGGTCATATTCAGCATGCTGTTATAGAATCAAATAGTGAAGATACTCAAACACCTTT

A307F1 TGAAGACTGAAATAGGTCATATTCAGCATGCTGTTATAGAATCAAATAGTGAAGATACTCAAACACCTTT

A4F1 TGAAGACTGAAATAGGTCATATTCAGCATGCTGTTATAGAATCAAATAGTGAAGATACTCAAACACCTTT

A7F1 TGAAGACTGAAATAGGTCATATTCAGCATGCTGTTATAGAATCAAATAGTGAAGATACTCAAACACCTTT

A16F1 TGAAGACTGAAATAGGTCATATTCAGCATGCTGTTATAGAATCAAATAGTGAAGATACTCAAACACCTTT

A25F1 TGAAGACTGAAATAGGTCATATTCAGCATGCTGTTATAGAATCAAATAGTGAAGATACTCAAACACCTTT

3D7 TGAAGACTGAAATAGGTCATATTCAGCATGCTGTTATAGAATCAAATAGTGAAGATACTCAAACACCTTT

Anexos

Consensus TGAAGACTGAAATAGGTCATATTCAGCATGCTGTTATAGAATCAAATAGTGAAGATACTCAAACACCTTT

771

840

A285F1 ACAAATAAAAATCGATTTATTTGGTCAACAATTATCAAAAATCATTTTGTAAATATGTGTAAGTGTATGG

A94F1 ACAAATAAAAATCGATTTATTTGGTCAACAATTATCAAAAATCATTTTGTAAATATGTGTAAGTGTATGG

A241F1 ACAAATAAAAATCGATTTATTTGGTCAACAATTATCAAAAATCATTTTGTAAATATGTGTAAGTGTATGG

A171F1 ACAAATAAAAATCGATTTATTTGGTCAACAATTATCAAAAATCATTTTGTAAATATGTGTAAGTGTATGG

A45F1 ACAAATAAAAATCGATTTATTTGGTCAACAATTATCAAAAATCATTTTGTAAATATGTGTAAGTGTATGG

A307F1 ACAAATAAAAATCGATTTATTTGGTCAACAATTATCAAAAATCATTTTGTAAATATGTGTAAGTGTATGG

A4F1 ACAAATAAAAATCGATTTATTTGGTCAACAATTATCAAAAATCATTTTGTAAATATGTGTAAGTGTATGG

A7F1 ACAAATAAAAATCGATTTATTTGGTCAACAATTATCAAAAATCATTTTGTAAATATGTGTAAGTGTATGG

A16F1 ACAAATAAAAATCGATTTATTTGGTCAACAATTATCAAAAATCATTTTGTAAATATGTGTAAGTGTATGG

A25F1 ACAAATAAAAATCGATTTATTTGGTCAACAATTATCAAAAATCATTTTGTAAATATGTGTAAGTGTATGG

3D7 ACAAATAAAAATCGATTTATTTGGTCAACAATTATCAAAAATCATTTTGTAAATATGTGTAAGTGTATGG

Consensus ACAAATAAAAATCGATTTATTTGGTCAACAATTATCAAAAATCATTTTGTAAATATGTGTAAGTGTATGG

841

910

A285F1 ATTATTAATTTTAAACATTTCTCAGATCCAATTCATGGTTCATTTTATATGGTTGTTTATATTATTTTA

A94F1 ATTATTAATTTTAAACATTTCTCAGATCCAATTCATGGTTCATTTTATATGGTTGTTTATATTATTTTA

A241F1 ATTATTAATTTTAAACATTTCTCAGATCCAATTCATGGTTCATTTTATATGGTTGTTTATATTATTTTA

A171F1 ATTATTAATTTTAAACATTTCTCAGATCCAATTCATGGTTCATTTTATATGGTTGTTTATATTATTTTA

A45F1 ATTATTAATTTTAAACATTTCTCAGATCCAATTCATGGTTCATTTTATATGGTTGTTTATATTATTTTA

A307F1 ATTATTAATTTTAAACATTTCTCAGATCCAATTCATGGTTCATTTTATATGGTTGTTTATATTATTTTA

A4F1 ATTATTAATTTTAAACATTTCTCAGATCCAATTCATGGTTCATTTTATATGGTTGTTTATATTATTTTA

A7F1 ATTATTAATTTTAAACATTTCTCAGATCCAATTCATGGTTCATTTTATATGGTTGTTTATATTATTTTA

A16F1 ATTATTAATTTTAAACATTTCTCAGATCCAATTCATGGTTCATTTTATATGGTTGTTTATATTATTTTA

A25F1 ATTATTAATTTTAAACATTTCTCAGATCCAATTCATGGTTCATTTTATATGGTTGTTTATATTATTTTA

3D7 ATTATTAATTTTAAACATTTCTCAGATCCAATTCATGGTTCATTTTATATGGTTGTTTATATTATTTTA

Anexos

Consensus ATTATTAATTTTAAACATTTCTCAGATCCAATTCATGGTTCATTTTTATATGGTTGTTTATATTATTTTA

911

980

A285F1 AAATTAGTGTGCTTTAGCTGTTGCTGCTATACCAGAAGGATTGCCAGCAGTCATAACAACCTTGTTTAGC

