



INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, Especialidade de Biologia
Molecular em Medicina Tropical e Internacional**

**ANÁLISE DO GENE CODIFICANTE *ubp-1* EM
ISOLADOS NATURAIS DE *Plasmodium falciparum***

ANA ISABEL ROSA DOS SANTOS REIS

2008



INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

ANÁLISE DO GENE CODIFICANTE *ubp-1* EM ISOLADOS

NATURAIS DE *Plasmodium falciparum*

ANA ISABEL ROSA DOS SANTOS REIS

*Tese apresentada para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biomédicas, especialidade
de Biologia Molecular em Medicina
Tropical e Internacional*

Orientador:

Prof. Doutor: Pedro Vitor Lemos Cravo

Co-Orientador:

Prof. Doutor: Celso Vladimiro Cunha

2008

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ter sido feito sem o apoio e colaboração de várias pessoas. Por isso não quero deixar de referenciar aqueles que mais contribuíram para a sua realização. Para essas pessoas os meus sinceros agradecimentos:

À Professora Doutora Maria Amélia Afonso Grácio, Coordenadora do I Mestrado em Ciências Biomédicas, a minha gratidão pela gentileza com que me acolheu neste curso.

Ao Professor Doutor Celso Vladimiro Cunha, Professor Associado do Instituto de Higiene e Medicina Tropical pelo apoio que sempre demonstrou.

Ao professor Doutor Pedro Vitor Lemos Cravo, Professor Auxiliar do Instituto de Higiene e Medicina Tropical pela disponibilidade e dedicação, essenciais para o desenvolvimento deste estudo.

Ao Doutor Axel Martinelli pelo apoio e dedicação, essenciais, à minha integração no trabalho laboratorial deste estudo.

À Dr^a Louise Rodrigues, bolsista da FCT, pela ilimitada disponibilidade demonstrada.

Por último, gostaria de manifestar o meu agradecimento aos meus amigos, namorado, pais e irmãos que sempre me apoiarem durante a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS I

ÍNDICE GERAL II

ÍNDICE DE FIGURAS IV

ÍNDICE DE TABELAS V

LISTA DE ABREVIATURAS VI

RESUMO VIII

ABSTRACT X

I-INTRODUÇÃO 1

1.1- Malária	1
1.2- Ciclo de Vida.....	1
1.3- Epidemiologia	3
1.4- Genoma de <i>Plasmodium falciparum</i>	5
1.5- Controlo	6
1.6- Antimaláricos.....	6
1.7- Resistência aos Antimaláricos	8
1.8- Uso Racional de Antimaláricos	10
1.9- Aspectos da Genética do parasita na Resistência aos Antimaláricos	12
1.9.1- Estrutura Genética de Populações Parasitárias	12
1.10- Mecanismos de Acção e Resistência dos Principais Antimaláricos	15
1.10.1- Cloroquina (CQ).....	15
1.10.2- Amodiaquina (AMQ)	16
1.10.3- Sulfadoxina-Pirimetamina (Fansidar®)	16
1.10.4- Artemisininas e seus derivados (DA)	18
1.10.4.1- Mecanismo de Acção.....	19
1.10.4.2- Mecanismo de Resistência.....	21
1.11- Regiões Endémicas	25
1.11.1- Brasil	25
1.11.2- Ruanda.....	26
1.11.3- R.D.S.T.....	27

II.OBJECTIVOS 28

III- MATERIAIS E MÉTODOS 29

3.1-Material Biológico e Antimaláricos	29
3.1.1- Isolados de <i>Plasmodium falciparum</i>	29
3.1.2- Clones de Referência de <i>P. falciparum</i>	29
3.1.3- População estudada	29
3.2- Metodologia	30
3.2.1- Processamento das amostras	30
3.2.2- Extracção de DNA	30
3.2.3- Desenho de <i>primers</i>	31
3.2.4- Análise de Sequenciação Genética.....	33
3.2.4.1- PCR “ <i>Nested PCR</i> ”	33
3.2.4.2- Electroforese em gel de agarose	33
3.2.4.3- Purificação dos Produtos Amplificados.....	34

3.2.4.4- Análise Bioinformática das Sequências.....	34
3.2.5- Análise Estatística	34

IV-RESULTADOS 35

IV.1- Desenvolvimento, otimização e validação do método de análise genética.	35
IV.2- Estudo dos perfis genotípicos do gene <i>pfubp-1</i> em populações naturais de <i>P.falciparum</i> do Brasil, Ruanda e da R.D.S.T.....	37
IV.2.1-Brasil	39
IV.2.2- Ruanda	40
V.2.3- RDSTP	42
IV.3- Comparação da frequência dos <i>SNPs</i> nas três Regiões Endêmicas	44
IV.4- Haplótipos do gene <i>pfubp-1</i>	45
IV.4.1- Haplótipos do Brasil.....	45
IV.4.2- Haplótipos do Ruanda.....	48
IV.4.3- Haplótipos da RDST	50
IV.5- Comparação dos Haplótipos no gene <i>pfubp-1</i> encontrados nas Regiões Endêmicas.....	52
IV.6- Estudos dos perfis genotípicos do gene <i>pfATPase6</i> em populações naturais da R.D.S.T.P., Ruanda e do Brasil.	52
IV.6.1- Brasil.....	53
IV.6.2- Ruanda	54
IV.6.3- RDST	54
IV.7- Comparação dos Haplótipos encontrados nas três Regiões Endêmicas	55
IV.8- Agrupamento Haplótipico (Haplogrupo) dos genes <i>pfubp-1</i> e <i>pfATPase6</i>.....	55
IV.8.1- Brasil.....	55
V.8.2- Ruanda.....	57
V.8.3- R.D.S.T.....	58
IV.9- Estudo comparativo de haplótipos entre alelos do gene <i>pfubp1</i> e <i>pfATPase6</i> nas amostras.	59

V- DISCUSSÃO 60

V.1- Perfil Genotípico e Suscetibilidade Farmacológica	61
V.2- Mutações Sinónimas vs Mutações Não-Sinónimas.....	61
V.3- Haplótipos do gene <i>pfubp-1</i>	62
V.4- Agrupamento Haplótipico entre os Genes <i>pfubp-1</i> e <i>pfATPase6</i>.....	63

VI -CONCLUSÕES 67

VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 68

VIII- ANEXOS 86

ANEXO 1:	86
-----------------------	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de vida do <i>Plasmodium spp</i>	3
Figura 2- Distribuição Geográfica de Malária.....	4
Figura 3- Estrutura química da artemisinina e seus derivados.....	19
Figura 4- Esquema representativo do mecanismo de ação da artemisinina e derivados.....	20
Figura 5- Mecanismo de Proteólise mediada pela via ubiquitina-proteossoma.....	23
Figura 6- Esquema representativo da localização no cromossoma 1 dos genes <i>pfubp-1</i> e <i>pfATPase6</i>	25
Figura 7- Esquema representativo da localização dos pares de <i>primers</i> utilizados na sequenciação do gene <i>pfubp-1</i>	35
Figura 8- Géis de Agarose (2%) com resultados típicos dos 6 pares de <i>primers</i> utilizados para sequenciação do gene <i>ubp-1</i>	36
Figura 9- Frequência Absoluta dos polimorfismos encontrados em isolados naturais de <i>P.falciparum</i> provenientes do Brasil.	40
Figura 10- Prevalência dos Polimorfismos encontrados em isolados naturais de <i>P.falciparum</i> provenientes do Brasil.	40
Figura 11- Frequência Absoluta dos polimorfismos encontrados em isolados naturais de <i>P.falciparum</i> provenientes do Ruanda.	41
Figura 12- Prevalência dos Polimorfismos encontrados em isolados naturais de <i>P.falciparum</i> provenientes do Ruanda.	42
Figura 13- Frequência Absoluta dos Polimorfismos encontrados em isolados naturais provenientes da RDST.....	43
Figura 14- Prevalência dos Polimorfismos encontrados em isolados naturais de <i>P.falciparum</i> provenientes da RDST.....	43
Figura 15- Esquema representativo dos domínios estruturais da proteína codificada pelo gene <i>pfubp-1</i>	62
Figura 16- Esquema representativo do Desenvolvimento Haplóide de <i>P.falciparum</i> no cromossoma 1 dos genes <i>pfubp-1</i> e <i>pfATPase6</i>	64
Figura 17- Esquema representativo do desenvolvimento diplóide de <i>P.falciparum</i> no cromossoma 1 dos genes <i>pfubp-1</i> e <i>pfATPase6</i>	65

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Classificação de Antimaláricos.....	7
Tabela 2- Ano de introdução do antimalárico e registo dos primeiros casos de resistência ao fármaco	10
Tabela 3- Antimaláricos utilizados para o estudo de susceptibilidade <i>in vitro</i>	29
Tabela 4- Antimaláricos utilizados para o estudo de susceptibilidade <i>in vitro</i>	30
Tabela 5- <i>Primers</i> e condições de PCR utilizados na sequenciação do gene <i>pfubp-1</i>	32
Tabela 6- Classificação dos Polimorfismos encontrados.....	37
Tabela 7- Frequência Absoluta de <i>indels</i> do gene <i>pfubp-1</i> nas regiões endêmicas estudadas...39	
Tabela 8- Haplótipos no gene <i>pfubp-1</i> em amostras do Brasil.....	47
Tabela 9- Haplótipos no gene <i>pfubp-1</i> em amostras do Ruanda.....	49
Tabela 10- Haplótipos no gene <i>pfubp-1</i> em amostras da RDST	51
Tabela 11- Haplótipos do gene <i>pfATPase6</i> encontrados no Brasil.....	53
Tabela 12- Haplótipos no gene <i>pfATPase6</i> encontrados no Ruanda.	54
Tabela 13- Haplótipos no gene <i>pfATPase6</i> encontrados na RDST.	54
Tabela 14- Agrupamento Haplótipo dos genes <i>pfubp-1</i> (UBP) e <i>pfATPase6</i> (ATP) em amostras do Brasil.	56
Tabela 15- Agrupamento Haplótipo dos genes <i>pfubp-1</i> (UBP) e <i>pfATPase6</i> (ATP) em amostras do Ruanda.	57
Tabela 16- Agrupamento Haplótipo dos genes <i>pfubp-1</i> (UBP) e <i>pfATPase6</i> (ATP) em amostras da RDST.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AMQ- Amodiaquina

A+T- Adenina + Timina

ATN- Artesunato

ATP- Adenina trifosfato

ATM- Artemeter

ATP- Adenosina trifosfato

CQ- Cloroquina

D.A- artemisinina e derivados

D.D.T.- dicloro-difenil-tricloroetano

DHA- Dihidroartemisinina

DHFR- Dihidrofolato reductase-timidilato sintase

DHPS- Dihidropteroato sintetase

DNA- Ácido desoxirribonucleico

dNTP- 3`-desoxinucleósido-5`-trifosfato

ex.- Exemplo

FP- Ferritoporfirina IX

HZ- Hemozoína

IC₅₀- Concentração que inibe o crescimento de 50% dos parasitas

IHMT- Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Indels- inserção/delecção

Mb- Megabases

ml- Mililitro

nM- Nanomolar

O.M.S.- Organização Mundial de Saúde

pb- Par de bases

PBS- *Phosphate Buffer Saline*

PCR- Reacção de Polimerização em cadeia (*Polymerase Chain Reaction*)

PfATPase6- Proteína *Plasmodium falciparum calcium-transporting ATPase*

pfATPase- Gene *Plasmodium falciparum calcium-transporting ATPase*

pfcr1- Gene *Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter*

pfmdr1- Gene *Plasmodium falciparum multidrug resistance 1*

pfubp-1- Gene *Plasmodium falciparum ubiquitin-specific protease*

Pfubp-1- Proteína *Plasmodium falciparum ubiquitin-specific protease*

RDSTP- República Democrática de São Tomé e Príncipe

RNA- Ácido Ribonucleico

rRNA- Ácido Ribonucleico ribossomal

r.p.m.- Rotações por minuto

SERCA- Enzima retículo sarco/endoplasmático Ca²⁺ ATPase

SNP- *Single nucleotide polymorphisms*

SP- Sulfadoxina-Pirimetamina

TBE- Tampão contituído por Tris, ácido bórico e EDTA

TCTP- *translationally controlled tumor protein*

TRIS- Tris (hidroximetil) aminometano

tRNA- Ácido Ribonucleico de transferência

Ub- ubiquitina

W.H.O. - World Health Organization

RESUMO

A Malária é considerada um problema grave de saúde pública nas regiões onde é endêmica. A interrupção dos regimes terapêuticos e a ausência de fármaco-vigilância adequada levou ao surgimento de populações de parasitas resistentes, sendo este, um dos principais obstáculos ao controlo eficaz desta doença. Actualmente a resistência em *Plasmodium falciparum* já existe para todas as classes de antimaláricos excepto no caso dos derivados da artemisinina. A estrutura genética da população de *P. falciparum* varia em diferentes áreas geográficas dependendo dos níveis de transmissão e endemicidade da infecção. Estudos prévios demonstraram que, mutações pontuais em dois genes em particular, *pfATPase6* e *pfubp-1*, poderão exercer uma influência moduladora da actividade antimalárica dos derivados da artemisinina.

As populações parasitárias de uma dada região poderão apresentar diversas combinações entre polimorfismos no gene *pfubp-1* e o genótipo do *pfATPase6* originando diferentes haplótipos entre alelos destes genes, ambos localizados no cromossoma 1 do parasita *P.falciparum*. O gene *ubp-1* codifica uma protease ubiquitina-específica. A sequenciação do gene *ubp-1* em isolados naturais de *Plasmodium falciparum*, provenientes do Brasil, Ruanda e São Tomé e Príncipe permitiu analisar a frequência de putativos polimorfismos genéticos e investigar potenciais haplótipos entre alelos dos genes *pfubp1* e *pfATPase6* nas amostras provenientes destas regiões. No conjunto dos isolados naturais estudados, foram encontradas duas mutações não-sinónimas que se localizam no domínio funcional da proteína codificada pelo gene *pfubp-1*. Adicionalmente, os resultados obtidos revelaram diferenças relativamente à frequência dos polimorfismos estudados e, na frequência de potenciais haplótipos entre alelos dos genes *pfubp1* e *pfATPase6* oriundos das diferentes regiões endémicas estudadas.

Verificou-se uma menor variabilidade de polimorfismos e menor variabilidade haplotípica no Brasil comparativamente às duas regiões Africanas estudadas.

Os resultados deste trabalho deram a conhecer a estrutura populacional em termos do perfil de dois potenciais moduladores genéticos de susceptibilidade à artemisinina e derivados antes da

utilização destes fármacos em larga escala. Deste modo, o presente estudo traduz-se como uma ferramenta que servirá de base a actividades de vigilância molecular continuadas, no intuito de preservar a eficácia prolongada desta importante classe de antimaláricos.

ABSTRACT

Malaria is considered a serious problem of public health in the regions where it is endemic. The interruption of the therapeutic regimes and the absence of the adequate drug-surveillance led to the appearance of populations of resistant parasites, being this, one of the main obstacles to the efficient control of this disease. Currently the resistance in *Plasmodium falciparum* already exists for all the antimalarial drugs except in the case of the derivatives of the artemisinin (DA). The genetic structure of the population of *P. falciparum* varies in different geographic areas depending on the levels of transmission and endemic of the infection. Previous studies demonstrated that, point mutations in two genes, *pfATPase6* and *pfubp-1*, will have a modulating influence of the drug activity of the D.A. The parasitic populations of a given region will be able to present diverse combinations between polymorphisms in the gene *pfubp-1* and the genotype of *pfATPase6* originating different haplotypes between alleles of these genes, both located in chromosome 1 of the *P.falciparum* parasite. The gene *pfubp-1* codifies a specific ubiquitin protease. The sequence of the gene *ubp-1* in natural isolation, that come from Brazil, Ruanda and São Tomé and Príncipe (RDST) allowed to analyse the frequency of putative genetic polymorphisms and to investigate potential haplotypes between alleles of the genes *pfubp1* and *pfATPase6*. In the group studied, two non-synonym mutations were found in the functional domain of the codified protein by the gene *pfubp-1*. In addition, the results revealed differences relatively to the frequency of studied polymorphisms and, in the frequency of potential haplotypes between alleles of the deriving genes *pfubp1* and *pfATPase6*. It was verified that there was a lesser variability of polymorphisms and a minor haplotype variability in Brazil compared to the two studied African regions.

The results showed the population structure in terms of the profile of two genetic modulating potentials of susceptibility to the DA before the use of these drugs on a large scale. The present study is expressed as a tool that will serve as a continued activity base of monitoring molecules, in order to preserve effectiveness of the DA.

I-INTRODUÇÃO

1.1- Malária

A Malária ou Paludismo é uma doença que resulta da infecção por protozoários do género *Plasmodium*, transmitidos ao ser humano pela picada do mosquito fêmea do género *Anopheles*. Existem 4 espécies de protozoários do género *Plasmodium* responsáveis pela infecção humana: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium falciparum*, sendo esta a espécie mais patogénica. A doença causada por *Plasmodium falciparum* quando não tratada, pode evoluir para malária grave que poderá ser fatal. A malária grave pode assumir as formas de anemia grave e malária cerebral (W.H.O., 2006c).

1.2- Ciclo de Vida

O ciclo de vida deste parasita passa por duas fases: fase sexual esporogónica (exógena) com a multiplicação do parasita no vector (hospedeiro definitivo) e, a fase assexual esquizogónica (endógena) com a multiplicação nos seres humanos (hospedeiro intermediário) (Figura 1). A fase assexual inclui a esquizogonia exoeritrocitária ou hepática, que ocorre nas células do fígado e a esquizogonia eritrocitária que ocorre no sangue.

A infecção humana resulta da picada do mosquito fêmea do género *Anopheles*, que ao alimentar-se do sangue, inocula juntamente com a saliva, esporozoítos no interior dos vasos sanguíneos (1). Os esporozoítos invadem os hepatócitos (2) onde crescem e se multiplicam diferenciando-se em esquizontes hepáticos (3) e, representam as formas infectantes. A esta fase chama-se esquizogonia hepática (A). No ciclo de vida do *P. vivax* e *P. ovale* os esporozoítos podem originar hipnozoítos, que permanecem no hepatócito num estado dormente, durante o qual não se dividem, desenvolvendo-se meses ou anos mais tarde. No ciclo de *P. malariae* e *P. falciparum*, inicia-se de imediato a maturação dos esquizontes hepáticos da qual resultam os merozoítos hepáticos que

são libertados para a corrente sanguínea por lise dos hepatócitos, embora alguns acabem por ser fagocitados e destruídos pelas células de Kupfer (4). Lançados na corrente sanguínea, invadem os eritrócitos (5), iniciando-se a esquizogonia eritrocitária (B), na qual os merozoítos se diferenciam em trofozoítos e estes por divisões sucessivas dão origem a esquizontes eritrocitários. Quando completamente amadurecidos abandonam o eritrócito parasitado, são libertados na corrente sanguínea (6) e rapidamente penetram nos eritrócitos intactos, para repetir o ciclo assexuado. A esquizogonia eritrocitária ocorre preferencialmente na circulação sanguínea das vísceras sendo que, no caso de *P. falciparum*, os esquizontes raramente são vistos no sangue periférico excepto em infecções graves. Depois de algum tempo de evolução da infecção malárica, alguns merozoítos não evoluem para esquizontes mas diferenciam-se nas formas sexuadas do parasita (7) denominados de gametócitos que possuem morfologia característica e devem assegurar a continuidade da espécie, se e quando os parasitas forem ingeridos durante a refeição sanguínea (8) por outro mosquito fêmea do género *Anopheles*. Logo que os gametócitos maduros são ingeridos pela fêmea do mosquito *Anopheles*, atingem o “estômago” (intestino médio), transformam-se em células sexuais maduras. Cada macrogametócito dá origem a um macrogâmeta (oócito ou ovo não fecundado), e o microgametócito produz algumas células masculinas flageladas (microgâmetas). Um microgâmeta penetra no macrogâmeta, dando origem ao ovo fecundado (zigoto) (C) iniciando-se o ciclo esporogónico (C). O zigoto torna-se móvel (oocineto) (10), migra através da parede do estômago e enquista (oocisto) (11). O oocisto cresce rapidamente e apresenta centros nucleares internos, cada um dos quais dá origem a um grande número de esporozoítos (12). Quando os esporozoítos atingem a fase de maturação, a parede do oocisto muito aumentado rompe-se e liberta-o para a cavidade geral (hemocele) do mosquito. Muitos desses esporozoítos migram eventualmente para as glândulas salivares, acumulando-se nos ductos salivares, tornando-se infectantes. Quando o mosquito infectado faz nova refeição sanguínea (1), os esporozoítos são inoculados nos vasos sanguíneos e iniciam uma nova

infecção humana.