A94F1 AAATTAGTGTGCTTTAGCTGTTGCTGCTATACCAGAAGGATTGCCAGCAGTCATAACAACCTTGTTTAGC

A241F1 AAATTAGTGTGCTTTAGCTGTTGCTGCTATACCAGAAGGATTGCCAGCAGTCATAACAACCTTGTTTAGC

A171F1 AAATTAGTGTGCTTTAGCTGTTGCTGCTATACCAGAAGGATTGCCAGCAGTCATAACAACCTTGTTTAGC

A45F1 AAATTAGTGTGCTTTAGCTGTTGCTGCTATACCAGAAGGATTGCCAGCAGTCATAACAACCTTGTTTAGC

A307F1 AAATTAGTGTGCTTTAGCTGTTGCTGCTATACCAGAAGGATTGCCAGCAGTCATAACAACCTTGTTTAGC

A4F1 AAATTAGTGTGCTTTAGCTGTTGCTGCTATACCAGAAGGATTGCCAGCAGTCATAACAACCTTGTTTAGC

A7F1 AAATTAGTGTGCTTTAGCTGTTGCTGCTATACCAGAAGGATTGCCAGCAGTCATAACAACCTTGTTTAGC

A16F1 AAATTAGTGTGCTTTAGCTGTTGCTGCTATACCAGAAGGATTGCCAGCAGTCATAACAACCTTGTTTAGC

A25F1 AAATTAGTGTGCTTTAGCTGTTGCTGCTATACCAGAAGGATTGCCAGCAGTCATAACAACCTTGTTTAGC

3D7 AAATTAGTGTGCTTTAGCTGTTGCTGCTATACCAGAAGGATTGCCAGCAGTCATAACAACCTTGTTTAGC

Consensus AAATTAGTGTGCTTTAGCTGTTGCTGCTATACCAGAAGGATTGCCAGCAGTCATAACAACCTTGTTTAGC

981

1050

A285F1 TTTAGGAACAAGAAGAAATGGTAAAAAAAAATGCTATAGTAAGAAAATTACAAAGTGTGAGACGTTAGGA

A94F1 TTTAGGAACAAGAAGAAATGGTAAAAAAAAATGCTATAGTAAGAAAATTACAAAGTGTGAGACGTTAGGA

A241F1 TTTAGGAACAAGAAGAAATGGTAAAAAAAAATGCTATAGTAAGAAAATTACAAAGTGTGAGACGTTAGGA

A171F1 TTTAGGAACAAGAAGAAATGGTAAAAAAAAATGCTATAGTAAGAAAATTACAAAGTGTGAGACGTTAGGA

A45F1 TTTAGGAACAAGAAGAAATGGTAAAAAAAAATGCTATAGTAAGAAAATTACAAAGTGTGAGACGTTAGGA

A307F1 TTTAGGAACAAGAAGAAATGGTAAAAAAAAATGCTATAGTAAGAAAATTACAAAGTGTGAGACGTTAGGA

A4F1 TTTAGGAACAAGAAGAAATGGTAAAAAAAAATGCTATAGTAAGAAAATTACAAAGTGTGAGACGTTAGGA

A7F1 TTTAGGAACAAGAAGAAATGGTAAAAAAAAATGCTATAGTAAGAAAATTACAAAGTGTGAGACGTTAGGA

A16F1 TTTAGGAACAAGAAGAAATGGTAAAAAAAAATGCTATAGTAAGAAAATTACAAAGTGTGAGACGTTAGGA

A25F1 TTTAGGAACAAGAAGAAATGGTAAAAAAAA A

3D7 TTTAGGAACAAGAAGAAATGGTAAAAAAAAATGCTATAGTAAGAAAATTACAAAGTGTGAGACGTTAGGA

Anexos

Consensus **TTTAGGAACAAGAAGAAATGGTAAAAAAaAAtgctatagtaagaaaattacaaagtgtgagacgtagga**

1051

1120

A285F1 **TGTACAAA**

A94F1 **TGTACAAA**

A241F1 **TGTACAAA**

A171F1 **TGTACAAA**

A45F1 **TGTACAA**

A307F1 **TGTACAAA**

A4F1 **TGTACAAA**

A7F1 **TGTACAAA**

A16F1 **TGTACA**

A25F1

3D7 **TGTACAACGG** TTATATGTTC TGATAAAACA GGTACCCTTA CAACAAATCA AATGACAACA ACCGTGTTC

Consensus **tgtacaaa**.....

Fragmento 2

1261

1330

A4F2 **AGTGANT**

A7F2 N- ATAG**TGATT**

A94F2 **TGATT**

A1F2 **TGATT**

A171F2 **T**

A45F2 **AGTGATT**

A241F2 **ATAGTGATT**

A285F2 **CTGATT**

A16F2 A -GCTGATCA- TAT**AGTGATT**

A5F2 ATGA -GCTGATCC- TAT**AGTGATT**

Anexos

A307F2 GATGA -GCTGATCC- TATAGTGATT
S3F2 TATAGTGATT
A25F2 AAGCTTTAAC GGATGATGGA GAAGAAGGAT CAATTGATGA AGCTGATCCA TATAGTGATT
3D7 GGAAATGTTG AAGCTTTAAC GGATGATGGA GAAGAAGGAT CAATTGATGA AGCTGATCCA TATAGTGATT
Consensus agTGaTT

1331

1400

A4F2 ATTTTCTAGTGATAGTAAGAAAATGAAAATGATTTAAACAACAACAATAATAATAATAATAGTAG
A7F2 ATTTTCTAGTGATAGTAAGAAAATGAAAATGATTTAAACAACAACAATAATAATAATAATAGTAG
A94F2 ATTTTCTAGTGATAGTAAGAAAATGAAAATGATTTAAACAACAACAATAATAATAATAATAGTAG
A1F2 ATTTTCTAGTGATAGTAAGAAAATGAAAATGATTTAAACAACAACAATAATAATAATAATAGTAG
A171F2 ATTTTCTAGTGATAGTAAGAAAATGAAAATGATTTAAACAACAACAATAATAATAATAATAGTAG
A45F2 ATTTTCTAGTGATAGTAAGAAAATGAAAATGATTTAAACAACAACAATAATAATAATAATAGTAG
A241F2 ATTTTCTAGTGATAGTAAGAAAATGAAAATGATTTAAACAACAACAATAATAATAATAATAGTAG
A285F2 ATTTTCTAGTGATAGTAAGAAAATGAAAATGATTTAAACAACAACAATAATAATAATAATAGTAG
A16F2 ATTTTCTAGTGATAGTAAGAAAATGAAAATGATTTAAACAACAACAATAATAATAATAATAGTAG
A5F2 ATTTTCTAGTGATAGTAAGAAAATGAAAATGATTTAAACAACAACAATAATAATAATAATAGTAG
A307F2 ATTTTCTAGTGATAGTAAGAAAATGAAAATGATTTAAACAACAACAATAATAATAATAATAGTAG
S3F2 ATTTTCTAGTGATAGTAAGAAAATGAAAATGATTTAAACAACAACAATAATAATAATAATAGTAG
A25F2 ATTTTCTAGTGATAGTAAGAAAATGAAAATGATTTAAACAACAACAATAATAATAATAATAGTAG
3D7 ATTTTCTAGTGATAGTAAGAAAATGAAAATGATTTAAACAACAACAATAATAATAATAATAGTAG
Consensus ATTTTCTAGTGATAGTAAGAAAATGAAAATGATTTAAACAACAACAATAATAATAATAATAGTAG

1401

1470

A4F2 TAGGAGTGGTGCTAAGAGGAATATTCCTTTAAAAGAAATGAAATCAAATGAAAATACAATAATAAGTAGA
A7F2 TAGGAGTGGTGCTAAGAGGAATATTCCTTTAAAAGAAATGAAATCAAATGAAAATACAATAATAAGTAGA
A94F2 TAGGAGTGGTGCTAAGAGGAATATTCCTTTAAAAGAAATGAAATCAAATGAAAATACAATAATAAGTAGA
A1F2 TAGGAGTGGTGCTAAGAGGAATATTCCTTTAAAAGAAATGAAATCAAATGAAAATACAATAATAAGTAGA

Anexos

A171F2 TAGGAGTGGTGCTAAGAGGAATATTCCTTTAAAAGAAATGAAATCAAATGAAAATACAATAATAAGTAGA
A45F2 TAGGAGTGGTGCTAAGAGGAATATTCCTTTAAAAGAAATGAAATCAAATGAAAATACAATAATAAGTAGA
A241F2 TAGGAGTGGTGCTAAGAGGAATATTCCTTTAAAAGAAATGAAATCAAATGAAAATACAATAATAAGTAGA
A285F2 TGGGAGTGGTGCTAAGAGGAATATTCCTTTAAAAGAAATGAAATCAAATGAAAATACAATAATAAGTAGA
A16F2 TAGGAGTGGTGCTAAGAGGAATATTCCTTTAAAAGAAATGAAATCAAATGAAAATACAATAATAAGTAGA
A5F2 TAGGAGTGGTGCTAAGAGGAATATTCCTTTAAAAGAAATGAAATCAAATGAAAATACAATAATAAGTAGA
A307F2 TAGGAGTGGTGCTAAGAGGAATATTCCTTTAAAAGAAATGAAATCAAATGAAAATACAATAATAAGTAGA
S3F2 TAGGAGTGGTGCTAAGAGGAATATTCCTTTAAAAGAAATGAAATCAAATGAAAATACAATAATAAGTAGA
A25F2 TAGGAGTGGTGCTAAGAGGAATATTCCTTTAAAAGAAATGAAATCAAATGAAAATACAATAATAAGTAGA
3D7 TAGGAGTGGTGCTAAGAGGAATATTCCTTTAAAAGAAATGAAATCAAATGAAAATACAATAATAAGTAGA
Consensus TAGGAGTGGTGCTAAGAGGAATATTCCTTTAAAAGAAATGAAATCAAATGAAAATACAATAATAAGTAGA