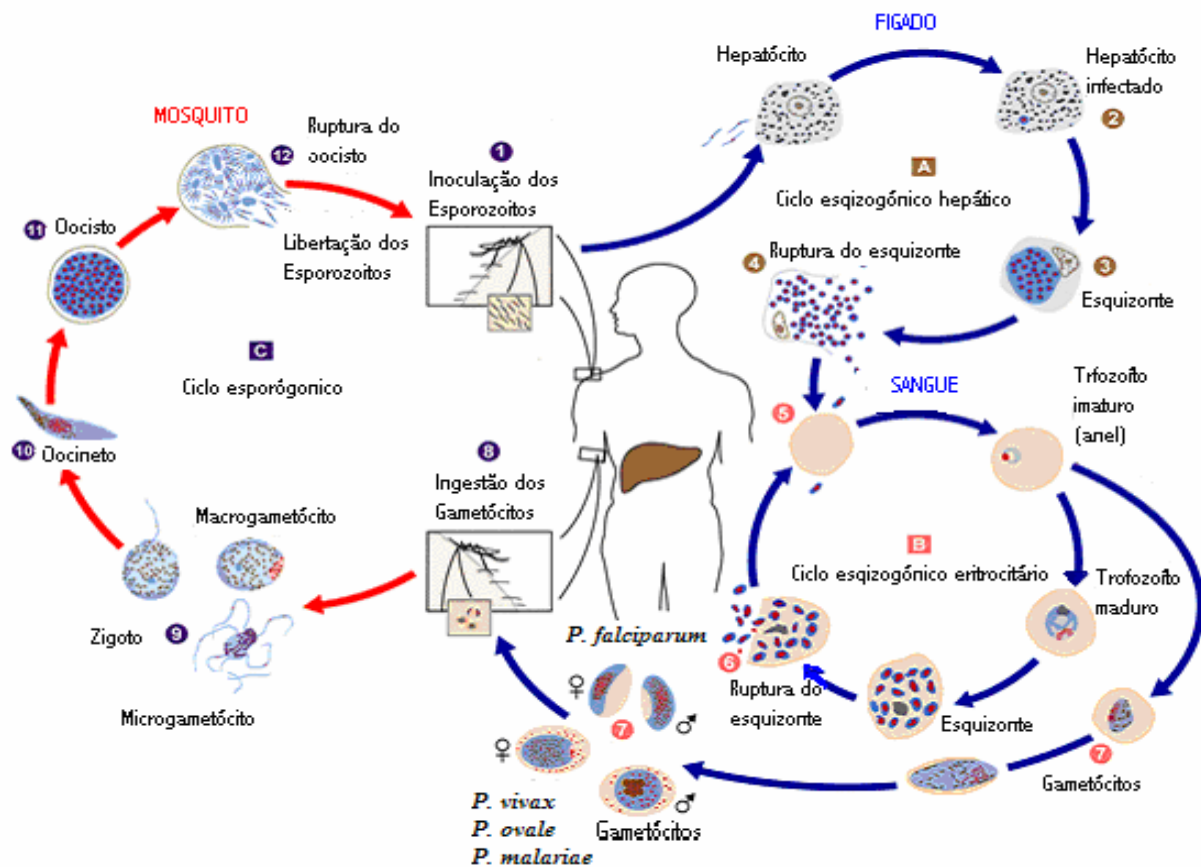


Figura 1- Ciclo de vida do *Plasmodium spp* (gentilmente cedido por pela Dr^a Isabel Ferreira, IHMT).

1.3- Epidemiologia

A malária existe potencialmente em todas as regiões onde existem humanos e mosquitos *Anopheles*, dando-se a conseqüente transmissão da doença, o que inclui todas as regiões tropicais de todos os continentes e muitas regiões subtropicais (Figura 2) onde existem condições ambientais favoráveis à sua transmissão.

É um problema grave de saúde pública em mais de 100 países onde é endêmica. Estima-se que aproximadamente 40% da população mundial reside nestas zonas, calculando-se que, em cada ano ocorram cerca 300 a 500 milhões de casos clínicos e cerca de 1,5 a 2,7 milhões de mortes anuais, das quais 1 milhão são crianças com idade inferior a cinco anos, grávidas e pessoas não imunes que viajam para zonas onde existe a transmissão (W.H.O., 2005b). Sabe-se que mais de 90% dos casos

clínicos ocorrem na África sub-Sahariana e, são devidos a infecções por *Plasmodium falciparum* (Suh *et al.*, 2004). Por apresentar elevada morbidade e mortalidade, a malária tem grande impacto sob o ponto de vista sócio-económico, atenuando o desenvolvimento das regiões afectadas (W.H.O., 2005b). A taxa de mortalidade atribuída a esta doença está a aumentar, especialmente na África Sub-Sahariana devido ao insucesso dos antimaláricos e, existe também evidência de que o parasita está a emergir em áreas onde a malária já tinha sido erradicada ou controlada (White, 2004; W.H.O., 2005b). Nos países onde esta doença não é endémica existe um número crescente de casos devido ao aquecimento global e importação de malária por aumento de migração de indivíduos (portadores de gametócitos) de áreas endémicas e, do número crescente de viajantes para países tropicais onde existe transmissão endémica de malária (Martínez-Baylach *et al.*, 2007; I.P.C.C., 2007; MacPherson *et al.*, 2007).

■ Distribuição de Malária

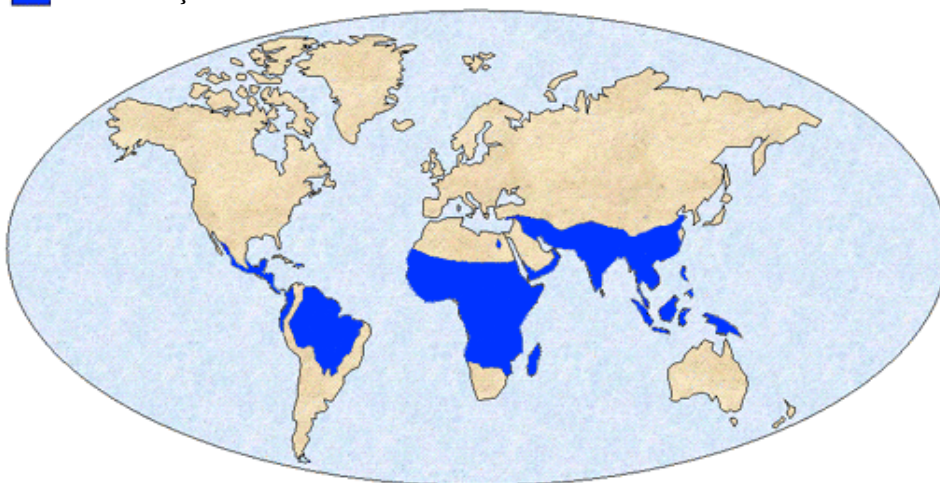


Figura 2- Distribuição Geográfica de Malária (http://www.cdc.gov/malaria/distribution_epi/distribution.htm).

A distribuição geográfica das espécies que causam malária é diferente: a espécie mais patogénica, o *P.falciparum* é predominante na África sub-Sahariana e em algumas áreas do Sudeste Asiático e Oceânia.

1.4- Genoma de *Plamodium falciparum*

Os parasitas são seres haplóides grande parte do seu ciclo de vida com excepção da fase em que se apresentam como oocinetos, a única fase em que são um organismo diplóide (Conway *et al.*, 1999). Os parasitas reproduzem-se sexuadamente a partir da fecundação do macrogâmeta com o microgâmeta, aquando da refeição sanguínea de um vector num hospedeiro infectado, originando seres diplóides (oocinetos). O oocineto resulta da meiose na qual há recombinação entre cromossomas homólogos (Conway *et al.*, 1999).

O DNA de *Plamodium* está organizado em 3 genomas:

- Genoma nuclear que contém a maioria dos genes, alguns dos quais envolvidos na resistência a antimaláricos;
- Genoma mitocondrial com 6 kilobases, contém os genes que codificam as enzimas responsáveis pelo transporte de electrões;
- Genoma circular plasmídico com 35 kilobases, que contém os genes que codificam principalmente rRNA, tRNA e proteínas ribossomais.

O genoma nuclear haplóide tem aproximadamente 23 Mb, sendo a sua composição em A+T de aproximadamente 80,6% , distribuídas em 14 cromossomas que codificam cerca de 5.300 genes (Gardner *et al.*, 2002). Os cromossomas destes parasitas apresentam nas extremidades as regiões polimórficas (Lanzer *et al.*, 1994). As extremidades consistem em regiões teloméricas e subteloméricas. Nas regiões subteloméricas localizam-se os genes envolvidos na variabilidade antigénica do parasita (Gardner *et al.*, 2002).

A sequenciação do genoma de *P. falciparum* 3D7 permitiu alargar os conhecimentos e redefinir a investigação na área da resistência aos antimaláricos através de estudos genómicos comparativos (Cravo *et al.*, 2006).

1.5- Controlo

Na primeira metade do século XX a estratégia defininda pela O.M.S. consistiu na aplicação domiciliária de insecticida, o D.D.T. e na toma do antimalárico, a cloroquina tendo este programa gozado de elevado sucesso nas regiões endémicas. No entanto, devido ao surgimento de resistência dos vectores aos insecticidas, dos parasitas aos antimaláricos (Garin *et al.*, 1991) e evasão do sistema imunitário do hospedeiro devido à grande variabilidade antigénica do parasita (Bajaj *et al.*, 2008), ocorreu um aumento progressivo no número de casos na maioria dos países onde ela era endémica. Estas circunstâncias levaram à revisão da estratégia a ser implementada que passou a ter como objectivo a redução dos níveis de transmissão, a taxa de mortalidade e morbilidade.

1.6- Antimaláricos

A utilização de antimaláricos tem sido o meio mais eficaz para reduzir as populações parasitárias. O uso correcto dum antimalárico eficaz diminui não só a duração do episódio de malária, como também reduz a incidência de complicações e o risco de morte (W.H.O., 2001b).

Os antimaláricos podem ser classificados com base na estrutura química e na acção contra os parasitas nas diferentes fases de seu ciclo de vida em seres humanos (Tabela 1) e, pelas indicações clínicas do seu uso. Alguns fármacos apresentam mais do que um tipo de actividade antimalárica e, dessa forma, existem antimaláricos que permitem efectuar profilaxia causal, evitar recidivas, e cura clínica e supressora.

Os antimaláricos utilizados para a profilaxia causal são agentes que actuam nas formas teciduais primárias do parasita, bloqueando a passagem do estadio exoeritrocitário ao estadio eritrocitário.

Os fármacos utilizados para evitar recidivas são denominados de esquizontícidias teciduais (hipnozoítos hepáticos) e efectuam uma cura radical. Estes agentes também destroem gametócitos reduzindo a probabilidade de disseminação do parasita.

Os antimaláricos utilizados para a cura clínica e supressora são os que agem nos estadios eritrocitários assexuados dos parasitas de modo a interromper a esquizogonia eritrocitária e desse

modo cessar as crises (cura clínica). Um tratamento inadequado com esquizontícidias sanguíneos pode levar à recrudescência da infecção por esquizogonia eritrocitária. Os gametocidas são agentes que destroem as formas sexuais intra-eritrocitárias dos parasitas, prevenindo assim a transmissão de gametócitos ao mosquito vector. Os esporontícidias são os antimaláricos que fazem a ablação da transmissão mediante a prevenção ou inibição da formação de oocistos e esporozoítos nos mosquitos infectados.

Tabela 1- Classificação de Antimaláricos (Adaptado de Cravo *et al.*, 2006).

Antimalárico	Classe Química	Mecanismo de Acção	Ação Fase do Ciclo
Quinino e derivados Quinino# Amodiaquina Cloroquina Halofantrina Mefloquina Primaquina*	Metanolquinoleína 4-Aminoquinoleína 4-Aminoquinoleína Fenantreno-metanol 4-metanolquinoleína 8-Aminoquinoleína	Interferência na destoxificação do grupo heme	Esquizontícidias sanguíneos * Esquizontícidias tecidulares * Hipnozoítida * Gametocida (<i>P. falciparum</i>) # Gametocida (<i>P. vivax, P. malariae, P. ovale</i>)
Antagonistas dos Folatos Pirimetamina* Proguanil	2,4diaminopirimidina Biguanida	Inibição da síntese de ácidos nucleicos	Esquizontícidias sanguíneos * Esquizontícidias tecidulares
Sulfonamidas Sulfadoxina	Sulfonamida	Inibição da síntese de ácidos nucleicos	Esquizontícidias sanguíneos Esquizontícidias
Atovaquona	Hidroxinaftoquinona	Interferência na cadeia de transferência de electrões mitocôndrial	Esquizontícidias Sanguíneos

Artemisinina e derivados			
Artemisinina	Lactona sesquiterpénica		
Dihidroartemisinina	Artemisinina reduzida		Esquizontícidas sanguíneos
Artesunato	Sal sódico do semi-éster de ácido succínico da desidroartemisinina	Geração de <i>stress</i> Oxidativo ?	Gametocidas (<i>P. falciparum</i>)
Artemeter	Metil-éter da Dihidroartemisinina		
Antibióticos			
Tetraciclina	Tetraciclina	Inibidores da síntese proteica	Esquizontícidas sanguíneos
Doxiciclina	Tetraciclina		
Clindamicina	Macrólido		

Os fármacos apresentados na Tabela têm sido utilizados em diversas regiões para tratamento e profilaxia da malária, sendo os mais utilizados os compostos quinoleínicos (ex. cloroquina) e antifolatos (ex. combinação de sulfadoxina-pirimetamina), pelo facto de serem os mais acessíveis, fáceis de distribuir e eficazes.

1.7- Resistência aos Antimaláricos

A interrupção dos regimes terapêuticos e a ausência de fármaco-vigilância adequada levou ao surgimento de populações de parasitas resistentes.

A resistência *in vivo* aos antimaláricos é definida como “a capacidade que uma estirpe parasitária tem de sobreviver e/ou multiplicar-se apesar da administração e absorção de uma dada droga, em doses iguais ou maiores às habitualmente recomendadas, mas dentro dos limites de tolerância do indivíduo (Bloland, 2001).” O surgimento de recrudescências confirmam o fenótipo de resistência num indivíduo que recebeu tratamento antimalárico (White, 1998). A recrudescência consiste no reaparecimento de parasitémias (acompanhada de sintomatologia)

após um período de cura aparente como resultado de uma resposta inadequada ao tratamento (sobrevivência das formas eritrocitárias).

A multi-resistência refere-se ao fenótipo de resistência a dois ou mais fármacos pertencentes a classes químicas diferentes e tem sido observado em *P. falciparum*. A resistência a vários antimaláricos resulta dos aspectos comuns dos seus mecanismos de acção, bem como dos mecanismos de resistência que lhe estão associados (Le Bras & Durand, 2003).

O aparecimento de resistência aos antimaláricos levou ao desenvolvimento de métodos para determinar a susceptibilidade vs resistência do *P. falciparum*. Inicialmente era limitado à avaliação da resposta *in vivo*, tendo-se seguido a introdução dos métodos *in vitro*, ambos procedimentos complementares. Posteriormente, desenvolveram-se os marcadores moleculares de resistência. A procura de mutações em genes potencialmente envolvidos na fármaco-resistência pode ser realizada a partir de populações naturais de *P. falciparum* ou através de modelos murinos (Carlton *et al.*, 2001).

É fundamental realizar estudos (fármaco-vigilância, genética populacional, epidemiologia molecular) que prevejam a emergência e dispersão da resistência aos antimaláricos actualmente disponíveis para planear estratégias de tratamento e controlo mais eficazes.

A resistência em *P.falciparum* (*in vivo* e *in vitro*) já existe em todas as classes de antimaláricos excepto na classe das artemisininas e seus derivados (Tabela 2).

Tabela 2- Ano de introdução do antimalárico e registo dos primeiros casos de resistência ao fármaco (adaptado de Wongsrichanalai *et al.*, 2002).

Antimalárico	Ano da introdução	Ano do aparecimento de resistência
Quinino	1632	1910
Cloroquina	1945	1957
Proguanil	1948	1949
Sulfadoxina-pirimetamina	1967	1967
Mefloquina	1977	1982
Atovaquona	1996	1996
Artemisinina e Derivados	1980	—

1.8- Uso Racional de Antimaláricos

A resistência pode depender de vários factores tais como a administração incompleta ou inadequada de fármacos, propriedades intrínsecas ao composto utilizado (tempo de semi-vida), imunidade do hospedeiro (Cravo *et al.* 2001), farmacogenética, má nutrição (White, 1999; Hess *et al.*, 1997), vasto uso de monoterapia (White & Olliaro, 1996), e factores relacionados com o parasita e com o vector (W.H.O., 2001b). A resistência ou falha terapêutica são dois fenómenos distintos. A falha terapêutica é a ausência de resolução dos sintomas clínicos após tratamento com antimalárico. Falha terapêutica ou valores de IC₅₀ *in vitro* elevados não são suficientes para declarar a existência de resistência *in vivo*. Contudo a diminuição da susceptibilidade *in vitro*, será o primeiro alerta de possível aparecimento de resistência *in vivo*. Fármacos ineficazes levam ao aumento de falhas terapêuticas, o que aumenta o risco de malária grave e anemia, promovendo a sua transmissão.

A forma de combater a resistência e obter resultados com o tratamento, baseia-se no uso de combinações terapêuticas, que consistem em dois ou mais esquizotocidas sanguíneos com mecanismos de acção independentes e diferentes alvos bioquímicos no parasita (W.H.O., 2006c). A

racionalização do seu uso, permite um tratamento mais efectivo e, no raro evento de emergir um parasita mutante com fenótipo de resistência a um dos fármacos, o parasita será eliminado devido à presença de outros esquizontícidia que compõe a combinação terapêutica aplicada (W.H.O., 2006c). A O.M.S. recomenda a combinação terapêutica, preferencialmente com derivados de artemisinina no tratamento de malária não complicada e severa por *P.falciparum* (W.H.O. 2006c; Tangpukdee *et al.*, 2008). Em 2006 um total de 60 países tinham já adoptado a combinação terapêutica com derivados de artemisinina como tratamento de primeira linha ou de segunda linha (W.H.O., 2006b). As vantagens na utilização dos derivados de artemisinina são: rápida redução significativa da parasitémia, diminuição dos sintomas, eficácia contra estirpes multi-resistentes de *P. falciparum*, redução de gametócitos jovens, boa tolerância, ausência de resistência (W.H.O., 2001; W.H.O., 2006c) e um tempo de semi-vida curto. Essas observações, em conjunto com evidências de estudos clínicos de determinação de doses e de farmacocinética/farmacodinâmica sugerem o uso de esquemas com dois ou mais agentes com acções antimaláricas complementares para tratar a infecção por *Plasmodium falciparum* resistente aos medicamentos (White, 1999).

A combinação com outro antimalárico que apresente um tempo de semi-vida mais longo que a artemisinina e os seus derivados, permitirá um aumento da sua eficácia, reduzindo o tempo de duração do tratamento e a diminuição da probabilidade de desenvolvimento de fármaco-resistência. (W.H.O. 2001a).

Em alternativa à impossibilidade de recorrer aos derivados de artemisinina, utiliza-se a combinação da amodiaquina com sulfadoxina-pirimetamina (W.H.O., 2006b). No entanto em muitos dos países endémicos, os derivados de artemisinina são disponibilizados em mercados paralelos a baixo custo, sendo desta forma empregue a monoterapia em vez da terapia combinada com artemisinina e seus derivados (W.H.O., 2006b). A utilização de drogas em regime monoterapia tem sido associada ao surgimento de recrudescência que varia de níveis baixos a moderados *in vivo* (Ittarat *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003), possivelmente devido ao curto tempo de semi-vida (Afonso *et al.*,

2006). O aumento do consumo de derivados de artemisinina em monoterapia irá promover o surgimento de novas resistências e comprometer a eficácia do tratamento (W.H.O., 2006a).