1471

1540

A4F2 GGTAGTAAAATATTAGAAGATAAAATTAATAAATATTGTTATTCAGAATATGATTATAATTTTATATGT
A7F2 GGTAGTAAAATATTAGAAGATAAAATTAATAAATATTGTTATTCAGAATATGATTATAATTTTATATGT
A94F2 GGTAGTAAAATATTAGAAGATAAAATTAATAAATATTGTTATTCAGAATATGATTATAATTTTATATGT
A1F2 GGTAGTAAAATATTAGAAGATAAAATTAATAAATATTGTTATTCAGAATATGATTATAATTTTATATGT
A171F2 GGTAGTAAAATATTAGAAGATAAAATTAATAAATATTGTTATTCAGAATATGATTATAATTTTATATGT
A45F2 GGTAGTAAAATATTAGAAGATAAAATTAATAAATATTGTTATTCAGAATATGATTATAATTTTATATGT
A241F2 GGTAGTAAAATATTAGAAGATAAAATTAATAAATATTGTTATTCAGAATATGATTATAATTTTATATGT
A285F2 GGTAGTAAAATATTAGAAGATAAAATTAATAAATATTGTTATTCAGAATATGATTATAATTTTATATGT
A16F2 GGTAGTAAAATATTAGAAGATAAAATTAATAAATATTGTTATTCAGAATATGATTATAATTTTATATGT
A5F2 GGTAGTAAAATATTAGAAGATAAAATTAATAAATATTGTTATTCAGAATATGATTATAATTTTATATGT
A307F2 GGTAGTAAAATATTAGAAGATAAAATTAATAAATATTGTTATTCAGAATATGATTATAATTTTATATGT
S3F2 GGTAGTAAAATATTAGAAGATAAAATTAATAAATATTGTTATTCAGAATATGATTATAATTTTATATGT
A25F2 GGTAGTAAAATATTAGAAGATAAAATTAATAAATATTGTTATTCAGAATATGATTATAATTTTATATGT
3D7 GGTAGTAAAATATTAGAAGATAAAATTAATAAATATTGTTATTCAGAATATGATTATAATTTTATATGT
Consensus GGTAGTAAAATATTAGAAGATAAAATTAATAAATATTGTTATTCAGAATATGATTATAATTTTATATGT

Anexos

1541

1610

A4F2 GTTTAGTAAATTGTAATGAAGCAAATATTTCTGTAACGATAATAGTCAAATAGTAAAAAAATTTGGAGA
A7F2 GTTTAGTAAATTGTAATGAAGCAAATATTTCTGTAACGATAATAGTCAAATAGTAAAAAAATTTGGAGA
A94F2 GTTTAGTAAATTGTAATGAAGCAAATATTTCTGTAACGATAATAGTCAAATAGTAAAAAAATTTGGAGA
A1F2 GTTTAGTAAATTGTAATGAAGCAAATATTTCTGTAACGATAATAGTCAAATAGTAAAAAAATTTGGAGA
A171F2 GTTTAGTAAATTGTAATGAAGCAAATATTTCTGTAACGATAATAGTCAAATAGTAAAAAAATTTGGAGA
A45F2 GTTTAGTAAATTGTAATGAAGCAAATATTTCTGTAACGATAATAGTCAAATAGTAAAAAAATTTGGAGA
A241F2 GTTTAGTAAATTGTAATGAAGCAAATATTTCTGTAACGATAATAGTCAAATAGTAAAAAAATTTGGAGA
A285F2 GTTTAGTAAATTGTAATGAAGCAAATATTTCTGTAACGATAATAGTCAAATAGTAAAAAAATTTGGAGA
A16F2 GTTTAGTAAATTGTAATGAAGCAAATATTTCTGTAACGATAATAGTCAAATAGTAAAAAAATTTGGAGA
A5F2 GTTTAGTAAATTGTAATGAAGCAAATATTTCTGTAACGATAATAGTCAAATAGTAAAAAAATTTGGAGA
A307F2 GTTTAGTAAATTGTAATGAAGCAAATATTTCTGTAACGATAATAGTCAAATAGTAAAAAAATTTGGAGA
S3F2 GTTTAGTAAATTGTAATGAAGCAAATATTTCTGTAACGATAATAGTCAAATAGTAAAAAAATTTGGAGA
A25F2 GTTTAGTAAATTGTAATGAAGCAAATATTTCTGTAACGATAATAGTCAAATAGTAAAAAAATTTGGAGA
3D7 GTTTAGTAAATTGTAATGAAGCAAATATTTCTGTAACGATAATAGTCAAATAGTAAAAAAATTTGGAGA
Consensus GTTTAGTAAATTGTAATGAAGCAAATATTTCTGTAACGATAATAGTCAAATAGTAAAAAAATTTGGAGA

1611

1680

A4F2 CAGTACCGAATTAGCTTTATTACATTTTGTACATAATTTTGATATATTACCAACATTCTCTAAAAATAAT
A7F2 CAGTACCGAATTAGCTTTATTACATTTTGTACATAATTTTGATATATTACCAACATTCTCTAAAAATAAT
A94F2 CAGTACCGAATTAGCTTTATTACATTTTGTACATAATTTTGATATATTACCAACATTCTCTAAAAATAAT
A1F2 CAGTACCGAATTAGCTTTATTACATTTTGTACATAATTTTGATATATTACCAACATTCTCTAAAAATAAT
A171F2 CAGTACCGAATTAGCTTTATTACATTTTGTACATAATTTTGATATATTACCAACATTCTCTAAAAATAAT
A45F2 CAGTACCGAATTAGCTTTATTACATTTTGTACATAATTTTGATATATTACCAACATTCTCTAAAAATAAT
A241F2 CAGTACCGAATTAGCTTTATTACATTTTGTACATAATTTTGATATATTACCAACATTCTCTAAAAATAAT
A285F2 CAGTACCGAATTAGCTTTATTACATTTTGTACATAATTTTGATATATTACCAACATTCTCTAAAAATAAT
A16F2 CAGTACCGAATTAGCTTTATTACATTTTGTACATAATTTTGATATATTACCAACATTCTCTAAAAATAAT