1.9- Aspectos da Genética do parasita na Resistência aos Antimaláricos

A resistência aos antimaláricos pode ser resultado da reduzida afinidade ao alvo do fármaco resultando em mutações pontuais nos genes que codificam esse alvo terapêutico.

A maioria das infecções que decorrem em áreas de baixa endemicidade são sintomáticas, uma vez que os indivíduos não são imunes e são tratados imediatamente com antimalárico (Hastings, 2004). O surgimento da resistência tem início quando elementos da população parasitária exposta às concentrações do fármaco apresentam mutações espontâneas que lhes proporcionam uma vantagem selectiva e, que em condições normais inibiriam a proliferação da fracção sensível da população parasitária (Peters, 1990). Seguidamente há um processo de selecção do clone que apresenta maior vantagem de sobrevivência na presença do fármaco conduzindo a uma transmissão preferencial que irá resultar na dispersão do fenótipo de resistência (White & Pongtavornpinyo, 2003). O aumento proporcional de infecções tratadas resultam numa maior vantagem selectiva de uma dada mutação em áreas de baixa transmissão comparativamente a áreas de elevada transmissão. Portanto mutações que confirmam resistência são mais frequentes nas áreas de baixa transmissão (Hastings, 2004). A recrudescência e subsequente transmissão de uma infecção que origine um novo fenótipo de resistência é necessária para que essa resistência se propague (White, 1999). Para impedir a dispersão de resistência é necessário prevenir a produção de gametócitos provenientes de parasitas recrudescentes (White & Pongtavornpinyo, 2003).

1.9.1- Estrutura Genética de Populações Parasitárias

A estrutura genética da população de *P.falciparum* varia em diferentes áreas geográficas dependendo dos níveis de transmissão e endemicidade da infecção.

A recombinação genética ocorre a taxas bastante elevadas em populações naturais de *P.falciparum* (Conway *et al.*, 1999). Os novos genótipos provavelmente reflectem a influência na

diversidade de selecção exercida nos genes por factores tais como imunidade do hospedeiro e pressão selectiva do antimalárico (Jeffares, *et al.*, 2007; Volkman, *et al.*, 2007). O número de polimorfismos varia nas diferentes classes de genes e em diferentes regiões dentro dos cromossomas (Ekland & Fidock, 2007). Os polimorfismos genéticos não são segregados aleatoriamente. Em vez disso, eles tendem a formar *clusters* denominados de haplótipos resultantes de recombinação genética (Ekland & Fidock, 2007).

Nas populações parasitárias da mesma espécie, o aparecimento de polimorfismos de tamanho nos cromossomas podem ser devidos a:

- Delecções ou inserções de sequências de DNA telomérico e subtelomérico (Corcoran *et al.*, 1986; Pologe & Ravetch, 1988);
- Amplificação génica (Foote *et al.*, 1989; Triglia *et al.*, 1991);
- Recombinação génica (Sinnis & Wellems, 1988; Corcoran *et al.*, 1988);
- Re-arranjos dos cromossomas (Frontali *et al.*, 1991).

Elevadas taxas de recombinação como as observadas em estirpes de *P. falciparum* em África tendem a esconder a proximidade (*linkage*) com os clones ancestrais (Ekland & Fidock, 2007). O recurso ao *linkage disequilibrium* (L.D.) é um conceito ideal para estudar a dispersão do fenótipo de resistência genética na população parasitária. O L.D. mede a associação não-aleatória de alelos de diferentes *loci* e pode ocorrer entre dois genes que não se encontram fisicamente próximos. A medição de *linkage disequilibrium* é realizada considerando dois *loci* (A ou B), em que cada um segrega dois alelos (A_1, A_2, B_1, B_2) existindo quatro possíveis gâmetas (haplótipos) dentro da população. Se os alelos não se encontrarem aleatoriamente associados apresentarão divergência nas frequências esperadas, encontrando-se em *linkage disequilibrium*. Desta forma existem quatro genótipos heterozigóticos resultantes da recombinação e, que são diferentes dos encontrados nos progenitores. Se os alelos do dois *loci* encontram-se aleatoriamente associados, a frequência dos quatro gâmetas são iguais ao produto da frequência dos alelos que contêm, tratando-se de *linkage equilibrium*.

As populações parasitárias de áreas de elevada transmissão, *P.falciparum* exibem pouco ou nenhum *linkage disequilibrium* entre alelos de *loci* em diferentes partes do genoma (Conway, 2007). Isto não é surpreendente, uma vez que a frequência de infecções com diferentes genótipos, promovem a recombinação dos gâmetas desses genótipos dentro do mosquito aquando da refeição sanguínea. Nas áreas hiperendêmicas geralmente só ocorre um forte *linkage disequilibrium* entre nucleótidos muito próximos (distâncias inferiores a 1kb) (Conway *et al.*, 1999; Polley *et al.*, 2003; Conway, 2007). No entanto estes dados são consistentes com a taxa de recombinação meiótica de *P.falciparum* com 1% de probabilidade de ocorrer *crossing-over* a cada 17 Kb ao longo de um cromossoma (Su *et al.*, 1999).

As populações parasitárias existentes em áreas pouco endêmicas, possuem uma proporção de mistura de genótipos mais baixa, como resultado de uma taxa de infecção baixa e dessa forma os parasitas têm uma elevada taxa de fecundação de gâmetas femininos e masculinos provenientes do mesmo clone aquando da refeição sanguínea do vector (Conway, 2007).

Populações com elevados níveis de cruzamento, por vezes apresentam um significativo grau de associação não aleatória entre alelos de *loci* situados em cromossomas diferentes (*Linkage disequilibrium*) (Conway *et al.*, 2007).

As populações parasitárias de África possuem as maiores proporções de infecções com múltiplos genótipos e o menor *linkage disequilibrium*, enquanto que as populações da América do Sul apresentam um *linkage disequilibrium* alto e as populações do Sudeste Asiático têm uma situação intermédia relativamente às regiões referidas (Conway, 2007; Anderson *et al.*, 2000).

É fundamental identificar e compreender os mecanismos envolvidos no surgimento de resistência, bem como detectar as mutações em genes do parasita que possam estar relacionados com diminuição de susceptibilidade e aparecimento de fenótipo de quimio-resistência geneticamente estável aos antimaláricos. O estudo dos marcadores genéticos de resistência são realizados através da procura de polimorfismos, observação de alterações da expressão, no número de cópias de genes (Ferreira *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2008) e em estudos de proteómica (Cooper & Carucci, 2004). Os polimorfismos incluem pequenas sequências de repetição de nucleótidos

(microsatélites), *SNPs* (*single nucleotide polymorphisms*) e *indels* (inserções/deleções) (Ekland & Fidock, 2007).

1.10- Mecanismos de Acção e Resistência dos Principais Antimaláricos

1.10.1-Cloroquina (CQ)

A cloroquina foi introduzida em todas as regiões endémicas após a II Guerra Mundial como principal medida terapêutica e profilática. O seu sucesso ficou a dever-se à sua eficácia contra as formas eritrocitárias do *P. falciparum*, uso fácil e seguro, baixo custo e ausência de efeitos secundários (Cravo *et al.*, 2002).

Têm surgido diversas teorias com o intuito de explicar o seu modo de acção. A explicação melhor aceite entre a comunidade científica, baseia-se na interferência deste fármaco no mecanismo de digestão da hemoglobina (destoxificação do grupo heme) por parte dos parasitas. O *P. falciparum* durante o seu desenvolvimento intra-eritrocitário digere a hemoglobina dentro do seu vacúolo digestivo de onde a proteólise desta proteína resulta na formação de um produto denominado grupo heme ou ferriprotoporfirina IX (FP). A FP é altamente tóxica para o parasita dado causar um aumento da permeabilidade das membranas conduzindo eventualmente à lise celular (Slater *et al.*, 1991). Por ser tóxico para o parasita, este desenvolveu mecanismos de destoxificação de forma a evitar os seus efeitos nocivos através de 2 processos:

- Mecanismo enzimático que consiste na polimerização de FP num cristal inerte inofensivo para o parasita, a hemozoína (HZ) ou pigmento malárico;
- Os produtos não polimerizados em HZ (70-80%), difundem-se através da membrana vacuolar, alcançando o citosol do parasita, onde se localizam os mecanismos de destoxificação pela glutatona (Ginsburg *et al.*, 1998).

A acumulação do heme livre em concentrações elevadas provoca a morte dos parasitas (Ginsburg *et al.*, 1999).

A resistência à cloroquina foi observada doze anos após a sua introdução (Tabela 2). Vários estudos sobre resistência à cloroquina têm sido realizados com o objectivo de determinar qual ou quais os genes moduladores envolvidos nessa resistência. Mutações pontuais no gene *pfcr1*, em particular a mutação *pfcr1* K76T têm sido associadas à resistência de *P. falciparum* à cloroquina *in vitro* e *in vivo* em isolados provenientes de África, Sudeste Asiático, América do Sul e Irão (Vieira *et al.*, 2001; Hatabu *et al.*, 2005; Sarr *et al.*, 2006; Cojean *et al.*, 2006; Ojurongbe *et al.*, 2007; Ursing *et al.*, 2007; Zakeri *et al.*, 2008). O gene *pfcr1* (*P.falciparum chloroquine resistance transporter*), codifica uma proteína transmembranar, PfCRT, localizado no vacúolo do parasita.

1.10.2- Amodiaquina (AMQ)

A amodiaquina é uma 4-aminoquinoleína com uma estrutura química muito semelhante à cloroquina, sendo mais efectiva na eliminação da parasitémia em malária não grave. Actualmente é muito utilizada em combinação terapêutica com artesunato e sulfadoxina-pirimetamina (Olliaro & Mussano, 2003).

O mecanismo de resistência à AMQ ainda não é conhecido. Têm sido realizados vários estudos de resistência *in vivo*, alguns deles com resultados contraditórios, nomeadamente os que identificam mutações pontuais em ambos os genes *pfcr1* e *pfmdr1* (Happi *et al.*, 2006) e outras investigações apenas associam a presença de mutações pontuais num dos genes referidos (Ochong *et al.*, 2003; Dokomajilar *et al.*, 2006; Holmgren *et al.*, 2007; Nsohya *et al.*, 2007). Outros estudos têm sido desenvolvidos com o objectivo de relacionar a existência/inexistência de amplificação do gene com a existência/ inexistência do fenótipo de resistência. Nesse sentido foi realizado recentemente um estudo no Quênia que indicou que a resistência *in vivo* à modiaquina não está relacionada com a amplificação do gene *pfmdr1* (Holmgren *et al.*, 2006).

1.10.3- Sulfadoxina-Pirimetamina (Fansidar®)

A combinação sulfadoxina-pirimetamina (SP) actua sinergicamente como inibidores da biossíntese dos folatos, essencial para o parasita, uma vez que este é incapaz de obter as pirimidinas a

partir do seu hospedeiro (Ferone, 1997). Os parasitas necessitam de sintetizar cofactores, uma vez que não são capazes de utilizar os do hospedeiro. Para o fazerem, requerem um suplemento de dihidrofolato e de tetrahydrofolato que é produzido através da via da biossíntese de folato. Este processo envolve várias vias metabólicas catalisadas por diversas enzimas tais como a dihidropteroato sintase (DHPS) localizada no cromossoma 8 e a enzima bi-funcional dihidrofolato redutase-timidilato sintase (DHFR) localizada no cromossoma 4, que são alvos da combinação de SP.

A pirimetamina é um antagonista dos folatos, inibindo a enzima DHFR causando a depleção de tetrahydrofolato. A sulfadoxina é uma sulfonamida e actua por inibição da DHPS, evitando a formação do dihidropteroato (Frédérich *et al.*, 2002). A SP liga-se à DHPS e DHFR, inibindo o seu funcionamento tendo como consequência a morte do parasita, por interrupção da síntese de DNA.

O mecanismo de resistência à sulfadoxina-pirimetamina é bem conhecido e resulta de mutações pontuais nas regiões codificantes do centro activo das enzimas DHPS e DHFR (Carlton *et al.*, 2001; Wongsrichanalai *et al.*, 2002). Estas mutações parecem diminuir a afinidade do fármaco para o centro activo das enzimas, cuja observação foi verificada por todo o mundo.

Estudos com populações naturais identificaram que a presença de uma mutação pontual (S108N) no gene que codifica a enzima DHFR é suficiente para conferir resistência à pirimetamina, estando esta consideravelmente aumentada nos parasitas portadores de mais três mutações no mesmo gene (N51I, C59R, I164L) (Plowe, 2003). Recentemente foi sugerido que a origem de um triplo mutante no gene *dhfr* (N51I, C59R e S108N) é partilhada na Ásia e África Central e Ocidental (Maïga *et al.*, 2007). Mutações pontuais nos codões 436, 437, 540 e 613 do gene que codifica a enzima DHPS estão associados à resistência à sulfadoxina (Triglia & Cowman, 1994). Estudos demonstraram uma forte associação entre a presença de quintuplas mutações (*pf dhfr*: 108N, 51I, 59R; *pf dhps*: 437G, 540E) e falência terapêutica à combinação SP (Kublin *et al.*, 2002; Bwijo *et al.*, 2003; Schönfeld, *et al.*, 2007).

1.10.4- Artemisininas e seus derivados (D.A.)

A artemisinina é o composto activo derivado da semente *qing hao* proveniente da planta *Artemisia annua*, sendo utilizada na medicina tradicional chinesa para o tratamento de febre desde há 1500 anos.

Este grupo de antimaláricos induz uma resposta clínica e uma redução da parasitémia mais rápida que todos os fármacos existentes (Hien & White, 1993). A sua potência *in vivo* é 10-100 vezes maior que a dos outros antimaláricos (White, 1997). Esta classe de fármacos actua com elevada eficácia nas várias fases sanguíneas do parasita, incluindo a fase de trofozoíto jovem, reduzindo o número de gametócitos no sangue e diminuindo a infectividade dos gametócitos sobreviventes.

A artemisinina caracteriza-se quimicamente por ser uma lactona sesquiterpenóide com uma ponte de endoperóxido (C-O-O-C), essencial à sua actividade antimalárica (Figura 3A): tem baixa solubilidade em água e em óleo, o que limita as possíveis vias de administração. Para resolver esse problema foram desenvolvidos vários derivados semi-sintéticos (Figura-3B): artesunato, artemeter, arteeter e que posteriormente são metabolizados em dihidroartemisinina que é o metabolito biologicamente activo. O artesunato é hidrossolúvel e os derivados artemeter e arteeter são lipossolúveis (Meshnick *et al.*, 1996).

Os compostos desta classe de antimaláricos são fármacos com tempos de semi-vida muito curtos (3-5 horas), o que determina que a cura efectiva implica tratamentos em regime de multi-doses com duração de 7 dias. Regimes de tratamento inferiores e utilizados em monoterapia originam recrudescências (Hien, 1994).

Estudos *in vitro* realizados noutros protozoários e em linhas celulares eucariotas sugerem que o mecanismo de acção da artemisinina e derivados na avaliação da susceptibilidade é específico do *P.falciparum* (Golenser *et al.*, 2006).

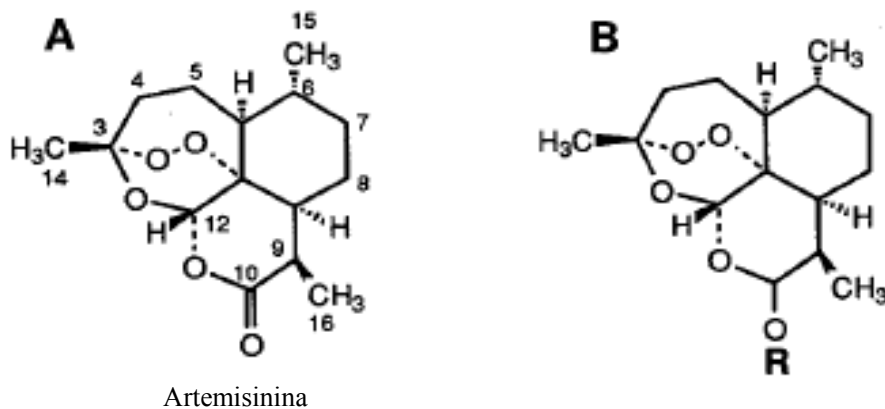


Figura 3- Estrutura química da artemisinina e seus derivados, (A) Artemisinina e (B) Derivados da Artemisinina incluindo a dihidroartemisinina: Dihidroartemisinina(R=H), Artemeter (R=CH₃), Arteeter (R=CH₂CH₃), Artesunato (R=OCO(CH₂)₂CO₂Na) (Adaptado de Meshnick *et al.*, 1996).

Outro derivado semi-sintético, artemisona, está em fase de ensaios clínicos, e parece ser o mais potente e sem efeitos secundários relevantes (Haynes *et al.*, 2006; Vivas *et al.*, 2007; Nagelschmitz *et al.*, 2008).

A artemisinina e os seus derivados actuam com elevada eficácia nas várias fases sanguíneas do parasita, incluindo a fase do trofoíto jovem, reduzindo o número de gametócitos no sangue, permitindo um decréscimo na transmissão. Porém não afectam os parasitas primários ou no estado tecidular latente e por isso não são úteis para a quimioprofilaxia nem para a prevenção de recidivas por *P. vivax*. Esses compostos agem rapidamente nos estádios eritrocitários assexuados do *P. vivax* e de clones de *P. falciparum* sensíveis à cloroquina, resistentes à cloroquina e multi-resistentes.

1.10.4.1- Mecanismo de Acção

O mecanismo de acção da artemisinina e derivados ainda não é completamente conhecido, no entanto o modelo actual mais aceite sugere que decorre no vacúolo digestivo do parasita e envolve dois passos (Figura 4):

- O ferro (Fe²⁺) heme intraparasitário dos eritrócitos infectados catalisa a clivagem da ponte de endoperóxido (Robert *et al.*, 2001);

- Seguidamente ocorre um rearranjo molecular que produz radicais com carbonos centrais que modificam de modo covalente e lesam proteínas específicas do parasita (Meshnick, 2002).

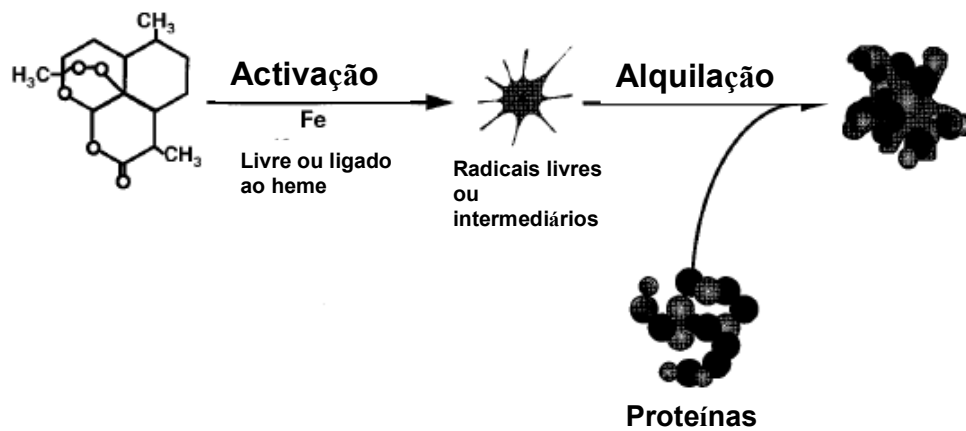


Figura 4- Esquema representativo do mecanismo de acção da artemisinina e derivados (Meshnick et al., 1996).

De uma forma sucinta este grupo de fármacos tem como mecanismo de acção a formação de radicais livres após clivagem da ponte de endoperóxido, levando à produção de stress oxidativo (Robert et al., 2001). É proposto que essa ponte seja clivada pelo grupo heme intra-parasitário ou Fe^{2+} , o que leva à formação dum radical livre que funcionará como um agente alquilante que irá reagir com o grupo heme e proteínas parasitárias (Meshnick, 2002).

Num estudo com dihidroartemisinina marcada radioactivamente verificou-se que um dos principais alvos de alquilação é a proteína homóloga da TCTP (*translationally controlled tumor protein*) em *P. falciparum* (Bhisutthibhan et al., 1998) e que esta proteína encontra-se presente na membrana do vacúolo digestivo do parasita (Bhisutthibhan et al., 1999).

Estudos recentes propõem no entanto outro mecanismo de acção baseado na alteração do armazenamento intracelular de cálcio através da inibição da actividade da enzima ATPase Ca^{2+} de *Plasmodium spp*, codificada pelo gene *pfATPase6* (Eckstein-Ludwig et al., 2003). A artemisinina possui uma estrutura semelhante à taspigargina, um inibidor específico da enzima retículo

sarco/endoplasmático Ca^{2+} ATPase (SERCA). Deste modo foi colocada a hipótese que a artemisinina, depois de activada, se comportasse como um inibidor específico da SERCA do *P. falciparum*. A PfATPase6 é a única ATPase Ca^{2+} do tipo SERCA identificada no genoma do *Plasmodium spp*, tendo sido expressa em oocistos de *Xenopus laevis*, onde foi avaliada a actividade de vários derivados de artemisinina. Foi demonstrado que a artemisinina inibe o ortólogo do SERCA no *Plasmodium falciparum* (PfATPase6) em oocistos de *Xenopus laevis* com eficácia semelhante à tapsigargina, evidenciando que a artemisinina actua por inibição da PfATPase6 (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003). Por outro lado a artemisinina e derivados formam ligações covalentes com quatro proteínas parasitárias associadas à membrana, sugerindo que a inibição de proteínas adicionais pode também desempenhar um papel na morte do parasita (Krishna *et al.*, 2004).

1.10.4.2- Mecanismo de Resistência

Apesar do mecanismo de resistência à artemisinina e derivados ainda não estar esclarecido, é de extrema importância identificá-lo e compreendê-lo. Isto porque existe a possibilidade de surgimento de resistência, sem no entanto existir alternativa farmacológica. Conhecer as propriedades do fármaco e as bases moleculares de resistência, permitem evitar a repetição de alguns erros do passado, através da implementação de estratégias racionais de monitorização terapêutica. Esta monitorização promove o ajuste das combinações terapêuticas de forma a maximizar a eficácia terapêutica e evitar a emergência e dispersão dos alvos mutados que conferem diminuição ou ausência de susceptibilidade. Diversos estudos apontam vários genes candidatos de modular a susceptibilidade a este grupo de antimaláricos. Estes estudos revelam que a existência de mutações nos seguintes genes candidatos: *pfATPase6* e *pfubp-1* (Jambou *et al.*, 2005; Uhlemann *et al.*, 2005; Afonso *et al.*, 2006).

Gene *pfATPase6*

O gene *pfATPase6* codifica uma ATPaseCa²⁺ tipo SERCA do *Plasmodium spp* que foi recentemente proposto como um alvo terapêutico dos derivados de artemisinina (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003). Estudos sugerem que o desenvolvimento do fenótipo de resistência depende de alterações na ATPase Ca²⁺ do tipo SERCA do *Plasmodium falciparum* (Uhlmann *et al.*, 2005; Jambou *et al.*, 2005). A presença de mutações em aminoácidos da proteína PfATPase6 modula a suscetibilidade *in vitro* à artemisinina num sistema heterólogo, tendo-se verificado que a acção inibitória da artemisinina na actividade PfATPase6 em oocistos de *Xenopus laevis* é influenciada por mutagénese dirigida (Uhlmann *et al.*, 2005). Recentemente foi identificada uma mutação, S769N, no gene *pfATPase6* em seis de sete isolados da Guiana Francesa, com reduzida susceptibilidade *in vitro* ao artemeter: esses isolados apresentavam uma média de valores de IC₅₀ *in vitro*, vinte vezes superior ao valor máximo apresentado pelos outros isolados estudados. Foi sugerido que esta mutação evita que os derivados de artemisinina interfiram nas alterações da conformação da proteína necessárias para a sua actividade (Jambou *et al.*, 2005). Esta descoberta veio reforçar a ideia de que a proteína PfATPase6 estará envolvida na resistência à artemisinina e derivados.

Gene *pfubp-1*

O gene *ubp-1* localiza-se no cromossoma 1 no genoma do *P. falciparum*, e codifica uma protease ubiquitina-específica. A ubiquitina (Ub) é uma proteína globular de 76 aminoácidos altamente conservada entre os eucariotas, sendo encontrada como um monómero e também conjugada a outras proteínas, por uma ligação covalente entre o seu C-terminal e uma lisina da proteína que será marcada (Whitby *et al.*, 1998). Desempenha uma função importante no metabolismo celular permitindo a regulação de proteínas com peso molecular médio ou baixo presentes no citoplasma e núcleo celulares. Regula a proliferação celular, eliminação de proteínas mutantes e/ou danificadas, controlo do ciclo celular por degradação selectiva das proteínas reguladoras (Paugam *et al.*, 2003), A desregulação deste mecanismo proteolítico pode contribuir para o surgimento de doenças tumorais e

neurodegenerativas (Doherty *et al.*, 2002; Voutsadakis, 2008; Whatley *et al.*, 2008). A degradação selectiva de proteínas é uma atividade essencial e, em eucariotas, envolve uma complexa maquinaria proteolítica celular chamada proteossoma (26S), cuja função é dependente de ATP e ubiquitina. O proteossoma apresenta um papel importante na via de degradação de proteínas tanto no citosol e núcleo, resposta ao stress, adaptação metabólica, resposta imune celular, biogénese de organelos, apoptose, transporte de proteínas, inflamação, processos antigénicos e de reparação de DNA (Pickart & Cohen, 2004). Nesta via proteolítica (Figura 5) os substratos são primeiramente marcados por ligações covalentes a múltiplas moléculas de ubiquitinas para, então, serem degradados no proteossoma (Paugam *et al.*, 2003). Nos eucariotas, a proteólise dependente de ubiquitina ocorre em diversos passos:

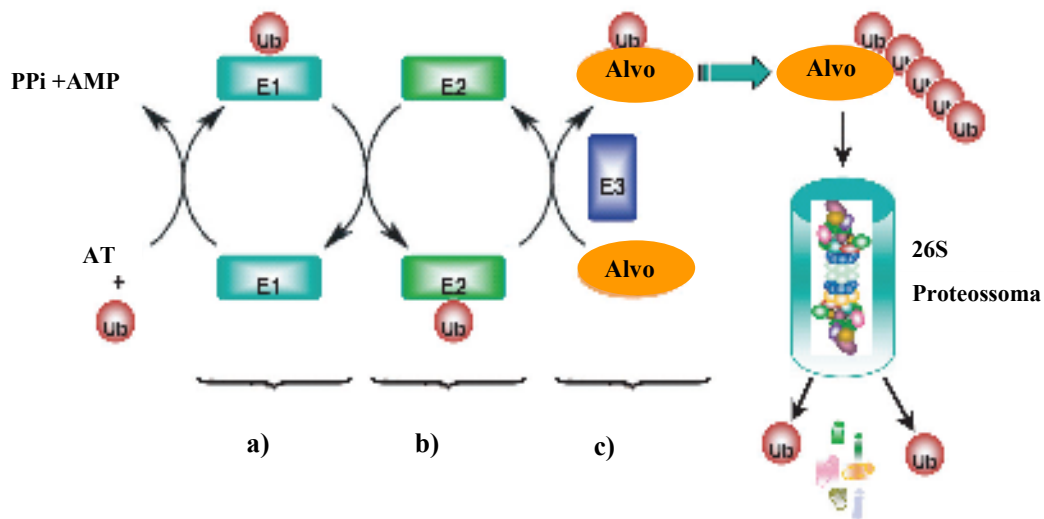


Figura 5- Mecanismo de Proteólise mediada pela via ubiquitina-proteossoma (Adaptado de Wang & Maldonado, 2006).

Inicialmente as ubiquitinas (Ub) são adicionadas aos substratos-alvo em 3 passos sequenciais (a, b, c) que requerem 3 enzimas (E1, E2, E3). As ubiquitinas (Ub) são activadas pelas E1, enzimas ativadoras de ubiquitina, as quais actuam formando uma ligação com o C-terminal da glicina da ubiquitina num processo ATP dependente. As enzimas do tipo E2, enzimas conjugadoras de ubiquitina, transportam a ubiquitina activada. A E3, ubiquitina ligase, liga-se directamente à E2 e transfere a ubiquitina activada

da E2 para o substrato da proteína alvo, promovendo a formação de uma ligação peptídica entre uma lisina no substrato e um C-terminal da ubiquitina. A E3 liga as cadeias de poli-ubiquitinas ao substrato sendo responsável pela especificidade dos substratos que serão marcados para degradação (Hershko & Ciechanover, 1998). As proteínas ubiquitinadas são reconhecidas e degradadas pelo proteossoma 26S.

Nos protozoários, o proteossoma está envolvido na diferenciação celular, replicação e representa um promissor alvo terapêutico (Paugam *et al.*, 2003). Os inibidores do proteossoma podem ser naturais ou artificiais e a sua acção consiste em na célula e impedir a degradação proteica pelo complexo ubiquitina-proteossoma (Wang & Maldonado, 2006). A identificação de inibidores de proteossoma têm ajudado a definir o papel do proteossoma nos protozoários, no entanto, os inibidores não são totalmente específicos, pois podem inibir outras proteases. O inibidores do proteossoma são: aldeído péptido (MG132), lactacistina e gliotoxina (GTX) (Paugam *et al.*, 2003). Os inibidores do proteossoma podem ser utilizados como uma nova classe de fármacos utilizados no combate a doenças cancerígenas e ao paludismo (Gantt *et al.*, 1998; Sujashvili, 2008). Estudos *in vitro* utilizando *Plasmodium berghei* demonstram que a lactacistina bloqueia a replicação impedindo o desenvolvimento do parasita na fase exo- e eritrocitária (Paugam *et al.*, 2003) e, estudos em populações naturais de *Plasmodium falciparum* indicam que a lactacistina bloqueia a replicação de estirpes sensíveis à cloroquina e, sobretudo de estirpes resistentes (Gonzalez *et al.*, 1999; Paugam *et al.*, 2003). Os resultados de uma investigação *in vitro* sugerem que o inibidor GTX possui actividade plasmocídica, é eficaz em estirpes de *Plasmodium falciparum* sensíveis e resistentes à cloroquina e essa actividade não é induzida pelo stress oxidativo característico do parasita (Hatabu *et al.*, 2006). Um estudo realizado em estirpes de *Plasmodium chabaudi chabaudi* com resistência estável à artemisinina, sugeriu que o gene *pfubp-1* poderia ser um potencial modulador da susceptibilidade à artemisinina e seus derivados (Afonso *et al.*, 2006), tendo sido identificado num clone resistente ao artesunato uma mutação V739F, no gene ortólogo de *pfubp-1* em *P. chabaudi* (Hunt *et al.*, 2007). No entanto a pesquisa dessa mutação em duas linhas de *P. falciparum* com baixa susceptibilidade à artemisinina, revelou a sua inexistência. De notar que o fenótipo de resistência não era geneticamente

estável (Hunt *et al.*, 2007). Segundo Ferreira *et al.*, as populações parasitárias de uma dada região apresentam combinações diversas entre polimorfismos no gene *pfubp-1* e o genótipo do *pfATPase6* originando diferentes haplótipos entre alelos destes genes. Os genes localizam-se no cromossoma 1 do *Plasmodium falciparum* a uma distância física curta de aproximadamente 65 Kb (Figura 6).

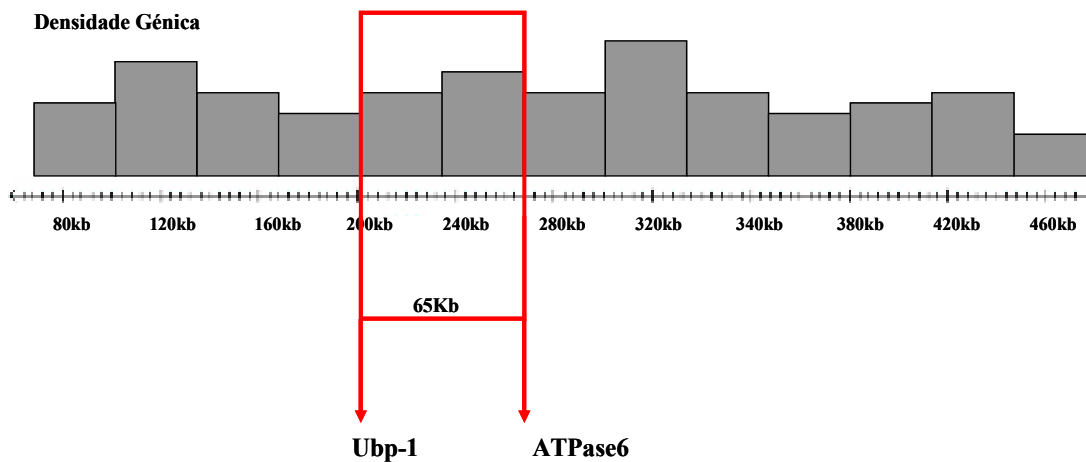


Figura 6- Esquema representativo da localização no cromossoma 1 dos genes *pfubp-1* e *pfATPase6*

1.11- Regiões Endêmicas

Os isolados naturais de *P. falciparum* incluídos no presente estudo são provenientes das regiões endêmicas do Brasil, Ruanda e Republica Democrática de São Tomé e Príncipe.

1.11.1- Brasil, Estado do Pará

A malária é endêmica no Brasil sendo a sua transmissão praticamente restrita à Amazônia legal, onde se inclui o Estado do Pará. A incidência de malária na região Amazônica tem aumentado nos últimos anos devido sobretudo ao movimento migratório, o que dificulta o seu controlo (Alecrim *et al.*, 2006). A terapêutica utilizada como primeira linha no tratamento de malária não complicada por *P.falciparum* era quinino e doxiclina durante três dias, seguido de dois dias só com doxiclina e

primaquina no sexto dia. Como segunda linha era utilizada mefloquina em dose única e primaquina no segundo dia. Actualmente a terapêutica está a ser alterada para o uso de combinações com derivados de artemisinina. Um estudo recente demonstrou que a combinação terapêutica artemeter+lumefantrina têm eficácia total, além de ser um tratamento seguro e bem tolerado (Alecrim *et al.*, 2006). Um estudo realizado na Guiana Francesa identificou parasitas com baixa susceptibilidade *in vitro* ao artemeter em *P.falciparum* (Jambou *et al.*, 2005).

Para a realização do presente estudo foram utilizados isolados naturais do Estado do Pará uma vez que:

- existe proximidade geográfica com a Guiana Francesa onde se verificou previamente a ocorrência de parasitas com susceptibilidade reduzida ao artemeter com mutações no gene *PfATPase6* (Jambou *et al.*, 2006);
- existe um elevado fluxo migratório de indivíduos (Vasconcelos *et al.*, 2006) o que permite a circulação de portadores de estirpes com reduzida susceptibilidade aos derivados de artemisinina;
- existem condições para o uso inadequado dos derivados de artemisinina.

1.11.2- Ruanda

O Ruanda localiza-se na África Sub-Sahariana e é uma zona endémica de malária. Em 2001 houve necessidade de alterar a política terapêutica devido à demonstração de falha terapêutica da cloroquina e sulfadoxina-pirimetamina (SP). Foi realizado um estudo de susceptibilidade *in vitro* à cloroquina, amodiaquina, quinino e dihidroartemisinina em isolados provenientes do Ruanda. Verificaram que 45% da população parasitária estudada era resistente à cloroquina, sendo a média dos valores de IC₅₀ relativos à dihidroartemisinina, quinino e amodiaquina significativamente maior para os isolados resistentes à cloroquina do que para os isolados sensíveis à cloroquina o que evidência uma resistência cruzada *in vitro* entre os antimaláricos (Tinto *et al.*, 2006). Actualmente

recorre-se à combinação terapêutica de amodiaquina+SP no tratamento de malária não complicada, sendo a combinação amodiaquina+artesunato utilizada como alternativa (Tinto *et al.*, 2006).

1.11.3- República Democrática de São Tomé e Príncipe (RDST)

A República Democrática de São Tomé e Príncipe localiza-se no Golfo da Guiné e é composta de duas ilhas principais, São Tomé e Príncipe. A transmissão de malária é um dos principais problemas de saúde pública deste arquipélago. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram uma elevada prevalência de resistência aos antimaláricos utilizados como primeira e segunda linha (Cloroquina e Sulfadoxina-pirimetamina) no tratamento de malária não complicada (Lopes *et al.*, 2002; Cravo *et al.*, 2004). Hoje em dia estão a ser introduzidas as combinações terapêuticas com derivados de artemisinina especificamente a combinação de amodiaquina-artesunato.

II.OBJECTIVOS

No âmbito do tema do trabalho e tendo em conta a importância da artemisinina e dos seus derivados na dinâmica do tratamento da infecção por malária, foi analisado o gene *ubp-1* em populações naturais de *P. falciparum* provenientes de três regiões endémicas para malária: Ruanda, República Democrática de São Tomé e Príncipe e Estado do Pará, situado no norte do Brasil.

A elaboração deste trabalho teve como objectivos principais:

- Sequenciar do gene *ubp-1* em isolados de *Plasmodium falciparum*, provenientes do Ruanda, São Tomé e Príncipe e Brasil;
- Analisar a frequência de putativos polimorfismos genéticos ;
- Investigar potenciais haplótipos entre alelos dos genes *pfubp1* e *pfATPase6* nas amostras provenientes das diferentes regiões.

III- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1-Material Biológico e Antimaláricos

3.1.1- Isolados de *Plasmodium falciparum*

A realização deste trabalho envolveu a utilização de amostras de sangue periférico infectado por *Plasmodium falciparum* provenientes de três regiões endêmicas de malária. As amostras são provenientes da República Democrática de São Tomé e Príncipe, Ruanda e do Brasil (Tabela 3).

Tabela 3- Antimaláricos utilizados para o estudo de susceptibilidade *in vitro*.

Origem das Amostras	Número de Amostras utilizadas
Brasil	13
Ruanda	7
R.D.S.T.Príncipe	8

3.1.2- Clones de Referência de *P. Falciparum*

O clone de referência utilizado foi o *Plasmodium falciparum* 3D7, que apresenta fenótipo sensível à cloroquina, quinino e mefloquina e cujo genoma se encontra totalmente sequenciado e disponível para consulta em diferentes bases de dados (Gardner *et al.*, 2002).

3.1.3- População estudada

Toda a informação relativa aos critérios de inclusão/exclusão, colheita de sangue, consentimento informado, processamento das amostras entre outros, está disponível nos artigos de Tinto *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2008. Todos os isolados incluídos nesta

análise haviam sido previamente testados *in vitro* para avaliação da sua resposta aos derivados da artemisinina (dihidroartemisinina, artesunato, artemeter) (Tinto *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2008) indicados na Tabela 4. Estes testes permitem estabelecer um valor de concentração mínima inibitória do fármaco a 50% (IC₅₀) para cada amostra, definido como “a concentração de um composto necessária para reduzir o crescimento populacional de organismos, incluindo células eucarióticas, em 50 por cento, *in vitro*”.

Tabela 4- Antimaláricos utilizados para o estudo de susceptibilidade *in vitro*.

Área endémica	Antimalárico
Brasil (Ferreira <i>et al.</i> , 2008)	Artesunato, artemeter
Ruanda (Tinto <i>et al.</i> , 2006)	Amodiaquina, dihidroartemisinina
RDSTP (Ferreira <i>et al.</i> , 2007)	Amodiaquina, artesunato e artemeter

3.2- Metodologia

3.2.1- Processamento das amostras

As amostras de sangue venoso haviam sido previamente colhidas em papel de filtro *Whatman* n^o4, devidamente identificados e secos à temperatura ambiente.