Anexos

A5F2 CAGTACCGAATTAGCTTTATTACATTTTGTACATAATTTTGATATATTACCAACATTCTCTAAAAATAAT
A307F2 CAGTACCGAATTAGCTTTATTACATTTTGTACATAATTTTGATATATTACCAACATTCTCTAAAAATAAT
S3F2 CAGTACCGAATTAGCTTTATTACATTTTGTACATAATTTTGATATATTACCAACATTCTCTAAAAATAAT
A25F2 CAGTACCGAATTAGCTTTATTACATTTTGTACATAATTTTGATATATTACCAACATTCTCTAAAAATAAT
3D7 CAGTACCGAATTAGCTTTATTACATTTTGTACATAATTTTGATATATTACCAACATTCTCTAAAAATAAT
Consensus CAGTACCGAATTAGCTTTATTACATTTTGTACATAATTTTGATATATTACCAACATTCTCTAAAAATAAT

1681

1750

A4F2 AAAATGCCAGCAGAATATGAAAAAACAACACCTGTACAATCATCAAATAAGAAGGATAAATCACCAA
A7F2 AAAATGCCAGCAGAATATGAAAAAACAACACCTGTACAATCATCAAATAAGAAGGATAAATCACCAA
A94F2 AAAATGCCAGCAGAATATGAAAAAACAACACCTGTACAATCATCAAATAAGAAGGATAAATCACCAA
A1F2 AAAATGCCAGCAGAATATGAAAAAACAACACCTGTACAATCATCAAATAAGAAGGATAAATCACCAA
A171F2 AAAATGCCAGCAGAATATGAAAAAACAACACCTGTACAATCATCAAATAAGAAGGATAAATCACCAA
A45F2 AAAATGCCAGCAGAATATGAAAAAACAACACCTGTACAATCATCAAATAAGAAGGATAAATCACCAA
A241F2 AAAATGCCAGCAGAATATGAAAAAACAACACCTGTACAATCATCAAATAAGAAGGATAAATCACCAA
A285F2 AAAATGCCAGCAGAATATGAAAAAACAACACCTGTACAATCATCAAATAAGAAGGATAAATCACCAA
A16F2 AAAATGCCAGCAGAATATGAAAAAACAACACCTGTACAATCATCAAATAAGAAGGATAAATCACCAA
A5F2 AAAATGCCAGCAGAATATGAAAAAACAACACCTGTACAATCATCAAATAAGAAGGATAAATCACCAA
A307F2 AAAATGCCAGCAGAATATGAAAAAACAACACCTGTACAATCATCAAATAAGAAGGATAAATCACCAA
S3F2 AAAATGCCAGCAGAATATGAAAAAACAACACCTGTACAATCATCAAATAAGAAGGATAAATCACCAA
A25F2 AAAATGCCAGCAGAATATGAAAAAACAACACCTGTACAATCATCAAATAAGAAGGATAAATCACCAA
3D7 AAAATGCCAGCAGAATATGAAAAAACAACACCTGTACAATCATCAAATAAGAAGGATAAATCACCAA
Consensus AAAATGCCAGCAGAATATGAAAAAACAACACCTGTACAATCATCAAATAAGAAGGATAAATCACCAA

1751

1820

A4F2 GGGGTATCAACAAATCTTTAGTTCAAAAATGATAACAGTCATATTACCAGTACATTGAATGAAATGA
A7F2 GGGGTATCAACAAATCTTTAGTTCAAAAATGATAACAGTCATATTACCAGTACATTGAATGAAATGA
A94F2 GGGGTATCAACAAATCTTTAGTTCAAAAATGATAACAGTCATATTACCAGTACATTGAATGAAATGA

Anexos

A1F2 GGGGTATCAACAAATTCCTTTAGTTCAAAAAATGATAACAGTCATATTACCAGTACATTGAATGAAAATGA
A171F2 GGGGTATCAACAAATTCCTTTAGTTCAAAAAATGATAACAGTCATATTACCAGTACATTGAATGAAAATGA
A45F2 GGGGTATCAACAAATTCCTTTAGTTCAAAAAATGATAACAGTCATATTACCAGTACATTGAATGAAAATGA
A241F2 GGGGTATCAACAAATTCCTTTAGTTCAAAAAATGATAACAGTCATATTACCAGTACATTGAATGAAAATGA
A285F2 GGGGTATCAACAAATTCCTTTAGTTCAAAAAATGATAACAGTCATATTACCAGTACATTGAATGAAAATGA
A16F2 GGGGTATCAACAAATTCCTTTAGTTCAAAAAATGATAACAGTCATATTACCAGTACATTGAATGAAAATGA
A5F2 GGGGTATCAACAAATTCCTTTAGTTCAAAAAATGATAACAGTCATATTACCAGTACATTGAATGAAAATGA
A307F2 GGGGTATCAACAAATTCCTTTAGTTCAAAAAATGATAACAGTCATATTACCAGTACATTGAATGAAAATGA
S3F2 GGGGTATCAACAAATTCCTTTAGTTCAAAAAATGATAACAGTCATATTACCAGTACATTGAATGAAAATGA
A25F2 GGGGTATCAACAAATTCCTTTAGTTCAAAAAATGATAACAGTCATATTACCAGTACATTGAATGAAAATGA
3D7 GGGGTATCAACAAATTCCTTTAGTTCAAAAAATGATAACAGTCATATTACCAGTACATTGAATGAAAATGA
Consensus GGGGTATCAACAAATTCCTTTAGTTCAAAAAATGATAACAGTCATATTACCAGTACATTGAATGAAAATGA