3.2.2- Extração de DNA

A extração do DNA genómico de cada amostra foi processada pelo protocolo estabelecido por Plowe *et al.*, 1995. Sumariamente num tubo de *ependorf* (1,5 ml) estéril correctamente identificado colocou-se um pedaço de papel de filtro contendo a amostra de sangue (aprox.1cm²). Entre cada cinco amostras foi colocado um tubo com um pedaço de papel de filtro sem sangue (branco), de modo a servir de controlo interno à extração. Todas as amostras incluindo o branco, foram processadas de igual forma. A todos os tubos foi adicionado

1 ml de solução contendo Saponina a 0,5% e PBS (Sigma™) com incubação a 4°C durante 12 horas. Após incubação foi removida toda a solução castanha e efectuou-se uma lavagem com 1 ml de PBS autoclavado e colocado a 4°C durante 15-30 minutos. Foram marcados novos tubos de 1,5 ml e adicionado em cada tubo 50 µl de Solução de Chelex a 20% (Biorad™). Seguidamente as amostras foram incubadas a 100°C durante 10 minutos, seguindo-se duas centrifugações (10 000 r.p.m./2 minutos): a primeira com o objectivo de eliminar o papel de filtro e a segunda para eliminar os resíduos de Chelex em suspensão na amostra de DNA. As amostras de DNA extraído foram guardadas a -20°C.

3.2.3- Desenho de *primers*

Os *primers* utilizados foram desenhados com base na sequência do gene da *pfubp-1* do clone de *P.falciparum* 3D7 que se encontra disponível em *Plasmodium falciparum* GeneDB (<http://www.genedb.org/genedb/malaria/blast/.jsp>) que foi utilizada para retirar as sequências de interesse que serviram de molde para o desenho de *primers* (Tabela 5). Os *primers* foram desenhados manualmente para este gene e as propriedades principais relativas à sua sequência foram avaliadas recorrendo a um interface informática disponível *on-line*: Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>). Deste modo foram respeitados os critérios essenciais no desenho de *primers* de forma a obter e otimizar as reacções de *PCR*.

Todos os *primers* foram sintetizados por encomenda à empresa STABVIDA®.

Tabela 5- Primers e condições de PCR utilizados na sequenciação do gene *pfubp-1*.

FRAGMENTO	PRIMERS	SEQUÊNCIA (5'__3') (PB)	REGIÃO ALVO	CONDIÇÕES PCR
1F/2R	Forward	CACACGTCATAATTACAACCTCTC	285-1054	94°C, 3'
	Reverse	TTAACAAGACGTCCTTTTGATC		94°C, 30" 53°C, 45" 40 ciclos 72°C, 60" 72°C, 10'
3F/4R	Forward	CTCTTCCTATCGTCATACAC	859-1736	94°C, 3'
	Reverse	TTTGT CAC CATTGTTGTTACCC		94°C, 45" 51°C, 45" 40 ciclos 72°C, 60" 72°C, 10'
5F/6R	Forward	CATTTTGCTAACCTAGATGATG	1654-2232	94°C, 3'
	Reverse	TGATCGGATATTCTATTTTGCG		94°C, 45" 51°C, 45" 40 ciclos 72°C, 60" 72°C, 10';
7F/8R	Forward	AGTACCTCCAAGTATGAAGAAC	2236-2957	94°C, 3'
	Reverse	AAC CGT CCTAACCTTATTATTC		94°C, 30" 53°C, 45" 40 ciclos 72°C, 60" 72°C, 10"
9F/10R	Forward	AAA GAAATTATCCACATCCACC	2804-4442	94°C, 3'
	Reverse	ATAATTCATTCCACTTTAAGGC		94°C, 45" 51°C, 45" 40 ciclos 72°C, 60" 72°C, 10'
11F/12R	Forward	ATGGAGCAATAATACATGGTGG	3298-5073	94°C, 3'
	Reverse	CATTCA TTTGATACCAAGAGC		94°C, 30" 51°C, 45" 40 ciclos 72°C, 60" 72°C, 10'

3.2.4- Análise de Sequenciação Genética

3.2.4.1- PCR “*Nested PCR*”

Com o objectivo de melhorar a especificidade e eficiência da reacção, utilizou-se a metodologia de PCR “*Nested PCR*” para amplificação do gene *pfubp-1*. A PCR “*Nested PCR*” consiste em duas reacções de PCR. As primeiras reacções de amplificação de fragmentos do gene, originaram produtos de PCR, os quais foram utilizados como molde nas respectivas segundas reacções de amplificação (“*Nested-PCR*”). Nestas segundas reacções de amplificação as únicas alterações efectuadas foram os pares de primers utilizados e as condições do termociclador a serem aplicadas. As reacções de PCR para amplificação das sequências foram optimizadas no âmbito deste trabalho.

Nas reacções de amplificação utilizou-se a seguinte mistura de reacção: 28,5 µl de água bidestilada estéril, 5 µl de MgCl₂ (Ferramentas™), 5 µl PCR buffer (Ferramentas™), 5 µl de cada dNTPs (Ferramentas™), 2,5 µl de cada primer, e 0,5 µl de *Taq DNA polymerase* (Ferramentas™), adicionando-se 1 µl de DNA molde. A amplificação foi efectuada num volume total de 50 µl. O termociclador usado em todas as reacções de amplificação das amostras foi o modelo Uno II da Biometra.

Em cada reacção foi incluído um controlo negativo, no qual o volume de ADN foi substituído por igual volume de água bidestilada estéril. Este controlo negativo permite detectar eventuais contaminações na execução das reacções.

3.2.4.2- Electroforese em gel de agarose

Para averiguar a qualidade e quantidade dos fragmentos amplificados resultantes, estes foram submetidas a uma electroforese em gel de agarose a 2%.

Os géis de electroforese foram preparados através da dissolução de agarose (Gibco™) em solução TAE 1X e adicionado brometo de etídio (Sigma™), para permitir a visualização das bandas de DNA quando expostas a luz ultravioleta. Para todas as amostras que foram colocadas na tina de

electroforese foi necessário a adição prévia de tampão de aplicação no poço, 6X *Mass Ruller Loading Dye Solution* (Ferramentas™). Foi utilizado um marcador de peso molecular, *Mass Ruller™ DNA Ladder, Low Range* (Ferramentas™). A separação electroforética foi realizada numa tina horizontal contendo Solução TAE 1X durante cerca de 45 minutos a 140V/cm. Por fim, as bandas de DNA foram visualizadas num transiluminador (*Eagle Eye II*, Stratagene) com luz ultravioleta e fotografadas.

3.4.2.3- Purificação dos Produtos Amplificados

Os amplicões obtidos por electroforese foram posteriormente purificados utilizando um kit comercial – QIAquick PCR purification Kit (Qiagen™), seguindo o protocolo do fabricante. Os produtos de PCR assim purificados serviram de molde em reacções de sequenciação levadas a cabo pela empresa STABVIDA®.

3.2.4.4- Análise Bioinformática das Sequências

Os pares de *primers* que correspondem a uma dada sequência do gene foram alinhadas com a sequência do clone de referência. Isso foi possível com recurso a um programa de alinhamento de múltiplas sequências com o objectivo de visualizar esse alinhamento, resolver as ambiguidades e identificar polimorfismos, caso existam. O programa bioinformático utilizado encontra-se disponível na internet (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multialin.html>), (Corpet, 1988).

A resolução de possíveis ambiguidades na sequência foi efectuada através da inspecção do cromograma respectivo.

3.2.5- Análise Estatística

Com o objectivo de efectuar um tratamentos de dados para posterior análise da frequência de putativos polimorfismos genéticos foi utilizado o programa de estatística Microsoft Office Excel 2003.

IV-RESULTADOS

IV.1- Desenvolvimento, otimização e validação do método de análise genética.

O trabalho de laboratório centrou-se na sequenciação directa de DNA oriundo de amostras de populações naturais de *Plasmodium falciparum*. Para isso foi necessário desenvolver, otimizar e validar a técnica experimental. Foram desenhados *primers* específicos (Figura7), tendo sido desenvolvido e otimizado as reacções de *Nested PCR* para as amostras em estudo. As condições de PCR utilizadas e respectivos *primers* foram apresentados no capítulo anterior (Tabela 5).

Após alguns procedimentos de otimização das reacções de *PCR*, verificou-se que nem todos os ensaios produziram os resultados esperados. O par de *primers* desenhado para amplificar a última região do gene (que corresponde à região a montante do par de *primers* 9F/10R) não foi otimizado por motivos técnicos. No entanto foi desenhado outro par de *primers* (11F/12R) que apenas amplificou parte da região codificante a montante ao intrão (Figura 7). A metodologia foi aplicada a todas as amostras incluídas no estudo.

A denominação de cada posição polimórfica ou região sequenciada do gene, é apresentado considerando a adenina (A) do codão de iniciação ATG como a posição 1.

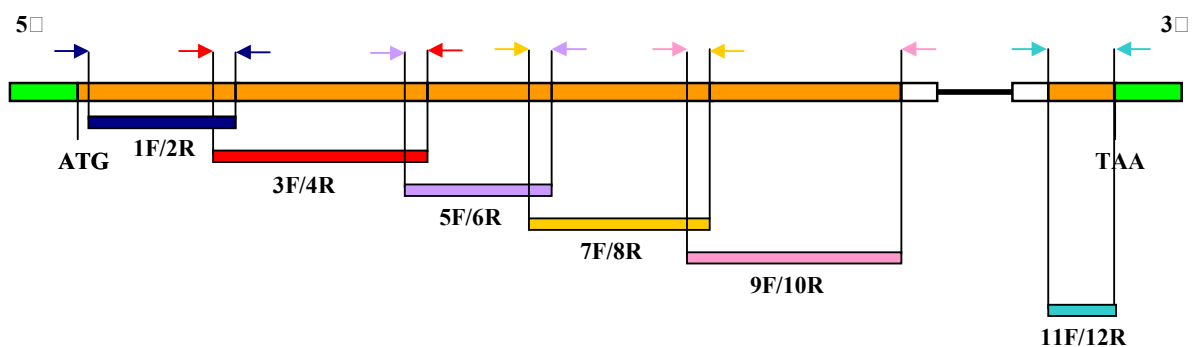


Figura 7- Esquema representativo da localização dos pares de primers (F-Forward, R-Reverse) utilizados na sequenciação do gene *pfubp-1* (■ Região codificante; □ Região codificante não sequenciada; — Intrão).

Após a otimização dos pares de *primers* (Figura 7) para a sequenciação do gene *pfubp-1*, verificou-se que todos os ensaios produziram os resultados esperados.

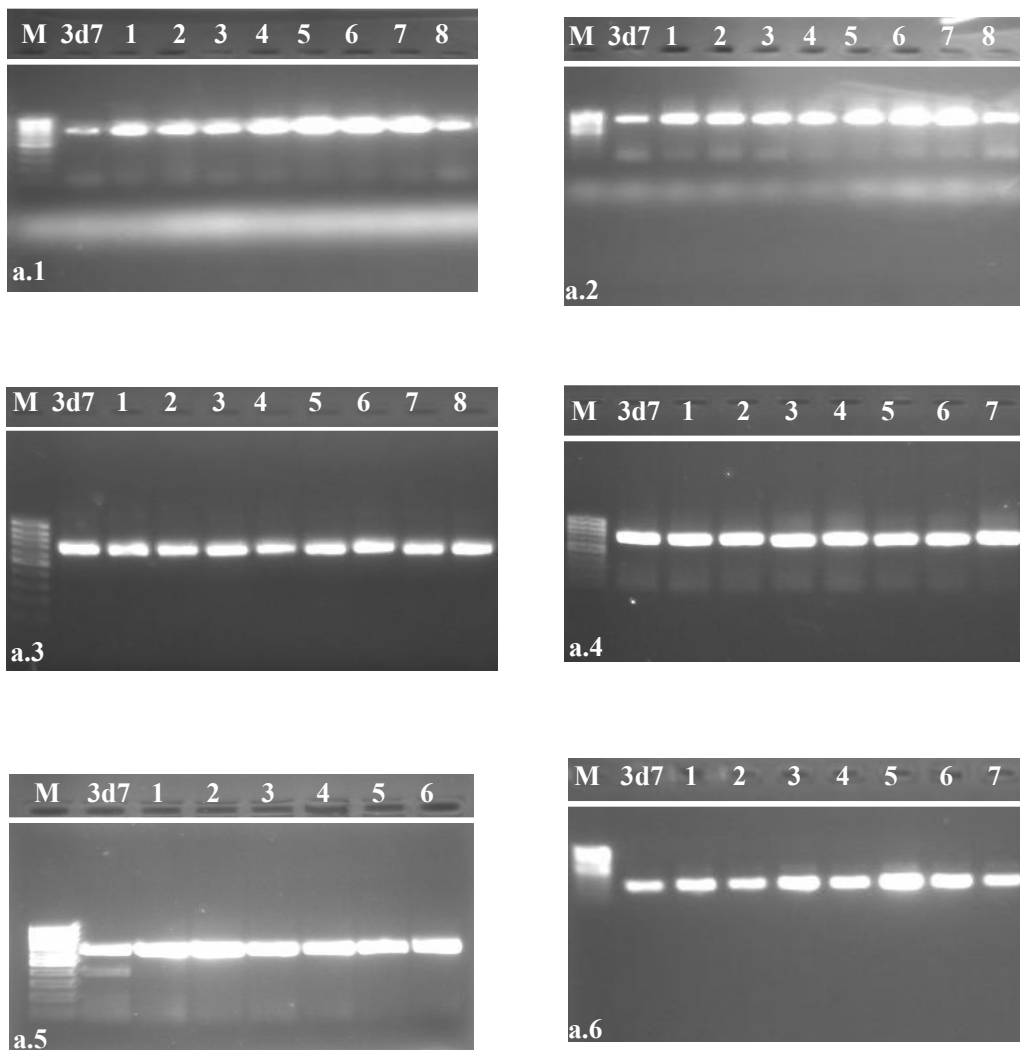


Figura 8- Géis de Agarose (2%) com resultados típicos dos 6 pares de *primers* utilizados para sequenciação do gene *ubp-1* (a.1- *Primers* U1F/U2R; a.2- *Primers* U3F/U4R; a.3- *Primers* U5F/U6R; a.4- *Primers* U7F/U8R; a.5- *Primers* U9F/U10R; a.6- *Primers* U11F/U12R M- marcador de peso molecular 1000 pb: *MassRuller*TM *DNA Ladder, Low Range* (FerramentasTM); 3d7- Controlo positivo de genótipo conhecido; 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8- Isolados naturais de *P. falciparum*).

IV.2- Estudo dos perfis genotípicos do gene *pfubp-1* em populações naturais de *P.falciparum* do Estado do Pará (Brasil), Ruanda e República Democrática de São Tomé e Príncipe (RDST)

O gene *pfubp-1* foi sequenciado com sucesso do nucleótido 1 ao 2990 e do nucleótido 3417 ao 3614.

Em todos os isolados analisados, não foi possível a sequenciação nas regiões que compreendem o intrão e duas regiões codificantes localizadas entre os nucleótidos 2991 a 3045 e entre o nucleótido 3275 ao 3413.

A análise das sequências revelou a presença de *Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)* e inserções/deleções (*Indels*). No conjunto da população parasitária analisada, englobando a totalidade das amostras oriundas das três regiões endêmicas incluídas no estudo, foram identificados trinta e um polimorfismos dos quais vinte e quatro são mutações não-sinónimas e sete mutações sinónimas (Tabela 6).

Tabela 6- Classificação dos Polimorfismos encontrados.

Nucleótido	Tripleto	Aminoácido	Mutação
T555C	<u>C</u> TT→ <u>C</u> CT	L→P	Não-Sinónima
T843C	TG <u>T</u> →TG <u>C</u>	C→C	Sinónima
G857A	<u>G</u> AA→ <u>A</u> AA	E→K	Não-Sinónima
A876G	<u>A</u> AT→ <u>A</u> GT	N→S	Não-Sinónima
A931G	GA <u>A</u> →GA <u>G</u>	E→E	Sinónima
A1180T	<u>A</u> GT→ <u>T</u> GT	S→C	Não-Sinónima
A1350G	T <u>A</u> T→T <u>G</u> T	Y→C	Não-Sinónima
C1919A	<u>G</u> AT→ <u>A</u> AT	Q→K	Não-Sinónima
G2120A	<u>G</u> AT→ <u>A</u> AT	D→N	Não-Sinónima
G2123C	<u>G</u> GC→ <u>C</u> GC	G→R	Não-Sinónima
G2124A	<u>G</u> GC→ <u>G</u> AC	G→D	Não-Sinónima

C2125T	GG <u>C</u> →GG <u>T</u>	G→G	Sinónima
T2127C	G <u>T</u> A→G <u>C</u> A	V→A	Não-Sinónima
T2131C	AA <u>T</u> →AA <u>C</u>	N→N	Sinónima
A2133G	C <u>A</u> T→C <u>G</u> T	H→R	Não-Sinónima
A2139G	AA <u>T</u> →AG <u>T</u>	N→S	Não-Sinónima
G2147A	<u>G</u> AT→ <u>A</u> AT	D→N	Não-Sinónima
G2150C	<u>G</u> GT→ <u>C</u> GT	G→R	Não-Sinónima
G2151A	GG <u>T</u> →G <u>A</u> T	G→H	Não-Sinónima
T2152C	GG <u>T</u> →GG <u>C</u>	G→G	Sinónima
T2154C	G <u>T</u> A→G <u>C</u> A	V→A	Não-Sinónima
T2158C	AA <u>T</u> →AA <u>C</u>	N→N	Sinónima
A2166G	AA <u>T</u> →AG <u>T</u>	N→S	Não-Sinónima
A2174G	<u>A</u> AT→ <u>G</u> AT	N→D	Não-Sinónima
C2177G	<u>C</u> AT→ <u>G</u> AT	H→D	Não-Sinónima
A2178G	G <u>A</u> T→G <u>G</u> T	H→G	Não-Sinónima
C2181T	G <u>C</u> A→G <u>T</u> A	A→V	Não-Sinónima
C2185T	AA <u>C</u> →AA <u>T</u>	N→N	Sinónima
G2193A	AG <u>T</u> →AA <u>T</u>	S→N	Não-Sinónima
G2220A	AG <u>T</u> →AA <u>T</u>	S→N	Não-Sinónima
G2554A	AT <u>G</u> →AT <u>A</u>	M→I	Não-Sinónima

Seguidamente serão apresentados os resultados dos polimorfismos encontrados em cada região endémica e no final dessa secção será feita uma análise comparativa dos resultados encontrados nas regiões estudadas.

Tal como referido anteriormente foi ainda detectada a presença de *indels* (inserções/deleções) nos isolados provenientes das três regiões endémicas (Tabela 7). A inserção de 12 pares de bases (pb) codifica a seguinte sequência de aminoácidos: WTKI. As deleções de 27 pb e 54 pb referem-se a

duas regiões seguidas com sequências repetidas, formando um bloco de 54 pb e individualmente duas regiões iguais de 27 pb. Cada bloco de 27 pb codifica a seguinte sequência de aminoácidos: VSRMNHANR.

Tabela 7- Frequência Absoluta de *indels* do gene *pfubp-1* nas regiões endêmicas estudadas.

<i>Indels</i> (inserções/deleções)	Brasil	Ruanda	R.D.S.T.Príncipe
2223-2276 (-54pb)	0	2	1
2223-2250 (-27 pb)	4	2	5
1363-1374 (+12pb)	4	2	2

IV.2.1-Brasil

Em três amostras do Brasil não foi possível sequenciar um segmento codificante que se localiza entre o nucleótido 1276 e o nucleótido 1326. No entanto de acordo com os resultados seguidamente apresentados, esse segmento não apresentou polimorfismos nos restantes isolados estudados.

As amostras do Brasil apresentaram onze *SNPs* (Figura 9). Estes polimorfismos resultaram em oito mutações não-sinónimas e em três mutações sinónimas. Adicionalmente foram encontrados polimorfismos de tamanho que se caracterizam por inserções de 12 pb e deleções de 27 pb (Tabela 7).

Todos os polimorfismos encontrados apresentaram a mesma frequência absoluta com exceção para o polimorfismo no nucleótido 2220 que teve uma frequência ligeiramente superior tendo sido encontrado em cinco das treze amostras analisadas (Figura 9).