1821

1890

A4F2 TAAGAATTTAAAGAATGCTAACCATTCTAATTATACTACAGCTCAGGCAACAACAAATGGATATGAAGCT
A7F2 TAAGAATTTAAAGAATGCTAACCATTCTAATTATACTACAGCTCAGGCAACAACAAATGGATATGAAGCT
A94F2 TAAGAATTTAAAGAATGCTAACCATTCTAATTATACTACAGCTCAGGCAACAACAAATGGATATGAAGCT
A1F2 TAAGAATTTAAAGAATGCTAACCATTCTAATTATACTACAGCTCAGGCAACAACAAATGGATATGAAGCT
A171F2 TAAGAATTTAAAGAATGCTAACCATTCTAATTATACTACAGCTCAGGCAACAACAAATGGATATGAAGCT
A45F2 TAAGAATTTAAAGAATGCTAACCATTCTAATTATACTACAGCTCAGGCAACAACAAATGGATATGAAGCT
A241F2 TAAGAATTTAAAGAATGCTAACCATTCTAATTATACTACAGCTCAGGCAACAACAAATGGATATGAAGCT
A285F2 TAAGAATTTAAAGAATGCTAACCATTCTAATTATACTACAGCTCAGGCAACAACAAATGGATATGAAGCT
A16F2 TAAGAATTTAAAGAATGCTAACCATTCTAATTATACTACAGCTCAGGCAACAACAAATGGATATGAAGCT
A5F2 TAAGAATTTAAAGAATGCTAACCATTCTAATTATACTACAGCTCAGGCAACAACAAATGGATATGAAGCT
A307F2 TAAGAATTTAAAGAATGCTAACCATTCTAATTATACTACAGCTCAGGCAACAACAAATGGATATGAAGCT
S3F2 TAAGAATTTAAAGAATGCTAACCATTCTAATTATACTACAGCTCAGGCAACAACAAATGGATATGAAGCT
A25F2 TAAGAATTTAAAGAATGCTAACCATTCTAATTATACTACAGCTCAGGCAACAACAAAT
3D7 TAAGAATTTAAAGAATGCTAACCATTCTAATTATACTACAGCTCAGGCAACAACAAATGGATATGAAGCT

Anexos

Consensus TAAGAATTTAAGAATGCTAACCATTCTAATTATACTACAGCTCAGGCAACAACAAATGGATATGAAGCT

1891

1960

A4F2 ATAGGAGAAAATACATTTGAGCC-ATGGC

A7F2 ATAGGAGAAAATACATTTGAGCC-ATGGC

A94F2 ATAGGAGAAAATACATTTGAGCCCATGGNN NNN

A1F2 ATAGGAGAAAATACATTTGAGC--ATGGC

A171F2 ATAGGAGAAAATACATTTGAGCCCATGGC

A45F2 ATAGGAGAAAATACANNNNN NNNTGGGCCA CA

A241F2 ATAGGAGAAAATACANNNNN NNNGGGGNAN NN

A285F2 ATAGGAGAAAATACATTTGAGCNNNNNCAC AN

A16F2 ATAGGAGAAAATACATTTG

A5F2 ATAGGAGAAAATACAT

A307F2 ATAGGAGAAAATACATT

S3F2 ATAGGAGAAAATACATTT

A25F2

3D7 ATAGGAGAAAATACATTTGAGCATGGCACA AGTTTGTAAA ATTGTTTCCA CTCAAAATTG GGTAATAAAA

Consensus ATAGGAGAAAATACAtttgagc....g... ..

Fragmento 3

2241

2310

A285F3 ACAGTATGGGAAAAGAGCATTAAAGAACACTTAGCTTTGCTTATAAAAAATTAAGTAGT

A45F3 ATG CACAGTATGGGAAAAGAGCATTAAAGAACACTTAGCTTTGCTTATAAAAAATTAAGTAGT

A25F3 TAATAAGATT CAAAATATGGGAAAAGAGCATTAAAGAACACTTAGCTTTGCTTATAAAAAATTAAGTAGT

3D7 TAATAAGATT CAAAATATGGGAAAAGAGCATTAAAGAACACTTAGCTTTGCTTATAAAAAATTAAGTAGT

A307F3 AGTATGGGAAAAGAGCATTAAAGAACACTTAGCTTTGCTTATAAAAAATTAAGTAGT

A94F3 ATGGGAAAAGAGCATTAAAGAACACTTAGCTTTGCTTATAAAAAATTAAGTAGT

A241F3 AGTATGGGAAAAGAGCATTAAAGAACACTTAGCTTTGCTTATAAAAAATTAAGTAGT

A171F3 TGGGAAAAGAGCATTAAAGAACACTTAGCTTTGCTTATAAAAAATTAAGTAGT

Anexos

A7F3 GGGAAAAAGAGCATTAGAACACTTAGCTTTGCTTATAAAAAATTAAGTAGT
A4F3 TGGGAAAAAGAGCATTAGAACACTTAGCTTTGCTTATAAAAAATTAAGTAGT
Consensusa.tatGGGAAAAAGAGCATTAGAACACTTAGCTTTGCTTATAAAAAATTAAGTAGT