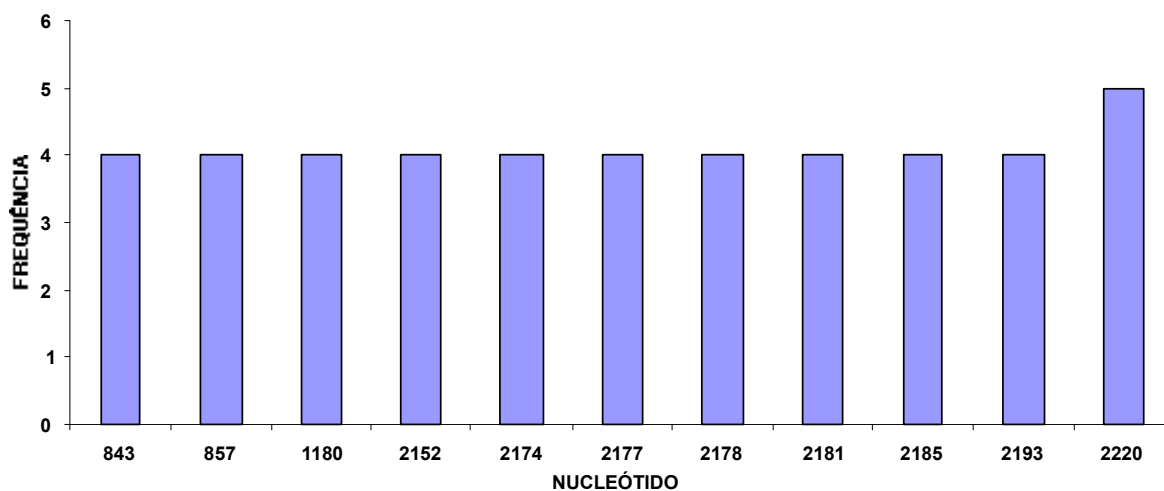


Figura 9- Frequência Absoluta dos polimorfismos encontrados em isolados naturais de *P.falciparum* provenientes do Brasil.

As amostras apresentaram prevalências de polimorfismos que variaram entre 31% e 39% (Figuras 10). As prevalências encontradas em todos os polimorfismos foram de 31% com exceção para o nucleótido 2220 que teve uma prevalência de 39%.

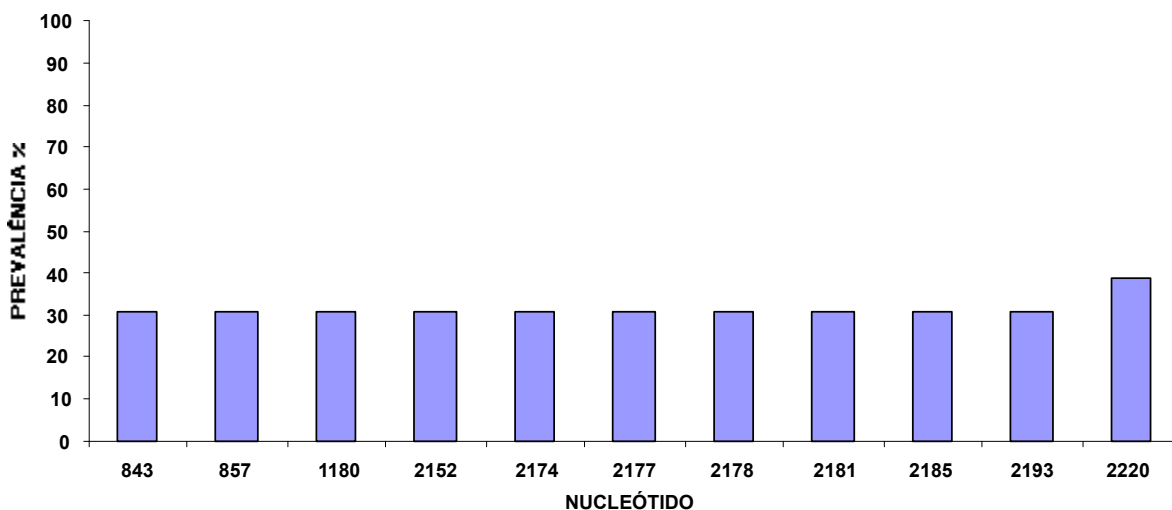


Figura 10- Prevalência dos Polimorfismos encontrados em isolados naturais de *P.falciparum* provenientes do Brasil.

IV.2.2- Ruanda

As amostras do Ruanda apresentaram treze *SNPs*. Estes polimorfismos resultaram em dez mutações não-sinónimas e em três mutações sinónimas. Também foram encontrados polimorfismos de tamanho que se caracterizam por inserções de 12 pb e deleções de 27 pb e 54 pb (Tabela 7).

Os polimorfismos localizados nos nucleótidos 2147, 2150, 2151, 2154, 2158 e 2166 apresentaram igual frequência e encontram-se em conjunto localizados nas mesmas amostras tendo sido os polimorfismos mais frequentes nesta população de parasitas (Figura 11).

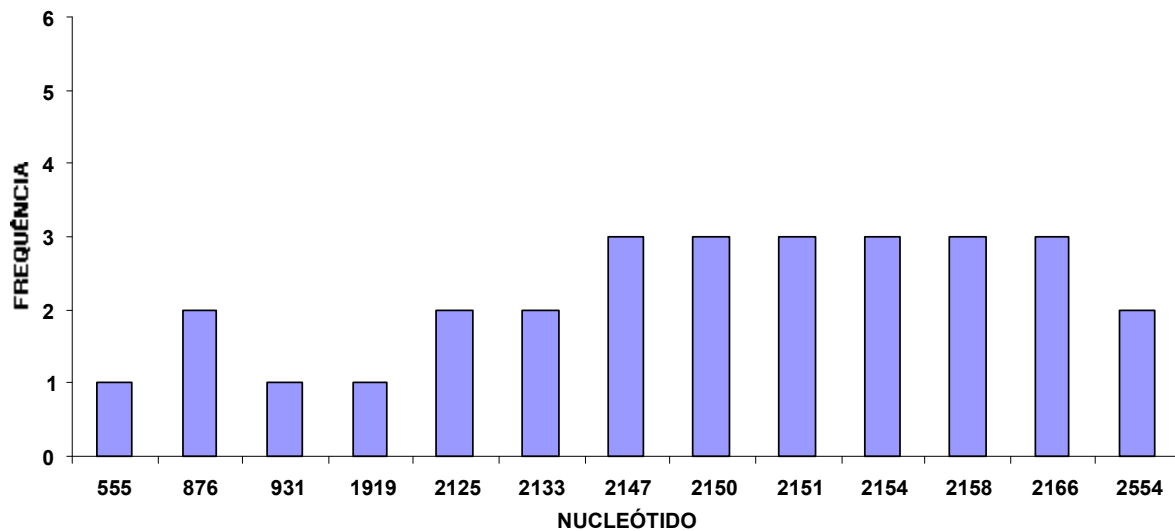


Figura 11- Frequência Absoluta dos polimorfismos encontrados em isolados naturais de *P.falciparum* provenientes do Ruanda.

Os isolados naturais de *P.falciparum* apresentaram prevalências de polimorfismos que variaram entre 14, 29 e 43% (Figura 12). Os polimorfismos mais prevalentes foram encontrados nos nucleótidos 2147, 2150, 2151, 2154, 2158 e 2166.

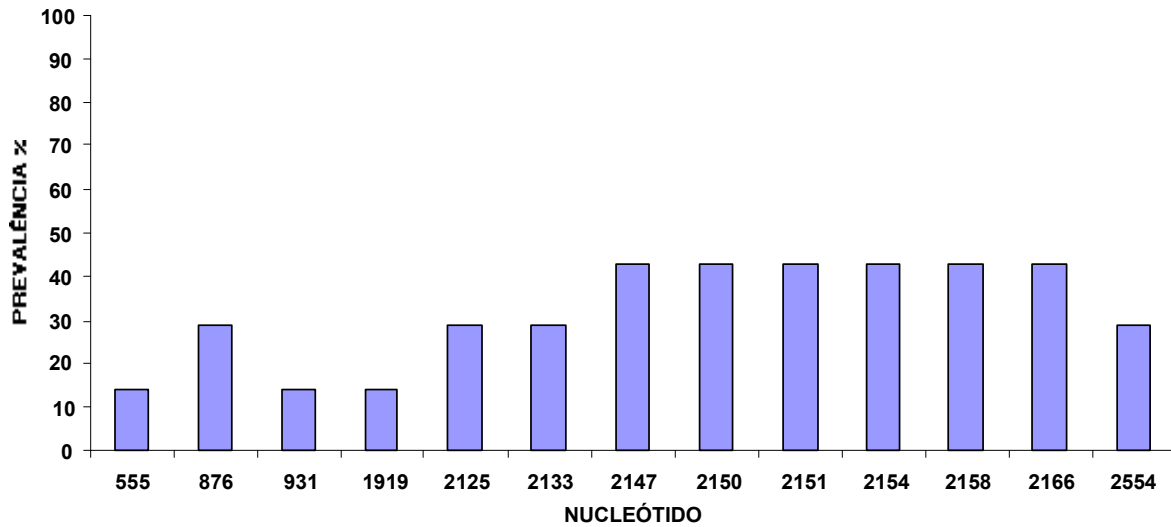


Figura 12- Prevalência dos Polimorfismos encontrados em isolados naturais de *P.falciparum* provenientes do Ruanda.

V.2.3- RDSTP

As amostras da RDST apresentaram dezasseis *SNPs* (Figuras 13). Estes polimorfismos resultaram em treze mutações não-sinónimas e em três mutações sinónimas. Também foram encontrados polimorfismos de tamanho que se caracterizam por inserções de 12 pb e deleções de 27 pb e 54 pb (Tabela 7).

As frequências absolutas nos polimorfismos encontrados variaram entre 1 e 2, revelando uma grande variabilidade nestes isolados naturais de *P.falciparum*.

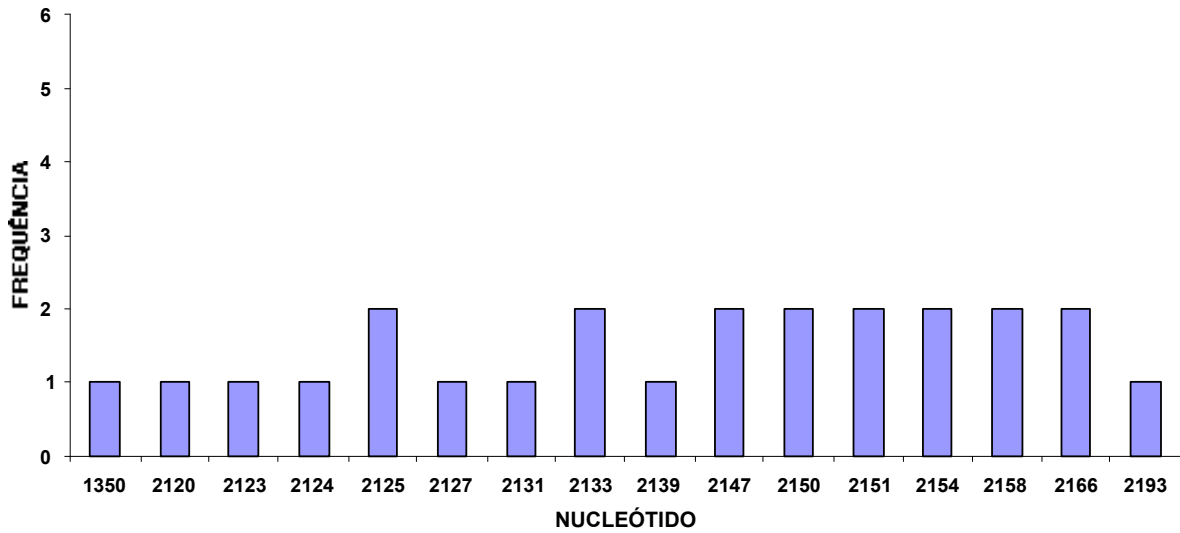


Figura 13- Frequência Absoluta dos Polimorfismos encontrados em isolados naturais provenientes da RDST.

Os isolados apresentaram prevalências de polimorfismos que variaram entre 13% e 25% (Figuras 14). Os polimorfismos com maior prevalência são os encontrados nos nucleótidos 2125, 2133, 2147, 2150, 2151, 2154, 2158 e 2166.

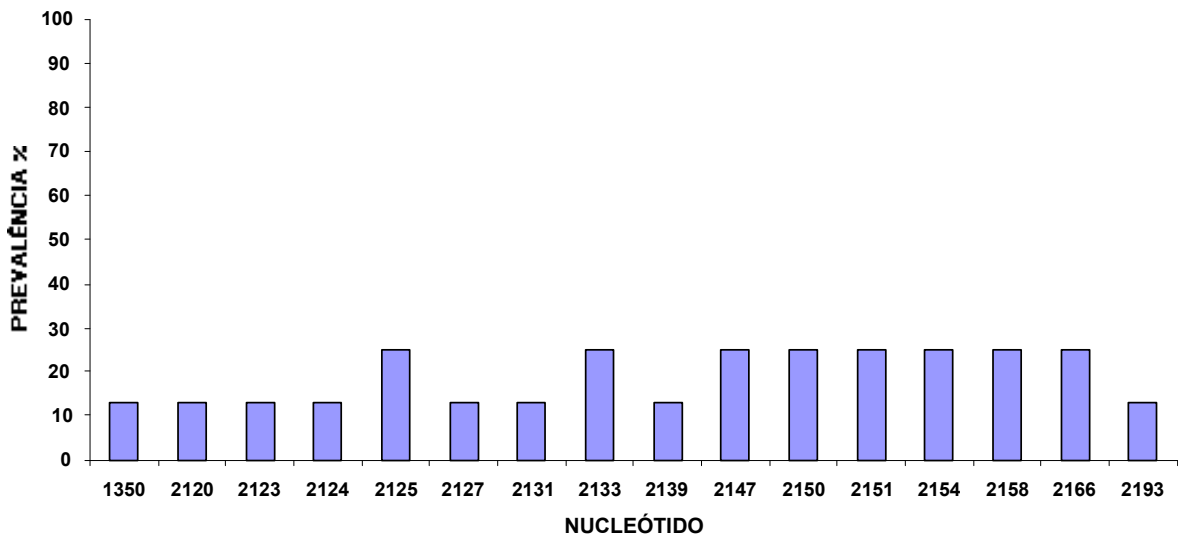


Figura 14- Prevalência dos Polimorfismos encontrados em isolados naturais de *P.falciparum* provenientes da RDST.

IV.3- Comparação da frequência dos *SNPs* nas três Regiões Endêmicas

Pela análise anteriormente realizada é possível verificar a existência de variabilidade de polimórfica nas regiões estudadas, embora existam alguns polimorfismos comuns entre elas.

Em todos os isolados das regiões em causa, a frequência de mutações não sinónimas foi claramente superior à frequência de mutações sinónimas.

Os três agrupamentos geográficos apresentaram *indels* (inserção/delecção). Inserções de 12 pb e delecções de 27 pb foram encontradas nas três regiões endêmicas e delecções de 54 pb foram encontradas apenas nas regiões africanas em estudo. Nas regiões Africanas foram encontrados isolados naturais que apresentaram em simultâneo inserções e delecções, enquanto que nos parasitas oriundos do Brasil isso não se verificou.

O Brasil é, das regiões em estudo, aquela que apresenta menor frequência de *SNPs* sendo estes, distintos dos encontrados nas restantes regiões geográficas estudadas (Figura 9). A única excepção foi encontrada no polimorfismo localizado no nucleótido 2193 que, é partilhado com um isolado da RDST e trata-se de uma mutação não-sinónima. As amostras do Ruanda apresentaram treze *SNPs*, dos quais quatro foram exclusivos desta região (Figura 11). Esses *SNPs* originaram três mutações não sinónimas resultantes dos polimorfismos nos nucleótidos 555, 876, 1919 e uma mutação sinónima resultante do polimorfismo no nucleótido 931.

As amostras da RDST apresentaram dezasseis *SNPs*, dos quais sete foram exclusivos desta região (Figura 13). Esses *SNPs* originaram seis mutações não sinónimas nos nucleótidos 1350, 2120, 2123, 2124, 2127, 2139 e uma mutação sinónima no nucleótido 2131.

Nas regiões africanas estudadas observou-se a frequência de polimorfismos localizados nos nucleótidos: 2147, 2150, 2151, 2154, 2158 e 2166.

IV.4- Haplótipos do gene *pfubp-1*

A sequenciação do gene *ubp-1* em isolados naturais de *P. falciparum* permitiu identificar os polimorfismos existentes e efectuar uma análise comparativa entre as três regiões endêmicas estudadas. A frequência de haplótipos (combinação de alelos selvagens e/ou mutantes herdados em bloco) permite estimar a variabilidade alélica existente entre os isolados naturais de uma região endêmica. Seguidamente serão apresentados os haplótipos encontrados nas regiões estudadas. Por uma questão de facilidade na apresentação dos haplótipos apenas se fará referência aos vários polimorfismos (*SNPs* e *indels*) encontrados nestes.

IV.4.1- Haplótipos do Brasil

Os isolados do Brasil apresentaram oito haplótipos que se encontram distribuídos entre os treze isolados estudados (Tabela 8). Os valores de IC_{50} de artesunato (ATN) encontrados nestas amostras variaram entre 0,1 a 4,9 nM (Tabela 8).

As amostras identificadas como BR11 e BR52 apresentaram frequência ao mesmo haplótipo constituído por oito *SNPs* e uma deleção (DEL) de 27pb. Os *SNPs* encontrados resultaram em seis mutações não-sinónimas e em duas mutações sinónimas, tendo apresentado valores de IC_{50} ao artesunato compreendidos entre 0,5 e 2,1 nM. Nos isolados naturais BR38 e BR67 foram identificados nove *SNPs* e uma DEL de 27 pb, correspondendo a um haplótipo distinto do encontrado nos isolados BR11 e BR52, uma vez que estes não apresentam uma mutação adicional não-sinónima no nucleótido 1180 (Tabela 8). Os isolados BR38 e BR67 apresentaram um valor de IC_{50} de artesunato superior de 3,4 e 4,8 nM.

Os isolados BR07, BR17 e BR50 apresentaram haplótipos idênticos, com um polimorfismo no nucleótido 2220 resultando em valores de IC_{50} ao artesunato de 4,8, 2,8 e 0,1 nM respectivamente. O polimorfismo no nucleótido 2220 foi classificado como uma mutação não-sinónima.

Os isolados BR68 e BR24 apresentaram igual haplótipo com um *SNP* localizado no nucleótido 2152 e numa inserção (INS) de 12 pb. Os valores de IC_{50} ao artesunato das amostras BR68 e BR24 variaram entre 4,9 nM e 3,1 nM respectivamente.

Os restantes isolados naturais de *P.falciparum* (BR05, BR39, BR43 e BR58) revelaram quatro haplótipos distintos. O haplótipo encontrado no BR05 apresentou um polimorfismo no nucleótido 2152, e uma INS de 12 pb. O isolado BR39 revelou um haplótipo com dois *SNPs* localizados no nucleótido 1180 e 2220 e uma susceptibilidade ao artesunato avaliada com um valor de IC_{50} de 0,5 nM.

O isolado natural BR43 apresentou um polimorfismo no nucleótido 2220 tendo resultado numa mutação não-sinónima. O BR43 apresentou um valor de IC_{50} de artesunato de 0,4 nM.

Na amostra BR58 foi identificada uma mutação não-sinónima resultante do polimorfismo no nucleótido 1180, uma mutação sinónima resultante do polimorfismo no nucleótido 2152 e uma INS de 12 pb. Este isolado apresentou um valor de IC_{50} ao artesunato de 0,1 nM.

Tabela 8- Haplótipos no gene *pfubp-1* em amostras do Brasil.

Brasil	T843C	G857A	A1180T	T2152C	A2174G	A2177G	A2178G	C2181T	C2185T	G2193A	G2220A	INS	DEL	IC ₅₀ ATN
BR67	C	A	T	T	G	G	G	T	T	A	G		27 pb	4,8 nM
BR38	C	A	T	T	G	G	G	T	T	A	G		27 pb	3,4 nM
BR11	C	A	A	T	G	G	G	T	T	A	G		27 pb	2,1 nM
BR52	C	A	A	T	G	G	G	T	T	A	G		27 pb	0,5 nM
BR58	T	G	T	C	A	A	A	C	C	G	G	12 pb		0,1 nM
BR39	T	G	T	T	A	A	A	C	C	G	A			0,5 nM
BR05	T	G	A	C	A	A	A	C	C	G	G	12 pb		0,2 nM
BR07	T	G	A	T	A	A	A	C	C	G	A			4,8 nM
BR17	T	G	A	T	A	A	A	C	C	G	A			2,8 nM
BR50	T	G	A	T	A	A	A	C	C	G	A			0,1 nM
BR68	T	G	A	C	A	A	A	C	C	G	G	12pb		4,9 nM
BR24	T	G	A	C	A	A	A	C	C	G	G	12 pb		3,1 nM
BR43	T	G	A	T	A	A	A	C	C	G	A			0,4 nM

IV.4.2- Haplótipos do Ruanda

Nesta região foram encontrados sete haplótipos diferentes nas sete amostras estudadas (Tabela 9). Os valores de IC₅₀ de dihidroartemisinina (DHA) encontrados nos isolados naturais de *P.falciparum* do Ruanda variaram entre 0,3 a 14,3 nM (Tabela 9).

Observou-se que todos os haplótipos encontrados são distintos, mas que existem três isolados (RW10, RW30 e RW57) que partilham seis polimorfismos. Os polimorfismos referidos são afectos aos nucleótidos 2147, 2150, 2151, 2154, 2158, e 2166 e resultaram em cinco mutações não-sinónimas e numa mutação sinónima. O isolado RW57 apresentou os polimorfismos referidos anteriormente e dois *indels*, uma inserção (INS) de 12 pb e uma deleção (DEL) de 27 pb. A avaliação da susceptibilidade ao IC₅₀ de DHA foi de 8,8 nM.

O isolado RW10 apresentou nove polimorfismos localizados nos nucleótidos 931, 2125, 2133, 2147, 2150, 2151, 2154, 2158 e 2166, dos quais resultaram três mutações sinónimas e seis mutações não-sinónimas. Adicionalmente, foi também encontrado uma deleção (DEL) de 54 bp e o valor de IC₅₀ de DHA apresentado foi de 0,3 nM.

A amostra RW30 revelou oito *SNPs*, dois *indels* e um valor de IC₅₀ de DHA de 0.5 nM. Os *SNPs* encontrados localizam-se nos nucleótidos 2125, 2133, 2147, 2150, 2151, 2154, 2158, 2166 sendo classificados em seis mutações não-sinónimas e duas mutações sinónimas. Adicionalmente foi identificada uma INS de 12 pb e uma DEL de 54 pb.

Na amostra RW106, o haplótipo revelou uma DEL de 27 pb e um valor de IC₅₀ de 9,6 nM.

No que diz respeito ao isolado RW32 revelou um haplótipo com um valor de IC₅₀ de DHA de 0,3 nM e foi identificado um polimorfismo localizado no nucleótido 876 que resultou numa mutação não-sinónima.

No isolado natural de *P. falciparum* RW66, foi identificada uma mutação não-sinónima devido ao polimorfismo encontrado no nucleótido 2554. Apresentou um valor de IC₅₀ de 4,7 nM.

A amostra RW40 apresentou dois polimorfismos nos nucleótidos 1919 e 2554 resultando em duas mutações não-sinónimas. Esta amostra apresentou um valor de IC₅₀ de DHA de 14,3 nM.

Tabela 9- Haplótipos no gene *pfubp-1* em amostras do Ruanda.

	Ruanda	T555C	A876G	A931G	C1919A	C2125T	A2133G	G2147A	G2150C	G2151A	T2154C	T2158C	A2166G	G2554A	INS	DEL	IC ₅₀ DHA
RW10	T	A	G	C	C	T	G	A	C	A	C	C	G	G		54 pb	0,3 nM
RW106	T	A	A	C	C	C	A	G	G	G	T	T	A	G		27 pb	9,6 nM
RW30	T	A	A	C	C	T	G	A	C	A	C	C	G	G	12 pb	54 pb	0,5 nM
RW32	T	G	A	C	C	C	A	G	G	G	T	T	A	G			0,3 nM
RW66	T	G	A	C	C	C	A	G	G	G	T	T	A	A			4,7 nM
RW57	T	A	A	C	C	C	A	A	C	A	C	C	G	G	12 pb	27 pb	8,8 nM
RW40	C	A	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	A	A			14,3 nM

IV.4.3- Haplótipos da RDST

Na RDST foram estudadas oito isolados naturais de *P.falciparum* (Tabela 10). Em oito isolados foram identificados sete haplótipos diferentes (Tabela 10). Os valores de IC₅₀ ao artesunato (ATN) encontrados variaram entre 0,2 e 12,5 nM (Tabela10).

O isolado STP13 revelou catorze *SNPs*, uma inserção (INS) de 12 pb e uma deleção (DEL) de 54 pb. O valor de IC₅₀ ao ATN foi de 4,1 nM. Os *SNPs* encontrados localizam-se nos nucleótidos 2120, 2123, 2124, 2125, 2127, 2131, 2133, 2139, 2147, 2150, 2151, 2154, 2158 e 2166 e deram origem a onze mutações não-sinónimas e três mutações sinónimas.

No isolado natural STP35 foram encontrados oito *SNPs*, uma DEL de 27 pb e um valor de IC₅₀ de 6,7 nM. Os *SNPs* identificados localizam-se nos nucleótidos 2125, 2133, 2147, 2150, 2151, 2154, 2158 e 2166 e resultaram em seis mutações não-sinónimas e em duas mutações sinónimas.

A amostra STP58 apresentou um valor de IC₅₀ ao artesunato três vezes superior (12,5 nM) ao respectivo valor de IC₅₀ de artesunato encontrado no isolado STP13 (4,1nM). Este isolado apresentou apenas um *SNP* no nucleótido 2193 que resultou numa mutação não-sinónima e uma DEL de 27 pb.

Foram encontrados quatro isolados naturais (STP29, STP45, STP73) com valores de IC₅₀ de 0,2 nM. O isolado STP29 revelou um polimorfismo de tamanho, uma DEL de 27 pb.

Na amostra STP45 foi identificado no haplótipo uma DEL de 27 pb e uma INS de 12 pb. Relativamente à amostra STP73 foi identificado um *SNP* localizado no nucleótido 1350 que é classificado como mutação não sinónima. Neste isolado foi também identificada uma DEL de 27 pb.

Nos isolados STP60 e STP65 não foram identificados nenhuns *SNPs* e *indels*, apresentando o mesmo haplótipo. A avaliação da susceptibilidade ao artesunato revelou valores de IC₅₀ ao artesunato de 0,2 nM e 2,3 nM respectivamente.

Tabela 10- Haplótipos no gene *pfubp-1* em amostras da RDST

STP	A1350G	G2120A	G2123C	G2124A	C2125T	T2127C	T2131C	A2133G	A2139G	G2147A	G2150C	G2151A	T2154C	T2158C	A2166G	G2193A	INS	DEL	IC ₅₀ ATN
STP29	A	G	G	A	C	T	T	A	A	G	G	G	T	T	A	G		27 pb	0,2 nM
STP45	A	G	G	A	C	T	T	A	A	G	G	G	T	T	A	G	12 bp	27 pb	0,2 nM
STP73	G	G	G	A	C	T	T	A	A	G	G	G	T	T	A	G		27 pb	0,2 nM
STP13	A	A	C	A	T	C	C	G	G	A	C	A	C	C	G	G	12 bp	54 pb	4,1 nM
STP35	A	G	G	A	T	T	T	G	A	A	C	A	C	C	G	G		27 pb	6,7 nM
STP58	A	G	G	A	C	T	T	A	A	G	G	G	T	T	A	A		27 pb	12,5 nM
STP60	A	G	G	A	C	T	T	A	A	G	G	G	T	T	A	G			0,2 nM
STP65	A	G	G	A	C	T	T	A	A	G	G	G	T	T	A	G			2,3 nM

IV.5- Comparação dos Haplótipos no gene *pfubp-1* encontrados nas Regiões Endêmicas

Pela análise comparativa verificou-se que o Ruanda é a região que proporcionalmente apresenta a maior variabilidade haplotípica (Tabela 9). O Brasil corresponde à região com menor variabilidade haplotípica.

Os haplótipos do Brasil são distintos das outras regiões estudadas. Isto porque apresentaram *SNPs* que, individualmente são diferentes dos encontrados nas outras regiões. No entanto existe uma exceção no que respeita à frequência de um *SNPs* que é comum a um isolado da RDST. O referido *SNP* foi encontrado no nucleótido 2193.

Os haplótipos encontrados em isolados naturais de *P. falciparum* oriundos das regiões do Ruanda e da RDST são diferentes. Contudo, alguns isolados dessas regiões apresentaram *SNPs* (RW10, RW30, RW57 e STP13 e STP35) e *indels* em comum. Estes isolados apresentaram seis polimorfismos localizados nos nucleótidos 2147, 2150, 2151, 2154, 2158, 2166. Os valores de IC_{50} da dihidroartemisinina dos isolados naturais do Ruanda variaram entre 0,3 e 0,5 nM e os valores de IC_{50} dos isolados da RDST foram de 4,1 e 6,7 nM.

IV.6- Estudos dos perfis genotípicos do gene *pfATPase6* em populações naturais de República Democrática de São Tomé e Príncipe, Ruanda e do Estado do Pará (Brasil).

Os resultados da sequenciação do gene *PfATPase6* foram apenas utilizados para consulta neste trabalho, tendo sido obtidos previamente no âmbito de outros estudos (Ferreira *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2008; Tinto *et al.*, 2006). No presente trabalho, utilizaram-se esses dados no intuito de efectuar uma análise comparativa com o gene *pfubp-1*, dado ambos encontrarem-se fisicamente próximos no cromossoma 1 do *P. falciparum*.

Os resultados seguidamente apresentados resumem a informação de dados publicados anteriormente a este trabalho, onde foram identificados oito polimorfismos nas áreas endêmicas estudadas dos quais, seis são mutações não-sinónimas e duas mutações sinónimas.

IV.6.1- Brasil

As amostras do Brasil apresentaram quatro *SNPs* (Tabela 11), os quais três foram exclusivos desta região. Estes polimorfismos resultaram em três mutações não-sinónimas e numa mutação sinónima. Estes polimorfismos encontram-se organizados em três haplótipos distintos. Esta população parasitária apresentou valores de IC_{50} ao artesunato que variaram entre 0,5 a 4,9 nM.

Em quatro isolados naturais (BR67, BR38, BR11 e BR52) foram encontrados dois *SNPs* localizados nos nucleótidos 110 e 1916, dos quais resultaram duas mutações não-sinónimas. Estes isolados apresentaram valores de IC_{50} ao artesunato de 4,8, 3,4, 2,1 e 0,5 nM respectivamente.

Do total das amostras analisadas por sequenciação, nove (BR50, BR58, BR05, BR07, BR17, BR39, BR24, BR68 e BR43) apresentaram uma única mutação sinónima resultante do polimorfismo no nucleótido 2694. Estes isolados apresentaram valores de IC_{50} ao artesunato que variaram entre 0,1 e 4,9 nM. O isolado BR43 apresentou um polimorfismo adicional localizado no nucleótido 1888. Este polimorfismo originou uma mutação não-sinónima e o valor de IC_{50} de artesunato que apresentou foi de 0,4 nM.

Tabela 11- Haplótipos do gene *pfATPase6* encontrados no Brasil.

Brasil	G110A	G1888T	G1916A	T2694A
BR50	G	G	G	A
BR58	G	G	G	A
BR05	G	G	G	A
BR39	G	G	G	A
BR07	G	G	G	A
BR17	G	G	G	A
BR24	G	G	G	A
BR68	G	G	G	A
BR67	A	G	A	A
BR11	A	G	A	T
BR38	A	G	A	T
BR52	A	G	A	T
BR43	G	T	G	A

IV.6.2- Ruanda

As amostras do Ruanda apresentaram cinco *SNPs* (Tabela 12), os quais quatro foram exclusivos desta região. Estes polimorfismos resultaram em três mutações não-sinónimas e em duas mutações sinónimas. Os polimorfismos referidos compõem cinco haplótipos distintos.

Tabela 12- Haplótipos no gene *pfATPase6* encontrados no Ruanda.

Ruanda	A345G	T1204G	G1291A	T1707A	T2694A
RW10	A	T	G	T	T
RW32	A	T	G	T	T
RW106	A	T	G	T	T
RW30	A	G	G	T	T
RW40	A	T	G	T	A
RW57	G	T	G	A	A
RW66	A	T	A	T	A

IV.6.3- RDST

Nos isolados da RDST foi encontrado um único *SNP* no nucleótido 2694 (Tabela 13) resultando numa mutação sinónima. Este polimorfismo foi encontrado em quatro dos oito isolados estudados (ST13, STP73, STP29, STP45). Destes isolados, três (STP73, STP29, STP45), apresentaram um valor de IC_{50} de 0,2 nM e o isolado STP13 possui um valor de IC_{50} de 4,1 nM.

Os isolados STP35, STP58, STP60 e STP65 apresentaram o mesmo haplótipo com uma variação na resposta de susceptibilidade ao artesunato (ATN) compreendida entre 0,2 a 12,5 nM.

Tabela 13- Haplótipos no gene *pfATPase6* encontrados na RDST.

RDST	T2694A	RDST	T2694A
STP13	A	STP35	T
STP73	A	STP58	T
STP29	A	STP60	T
STP45	A	STP65	T

IV.7- Comparação dos Haplótipos encontrados nas três Regiões Endêmicas

A RDST é a região em estudo que apresenta menor variabilidade haplotípica para o gene *pfATPase6*. A única mutação que apresenta é comum nos isolados estudados provenientes do Ruanda e do Brasil. As regiões endêmicas estudadas não apresentaram *indels* (inserção/delecção).

IV.8- Agrupamento Haplótico (Haplogrupo) dos genes *pfubp-1* e *pfATPase6*

No intuito de investigar a influência dos polimorfismos genéticos na resposta de susceptibilidade aos derivados de artemisinina (artesanato e dihidroartemisinina) foi realizado um estudo comparativo da frequência de haplótipos nos genes *pfubp-1* e *pfATPase6*. O agrupamento dos haplótipos destes dois genes permite verificar se existe variabilidade alélica entre as regiões estudadas e conseqüentemente inferir na dispersão do fenótipo de resistência.

IV.8.1- Brasil

Observaram-se oito agrupamentos de haplótipos entre os genes *pfubp-1* e *pfATPase6* dos quais cinco apresentavam o mesmo polimorfismo no gene *pfATPase6* (Tabela 14). Estas amostras apresentaram valores de IC_{50} ao artesunato (ATN) que variaram entre 0,1 nM a 4,9 nM.

O haplótipo presente nas amostras BR67 e BR38 tem um valor de IC_{50} ao artesunato de 4,8 e 3,4 nM.

Tabela 14- Agrupamento Haplótipo dos genes *pfubp-1*(UBP) e *pfATPase6* (ATP) em amostras do Brasil.

UBP	T843C	G857A	A1180T	T2152C	A2174G	A2177G	A2178G	C2181T	C2185T	G2193A	G2220A	INS	DEL	ATP	G110A	G1888T	G1916A	T2694A
BR67	C	A	T	T	G	G	G	T	T	A	G		27 pb	BR67	A	G	A	T
BR38	C	A	T	T	G	G	G	T	T	A	G		27 pb	BR38	A	G	A	T
BR11	C	A	A	T	G	G	G	T	T	A	G		27 pb	BR11	A	G	A	T
BR52	C	A	A	T	G	G	G	T	T	A	G		27 pb	BR52	A	G	A	T
BR58	T	G	T	C	A	A	A	C	C	G	G	12 pb		BR58	G	G	G	A
BR39	T	G	T	T	A	A	A	C	C	G	A			BR39	G	G	G	A
BR05	T	G	A	C	A	A	A	C	C	G	G	12 pb		BR05	G	G	G	A
BR07	T	G	A	T	A	A	A	C	C	G	A			BR07	G	G	G	A
BR17	T	G	A	T	A	A	A	C	C	G	A			BR17	G	G	G	A
BR50	T	G	A	T	A	A	A	C	C	G	A			BR50	G	G	G	A
BR68	T	G	A	C	A	A	A	C	C	G	G	12 pb		BR68	G	G	G	A
BR24	T	G	A	C	A	A	A	C	C	G	G	12 pb		BR24	G	G	G	A
BR43	T	G	A	T	A	A	A	C	C	G	A			BR43	G	T	G	A

V.8.2- Ruanda

Nos isolados do Ruanda foram encontrados sete agrupamentos haplotípicos entre os genes *pfubp-1* e *pfATPase6* nos sete isolados estudados (Tabela 15).

Tabela 15- Agrupamento Haplotípico dos genes *pfubp-1*(UBP) e *pfATPase6* (ATP) em amostras do Ruanda.

UBP	T555C	A876G	A931G	C1919A	C2125T	A2133G	G2147A	G2150C	G2151A	T2154C	T2158C	A2166C	G2554A	INS	DEL	ATP	A345G	T1204G	G1291A	T1707A	T2694A
RW10	T	A	A	G	T	G	A	C	A	C	C	G	G		54 pb	RW10	A	T	G	T	T
RW106	T	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	A	G		27 pb	RW106	A	T	G	T	T
RW30	T	A	A	C	T	G	A	C	A	C	C	G	G		12 pb	54 pb	RW30	A	G	T	T
RW32	T	G	A	C	C	A	G	G	G	T	T	A	G			RW32	A	T	G	T	T
RW66	T	G	A	C	C	A	G	G	G	T	T	A	A			RW66	A	T	A	T	A
RW40	C	A	A	A	C	A	G	G	G	T	T	A	A			RW40	A	T	G	T	A
RW57	T	A	A	C	C	A	A	C	A	C	C	G	G		12 pb	27 pb	RW57	G	T	G	A

V.8.3- RDST

Na RDSTP foram identificados sete agrupamentos de haplótipos entre os genes *pfubp-1* e *pfATPase6* (Tabela 16).

Tabela 16- Agrupamento Haplótipo dos genes *pfubp-1*(UBP) e *pfATPase6* (ATP) em amostras da RDST.

UBP	A1350G	G2120A	G2123C	G2124A	C2125T	T2127C	T2131C	A2133G	A2139G	G2147A	G2150C	G2151A	T2154C	T2158C	A2166G	G2193A	INS	DEL	ATP	T2694A
STP29	A	G	G	A	C	T	T	A	A	G	G	G	T	T	A	G		27 bp	STP29	A
STP45	A	G	G	A	C	T	T	A	A	G	G	G	T	T	A	G	12 bp	27 bp	STP45	A
STP73	G	G	G	A	C	T	T	A	A	G	G	G	T	T	A	G		27bp	STP73	A
STP13	A	A	C	A	T	C	C	G	G	A	C	A	C	C	G	G	12 bp	54 bp	STP13	A
STP35	A	G	G	A	T	T	T	G	A	A	C	A	C	C	G	G		27 bp	STP35	T
STP58	A	G	G	A	C	T	T	A	A	G	G	G	T	T	A	A		27 bp	STP58	T
STP60	A	G	G	A	C	T	T	A	A	G	G	G	T	T	A	G			STP60	T
STP65	A	G	G	A	C	T	T	A	A	G	G	G	T	T	A	G			STP65	T

IV.9- Estudo comparativo de haplótipos entre alelos do gene *pfubp1* e *pfATPase6* nas amostras.

Os agrupamentos de haplótipos são distintos nas regiões estudadas, embora possam apresentar individualmente alguns alelos nos genes que são comuns entre os isolados. O Brasil apresenta alelos mutantes exclusivos, com exceção para dois alelos que são também encontrados nas outras regiões estudadas. Trata-se do polimorfismo no nucleótido 2193 no gene da ubiquitina que foi encontrado também num isolado da RDST e um polimorfismo no nucleótido 2694 do gene *pfATPase6* que é encontrado em isolados das duas regiões Africanas.