2311

2380

A285F3 AAAGATTTAAATATTAAGAATACAGATGATTATTATAAATTAGAACAAGATTTAATTTATTTAGGTGGAT
A45F3 AAAGATTTAAATATTAAGAATACAGATGATTATTATAAATTAGAACAAGATTTAATTTATTTAGGTGGAT
A25F3 AAAGATTTAAATATTAAGAATACAGATGATTATTATAAATTAGAACAAGATTTAATTTATTTAGGTGGAT
3D7 AAAGATTTAAATATTAAGAATACAGATGATTATTATAAATTAGAACAAGATTTAATTTATTTAGGTGGAT
A307F3 AAAGATTTAAATATTAAGAATACAGATGATTATTATAAATTAGAACAAGATTTAATTTATTTAGGTGGAT
A94F3 AAAGATTTAAATATTAAGAATACAGATGATTATTATAAATTAGAACAAGATTTAATTTATTTAGGTGGAT
A241F3 AAAGATTTAAATATTAAGAATACAGATGATTATTATAAATTAGAACAAGATTTAATTTATTTAGGTGGAT
A171F3 AAAGATTTAAATATTAAGAATACAGATGATTATTATAAATTAGAACAAGATTTAATTTATTTAGGTGGAT
A7F3 AAAGATTTAAATATTAAGAATACAGATGATTATTATAAATTAGAACAAGATTTAATTTATTTAGGTGGAT
A4F3 AAAGATTTAAATATTAAGAATACAGATGATTATTATAAATTAGAACAAGATTTAATTTATTTAGGTGGAT
Consensus AAAGATTTAAATATTAAGAATACAGATGATTATTATAAATTAGAACAAGATTTAATTTATTTAGGTGGAT

2381

2450

A285F3 TAGGTATTATTGATCCACCACGTAATATGTAGGAAGAGCAATTAGATTATGCCATATGGCTGGTATACG
A45F3 TAGGTATTATTGATCCACCACGTAATATGTAGGAAGAGCAATTAGATTATGCCATATGGCTGGTATACG
A25F3 TAGGTATTATTGATCCACCACGTAATATGTAGGAAGAGCAATTAGATTATGCCATATGGCTGGTATACG
3D7 TAGGTATTATTGATCCACCACGTAATATGTAGGAAGAGCAATTAGATTATGCCATATGGCTGGTATACG
A307F3 TAGGTATTATTGATCCACCACGTAATATGTAGGAAGAGCAATTAGATTATGCCATATGGCTGGTATACG
A94F3 TAGGTATTATTGATCCACCACGTAATATGTAGGAAGAGCAATTAGATTATGCCATATGGCTGGTATACG
A241F3 TAGGTATTATTGATCCACCACGTAATATGTAGGAAGAGCAATTAGATTATGCCATATGGCTGGTATACG
A171F3 TAGGTATTATTGATCCACCACGTAATATGTAGGAAGAGCAATTAGATTATGCCATATGGCTGGTATACG
A7F3 TAGGTATTATTGATCCACCACGTAATATGTAGGAAGAGCAATTAGATTATGCCATATGGCTGGTATACG
A4F3 TAGGTATTATTGATCCACCACGTAATATGTAGGAAGAGCAATTAGATTATGCCATATGGCTGGTATACG