V- DISCUSSÃO

O *P.falciparum* já desenvolveu resistência à maioria dos antimaláricos com exceção da artemisinina e derivados. Actualmente, é essencial prevenir a selecção de resistência à artemisinina e derivados. No intuito de prevenir o surgimento de resistência aos derivados de artemisinina é necessário compreender como surge este fenótipo e como este se pode dispersar. Para isso é fundamental entender estrutura genética da população parasitária de *P.falciparum* em genes potencialmente potenciais moduladores da resposta aos fármacos (Certain & Sibley, 2007). O gene *pfATPase6* foi recentemente proposto como principal alvo terapêutico dos derivados de artemisinina (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003). Recentemente foi identificada uma mutação S769N no gene *pfATPase6* em seis de sete isolados da Guiana Francesa com reduzida susceptibilidade *in vitro* ao artemeter (Jambou *et al.*, 2005). Foi sugerido conseqüentemente que esta mutação ou outras mutações neste gene poderão estar envolvida na resistência da artemisinina e derivados. Investigações realizadas em estirpes de *Plasmodium chabaudi chabaudi* com resistência à artemisinina geneticamente estável sugeriu o gene *pfubp-1* como potencial modulador da susceptibilidade aos derivados de artemisinina (Afonso *et al.*, 2006).

O *Plasmodium falciparum* é um organismo haplóide durante a maior parte do seu ciclo de vida. No presente estudo foram utilizadas amostras de parasitas que se encontram na fase do ciclo eritrocitário, portanto haplóide. Desta forma, o estudo da estrutura genética da população parasitária incidiu na identificação e caracterização *de novo* de mutações e análise de haplótipos nos dois genes supracitados nas várias regiões geográficas estudadas. Neste âmbito, foram encontradas variações geográficas genótipos de parasitas e esses dados poderão fornecer informações atempadas relativamente ao futuro sucesso das estratégias de controlo da malária.

Tendo em conta os dados acima mencionados, a pesquisa de polimorfismos nos genes *pfubp-1* e *pfATPase6* por sequenciação foi realizada num conjunto de amostras com diferentes susceptibilidades aos derivados de artemisinina provenientes das três regiões endémicas.

V.1- Perfil Genotípico e Suscetibilidade Farmacológica

Os dados do estudo prévio de avaliação da susceptibilidade a derivados da artemisinina em isolados naturais de *P.falciparum* e os dados dos perfis genotípicos (*SNPs* e *indels*) realizado no presente estudo, sugere não existir qualquer correlação entre estas variáveis. Esta suposição é suportada pela observação de que de determinadas amostras que possuíam um elevado número de mutações não foram necessariamente aquelas em que se observou uma diminuição da susceptibilidade *in vitro* aos antimaláricos aplicados. A título exemplificativo, a amostra STP58 apresentou apenas um *SNP* e um *indel* no gene *pfubp-1* e, no entanto apresenta um valor de IC_{50} ao artesunato aproximadamente três vezes superior ao encontrado em isolados tais como o STP13 e o BR38, amostras estas que apresentaram um número significativamente maior de mutações. Adicionalmente verificou-se que existem isolados que revelaram vários polimorfismos e apresentaram respostas de susceptibilidade reduzida (BR11, BR67, RW57) ou elevada (BR52, RW10, RW30) sugerindo que o grau de polimorfismo neste gene parece ser independente do nível de susceptibilidade *in vitro* aos derivados da artemisinina.

V.2- Mutações Sinónimas vs Mutações Não-Sinónimas

No conjunto dos isolados naturais de *P.falciparum* oriundos das regiões estudadas foram detectados trinta e um polimorfismos (*SNPs*) de entre os quais sete representaram mutações sinónimas e vinte e quatro mutações não-sinónimas. Deste modo, dependendo da natureza da e do local do genoma (reguladora, codificante e não-codificante) em que ocorrem as referidas mutações, as mesmas poderão ter ou não consequências na funcionalidade da proteína que é codificada pelo gene *pfubp-1*. As mutações podem ocorrer em sequências do DNA que não são regiões codificantes nem regiões reguladoras e por isso não apresentam expressão fenotípica. A estrutura da proteína codificada pelo gene *pfubp-1* é composta por uma sequência de aminoácidos onde se localiza o domínio funcional de catálise (domínio carboxilo) e um domínio de baixa complexidade (Figura 15).

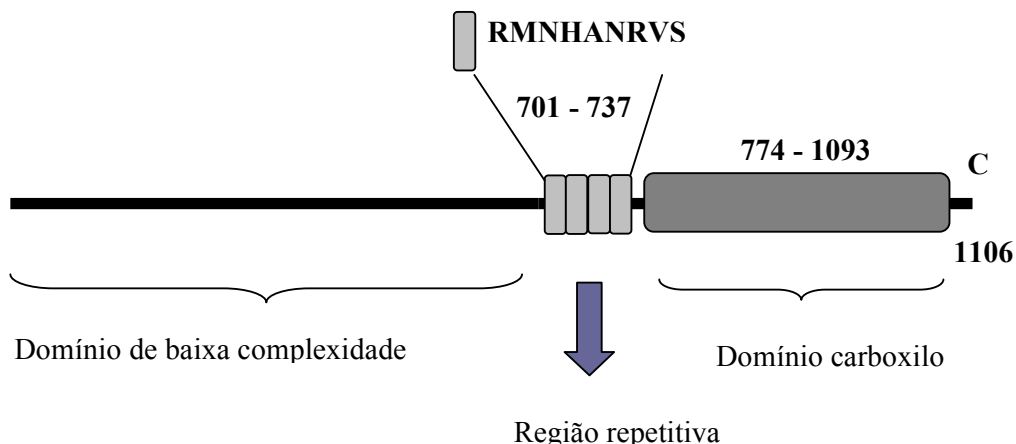


Figura 15- Esquema representativo dos domínios estruturais da proteína codificada pelo gene *pfubp-1* (gentilmente cedido pelo Prof. Pedro Cravo; IHMT) .

Os resultados obtidos nas regiões endêmicas estudadas, mostram que vinte e duas mutações não-sinónimas encontradas, se localizam em aminoácidos que se situam fora do domínio carboxilo da proteína, sugerindo que estas mutações não terão impacto na funcionalidade da proteína e consequentemente não afectam a viabilidade dos parasitas portadores destas mutações no gene *pfubp-1*. No entanto foi encontrada uma mutação não-sinónima, G2554A, em amostras provenientes do Ruanda, que codifica a alteração aminoacídica M851I. Tal como a figura acima representada verifica-se que o resíduo 851 se localiza no domínio catalítico da proteína sendo por isso plausível que esta mutação possa alterar a funcionalidade da proteína.

V.3- Haplótipos do gene *pfubp-1*

No Brasil foram encontrados oito haplótipos distintos (Tabela 7) de um total de treze amostras enquanto que nas regiões Africanas foram encontrados sete haplótipos em sete isolados estudados oriundos do Ruanda (Tabela 8) e na RDST, em oito isolados naturais foram identificados sete haplótipos (Tabela 9). Apesar do número de isolados estudados em cada região não ser equitativo, estes dados sugerem que existe maior variabilidade haplotípica nas regiões

Africanas, considerando o Ruanda a região com a maior variabilidade de haplótipos para o gene *pfubp-1*. O Brasil foi a única região onde se verificou a repetição de um mesmo haplótipo.

Os haplótipos do Brasil são distintos das outras regiões estudadas, visto que apresentaram alelos mutantes que são distintos dos encontrados nas outras regiões estudadas com exceção do polimorfismo localizado no nucleótido 2193 do gene *pfubp-1*.

Os haplótipos encontrados em isolados naturais de *P. falciparum* das regiões do Ruanda e da RDST são distintos. Contudo, alguns isolados nessas regiões apresentaram mutações e *indels* em comum. Trata-se neste caso das amostras RW10, RW30, RW57 e STP13 e STP35 (Tabelas 8 e 9). De acordo com os resultados obtidos neste estudo verifica-se que a região do Brasil apresenta menor variabilidade alélica confirmando estudos anteriores incidindo noutros genes, onde havia observado uma diversidade genética mais reduzida (Mu *et al.*, 2005; Conway *et al.*, 2007; Volkman *et al.*, 2007;). As diferenças encontradas nas estruturas dos haplótipos encontrados no Brasil e nas regiões Africanas poderão ser explicadas, entre outras razões, pelo isolamento geográfico, nível de endemicidade mais baixa e menor taxa de recombinação genética que ocorre entre clones de parasitas (Mu *et al.*, 2005). Deste modo, em regiões de elevada transmissão (regiões Africanas) é frequente encontrar indivíduos infectados com parasitas portadores de múltiplos genótipos o que promove a recombinação genética entre diferentes genótipos de parasitas (Conway, 2007; Eklund & Fidock, 2007).

V.4- Agrupamento Haplótipo entre os Genes *pfubp-1* e *pfATPase6*

Os polimorfismos genéticos não são segregados aleatoriamente. Em vez disso, eles tendem a formar *clusters* denominados de haplótipos resultantes de recombinação genética (Eklund & Fidock, 2007). A taxa de recombinação numa dada população poderá afectar a taxa de incidência de resistência farmacológica quando mais do um gene está envolvido no fenótipo (Curtis *et al.*, 1995).

No Brasil verificou-se que a variedade de agrupamento de haplótipos entre os genes *pfubp-1* e *pfATPase6* é a mais baixa comparativamente às regiões do Ruanda e RDST. Assumindo que estes genes são potenciais moduladores de susceptibilidade à artemisinina e derivados (Jambou *et al.*, 2005; Afonso *et al.*, 2006), verifica-se que na região do Brasil a dispersão alélica será mais restrita, mas o fenótipo de resistência irá surgir primeiro em regiões hipoendêmicas como esta (White & Pongtavornpinyo, 2003; W.H.O., 2006c). Assim sendo as populações naturais de *P.falciparum* que se encontram na fase haplóide podem apresentar alelos selvagens e/ou alelos mutantes (Figura 16) seleccionados por pressão farmacológica. O surgimento da resistência tem início quando elementos da população parasitária exposta às concentrações do fármaco apresentam mutações espontâneas que lhes proporcionam uma vantagem selectiva e, que em condições normais inibiriam a proliferação da fracção sensível da população parasitária (Peters, 1990). Os alelos mutantes resultam da selecção natural, pois conferem maior capacidade de sobrevivência sendo preferencialmente transmitidos ao mosquito fêmea (White & Pongtavornpinyo, 2003).

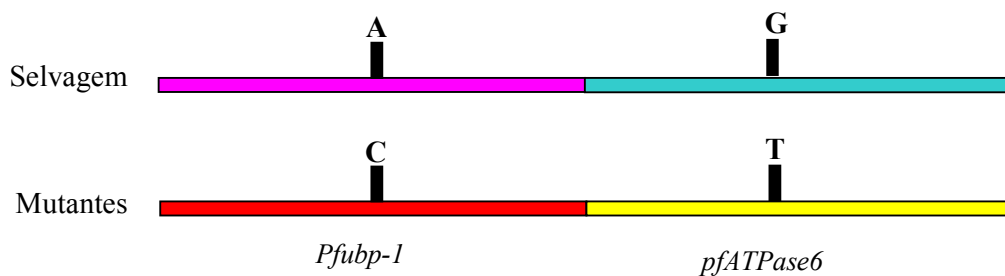


Figura 16- Esquema representativo do Desenvolvimento Haplóide de *P.falciparum* no cromossoma 1 dos genes *pfubp-1* e *pfATPase6*.

Numa região de baixa transmissão de Malária como a região do Brasil a taxa de recombinação nas populações naturais é mais baixa e por isso o cruzamento entre gâmetas com idêntico genótipo (auto-fecundação) predomina e reduz a possibilidade de aleatorizar os genomas ou quebrar associações haplotípicas (Hayton & Su, 2008). Desta forma, o que se verifica é que ao longo das várias gerações de parasitas que completam o seu ciclo, a variabilidade de haplótipos entre os dois genes é cada vez menor, porque para além de se tratar de uma região com uma taxa

de recombinação baixa (menor variabilidade genética), estes genes encontram-se fisicamente muito próximos e na fase diplóide os alelos são herdados em bloco aquando do *crossing-over* (Figura 17). O esquema seguidamente representado apresenta as possibilidades alélicas de dois genes fisicamente próximos. Os alelos herdados correspondem a alelos mutantes que predominam e os alelos selvagens vão sendo eliminados por selecção natural.

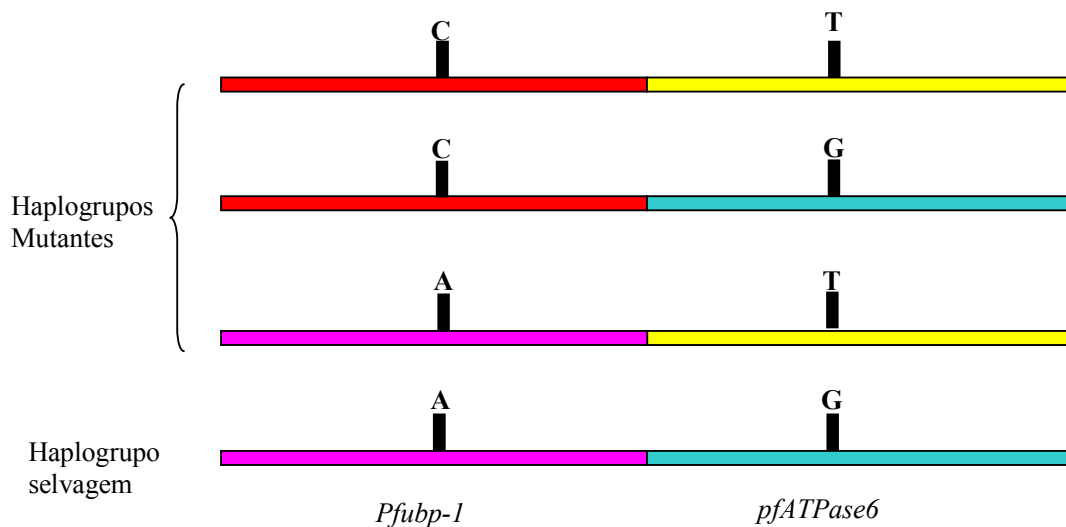


Figura 17- Esquema representativo do desenvolvimento diplóide de *P.falciparum* no cromossoma 1 dos genes *pfubp-1* e *pfATPase6*.

Nos isolados naturais de *P.falciparum* oriundos do Ruanda e da RDST como a taxa de recombinação é elevada, existe uma maior variabilidade alélica dentro da população parasitária que se mantém ao longo das gerações. O *linkage disequilibrium* tem sido inversamente associado à intensidade de transmissão de *P.falciparum* devido existir um sistema misto de fecundação (fecundação entre gâmetas provenientes de iguais ou diferentes genótipos) (Conway *et al.*, 2004). O *linkage disequilibrium* consiste na associação não aleatória de alelos, que pode ser afectada por diversos factores tais como: a distância física entre loci e marcadores genéticos, taxa de recombinação, idade das mutações, estrutura populacional entre outros (Hayton & Su, 2008). Com a implementação da toma desta classe de antimaláricos é possível prever que o surgimento de um fenótipo de resistência aconteça primeiro em regiões de baixa transmissão como a região do Brasil.

No entanto seria importante ter realizado este estudo com uma maior amostragem de forma a dar mais robustez aos resultados e conclusões deste estudo, uma vez que estivemos a comparar treze isolados naturais provenientes do Brasil com sete e oito isolados provenientes do Ruanda e República Democrática de São Tomé e Príncipe.

Estudos recentes realizados em África (Malawi) observaram que doze anos após a substituição da cloroquina por outro fármaco foram encontradas estirpes sensíveis à cloroquina (Laufer *et al.*, 2006). No entanto a resistência à cloroquina manteve-se com maior frequência em regiões da América do Sul e da Ásia (Nguyen *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2004). O surgimento de parasitas sensíveis em África poderá ser justificado pelo *fitness* do parasita mas também pela elevada taxa de recombinação genética que ocorre neste continente promovendo uma maior variabilidade genética do que a encontrada em países com níveis de endemicidade mais baixos. Estas observações sugerem que em regiões onde a taxa de recombinação é mais elevada como nas regiões Africanas a eliminação da pressão selectiva do fármaco irá promover o surgimento de estirpes sensíveis ao antimalárico anteriormente implementado. Como a recolha dos isolados naturais de *P.falciparum* nestas regiões foi realizada antes da implementação da artemisinina e derivados, seria interessante elaborar o mesmo tipo de estudo após a implementação desta classe de antimaláricos nas regiões referidas.

Este estudo teve como estratégia a identificação de haplótipos que permitam inferir sobre a história evolutiva do gene modulador de resistência à artemisinina e seus derivados.

Este trabalho é pioneiro porque permitiu dar a conhecer dados importantes sobre a estrutura genética de *P.falciparum* em dois genes candidatos à resistência aos derivados da artemisinina antes da implementação desta classe de antimaláricos nas regiões geográficas estudadas. A determinação dos moduladores ao desenvolvimento de resistência permite avaliar as consequências ao uso desta classe de antimaláricos, evitando prejuízos sócio-económicos devido a uma errada política terapêutica.

VI -CONCLUSÕES

No âmbito da problemática deste trabalho foi possível identificar polimorfismos que possam estar correlacionados com a avaliação à susceptibilidade aos antimaláricos. O estudo envolveu isolados naturais de *P.falciparum* provenientes de três regiões a fim de estudar o perfil genotípico do gene *pfubp-1* e compará-lo com o perfil genotípico do gene *pfATPase6*.

Os resultados deste trabalho deram a conhecer a estrutura populacional em termos do perfil de dois potenciais moduladores genéticos de susceptibilidade à artemisinina e derivados antes da utilização destes fármacos em larga escala. Deste modo, o presente estudo traduz-se como uma ferramenta que servirá de base a actividades de vigilância molecular continuadas, no intuito de preservar a eficácia prolongada desta importante classe de antimaláricos.

VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afonso, A., Hunt, P., Cheesman, S., Alves, A.C., Cunha, C.V., do Rosario, V., Cravo, P..2006. Malaria parasites can develop stable resistance to artemisinin but lack mutations in candidate genes *atp6* (encoding the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase), *tct*, *mdr1*, and *cg10*. *Antimicrob. Agents Chemotherapy*, Feb; **50**:480-489.

Anderson, T.J.C., Haubold, B., Williams, J.T., Estrada-Franco, J.G., Richardson, L., Mollinedo, R., Bockaire, M., Mokili, J., Mharakurwa, S., French, N., Whitworth, J., Velez, I.D., Brockman, A., Nosten, F., Ferreira, M.U., Day, K.P..2000. Microsatellites reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol.Biol. Evol.* **17**: 1467-1482.

Bajaj, R., Mohanty, S., Dash, A.S., Das, A.. 2008. Fine-scale genetic characterization of *Plasmodium falciparum* chromosome 7 encompassing the antigenic *var* and the drug-resistance *pfprt* genes. *Journal of Genetics*, April, **87**(1): 59-64.

Bhisutthibhan, J., Pan, X.Q., Hossler, P.A., Walker, D.J., Yowell, C.A., Carlton, J., Dame, J.B., Meshnick, S.R.. 1998. The *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumor protein homolog and its reaction with the antimalarial drug artemisinin. *The Journal of Biological Chemistry*, Jun; **273** (26): 16192-16198.

Bhisutthibhan, J., Philbert, M.A., Fujioka, M., Aikawa, M., Meshnick, S.R.. 1999. The *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumor protein: subcellular localization and calcium binding. *European Journal of Cell Biology*, Sep; **78** (9): 665-670.

Bloland, P.B..2001. Drug resistance in Malaria. *World Health Organization*.

Bwijo, B., Kaneko, A., Takechi, M., Zungu, I.L., Moriyama, Y., Lum, J.K., Tsukahara, T., Mita, T., Takahashi, N., Bergqvist, Y., Bjorkman, A., Kobayakawa, T.. 2003. High prevalence of quintuple mutant *dhps/dhfr* genes in *Plasmodium falciparum* infections seven years after introduction of sulfadoxine and pyrimethamine as first line treatment in