Anexos

Consensus TAGGTATTATTGATCCACCACGTAATATGTAGGAAGAGCAATTAGATTATGCCATATGGCTGGTATACG

2451

2520

A285F3 TGTATTTATGATTACAGGTGATAATATTAATACGGCCAGAGCTATAGCTAAAGAAATTAATATATTTAAAT

A45F3 TGTATTTATGATTACAGGTGATAATATTAATACGGCCAGAGCTATAGCTAAAGAAATTAATATATTTAAAT

A25F3 TGTATTTATGATTACAGGTGATAATATTAATACGGCCAGAGCTATAGCTAAAGAAATTAATATATTTAAAT

3D7 TGTATTTATGATTACAGGTGATAATATTAATACGGCCAGAGCTATAGCTAAAGAAATTAATATATTTAAAT

A307F3 TGTATTTATGATTACAGGTGATAATATTAATACGGCCAGAGCTATAGCTAAAGAAATTAATATATTTAAAT

A94F3 TGTATTTATGATTACAGGTGATAATATTAATACGGCCAGAGCTATAGCTAAAGAAATTAATATATTTAAAT

A241F3 TGTATTTATGATTACAGGTGATAATATTAATACGGCCAGAGCTATAGCTAAAGAAATTAATATATTTAAAT

A171F3 TGTATTTATGATTACAGGTGATAATATTAATACGGCCAGAGCTATAGCTAAAGAAATTAATATATTTAAAT

A7F3 TGTATTTATGATTACAGGTGATAATATTAATACGGCCAGAGCTATAGCTAAAGAAATTAATATATTTAAAT

A4F3 TGTATTTATGATTACAGGTGATAATATTAATACGGCCAGAGCTATAGCTAAAGAAATTAATATATTTAAAT

Consensus TGTATTTATGATTACAGGTGATAATATTAATACGGCCAGAGCTATAGCTAAAGAAATTAATATATTTAAAT

2521

2590

A285F3 AAAAAATGAAGGAGATGATGAAAAGGATAATTATACAAATAATAAAAAATACACAAATATGTTGTTATAATG

A45F3 AAAAAATGAAGGAGATGATGAAAAGGATAATTATACAAATAATAAAAAATACACAAATATGTTGTTATAATG

A25F3 AAAAAATGAAGGAGATGATGAAAAGGATAATTATACAAATAATAAAAAATACACAAATATGTTGTTATAATG

3D7 AAAAAATGAAGGAGATGATGAAAAGGATAATTATACAAATAATAAAAAATACACAAATATGTTGTTATAATG

A307F3 AAAAAATGAAGGAGATGATGAAAAGGATAATTATACAAATAATAAAAAATACACAAATATGTTGTTATAATG

A94F3 AAAAAATGAAGGAGATGATGAAAAGGATAATTATACAAATAATAAAAAATACACAAATATGTTGTTATAATG

A241F3 AAAAAATGAAGGAGATGATGAAAAGGATAATTATACAAATAATAAAAAATACACAAATATGTTGTTATAATG

A171F3 AAAAAATGAAGGAGATGATGAAAAGGATAATTATACAAATAATAAAAAATACACAAATATGTTGTTATAATG

A7F3 AAAAAATGAAGGAGATGATGAAAAGGATAATTATACAAATAATAAAAAATACACAAATATGTTGTTATAATG

A4F3 AAAAAATGAAGGAGATGATGAAAAGGATAATTATACAAATAATAAAAAATACACAAATATGTTGTTATAATG

Consensus AAAAAATGAAGGAGATGATGAAAAGGATAATTATACAAATAATAAAAAATACACAAATATGTTGTTATAATG

Anexos

2591 2660

A285F3 GAAGAGAATTTGAAGATTTTTCATTAGAAAAGCAAAAACATATTTTAAAAAATACACCAAGAATTGTTTT

A45F3 GAAGAGAATTTGAAGATTTTTCATTAGAAAAGCAAAAACATATTTTAAAAAATACACCAAGAATTGTTTT

A25F3 GAAGAGAATTTGAAGATTTTTCATTAGAAAAGCAAAAACATATTTTAAAAAATACACCAAGAATTGTTTT

3D7 GAAGAGAATTTGAAGATTTTTCATTAGAAAAGCAAAAACATATTTTAAAAAATACACCAAGAATTGTTTT

A307F3 GAAGAGAATTTGAAGATTTTTCATTAGAAAAGCAAAAACATATTTTAAAAAATACACCAAGAATTGTTTT

A94F3 GAAGAGAATTTGAAGATTTTTCATTAGAAAAGCAAAAACATATTTTAAAAAATACACCAAGAATTGTTTT

A241F3 GAAGAGAATTTGAAGATTTTTCATTAGAAAAGCAAAAACATATTTTAAAAAATACACCAAGAATTGTTTT

A171F3 GAAGAGAATTTGAAGATTTTTCATTAGAAAAGCAAAAACATATTTTAAAAAATACACCAAGAATTGTTTT

A7F3 GAAGAGAATTTGAAGATTTTTCATTAGAAAAGCAAAAACATATTTTAAAAAATACACCAAGAATTGTTTT

A4F3 GAAGAGAATTTGAAGATTTTTCATTAGAAAAGCAAAAACATATTTTAAAAAATACACCAAGAATTGTTTT

Consensus GAAGAGAATTTGAAGATTTTTCATTAGAAAAGCAAAAACATATTTTAAAAAATACACCAAGAATTGTTTT

2661 2730

A285F3 CTGTAGAACTGAACCTAAACATAAAAAACAAATTGTAAAAGTATTAAAAGACTTAGGAGAAACAGTTGCT

A45F3 CTGTAGAACTGAACCTAAACATAAAAAACAAATTGTAAAAGTATTAAAAGACTTAGGAGAAACAGTTGCT

A25F3 CTGTAGAACTGAACCTAAACATAAAAAACAAATTGTAAAAGTATTAAAAGACTTAGGAGAAACAGTTGCT

3D7 CTGTAGAACTGAACCTAAACATAAAAAACAAATTGTAAAAGTATTAAAAGACTTAGGAGAAACAGTTGCT

A307F3 CTGTAGAACTGAACCTAAACATAAAAAACAAATTGTAAAAGTATTAAAAGACTTAGGAGAAACAGTTGCT

A94F3 CTGTAGAACTGAACCTAAACATAAAAAACAAATTGTAAAAGTATTAAAAGACTTAGGAGAAACAGTTGCT

A241F3 CTGTAGAACTGAACCTAAACATAAAAAACAAATTGTAAAAGTATTAAAAGACTTAGGAGAAACAGTTGCT

A171F3 CTGTAGAACTGAACCTAAACATAAAAAACAAATTGTAAAAGTATTAAAAGACTTAGGAGAAACAGTTGCT

A7F3 CTGTAGAACTGAACCTAAACATAAAAAACAAATTGTAAAAGTATTAAAAGACTTAGGAGAAACAGTTGCT

A4F3 CTGTAGAACTGAACCTAAACATAAAAAACAAATTGTAAAAGTATTAAAAGACTTAGGAGAAACAGTTGCT

Consensus CTGTAGAACTGAACCTAAACATAAAAAACAAATTGTAAAAGTATTAAAAGACTTAGGAGAAACAGTTGCT

att -> ata I898I mutação sinónima

Anexos
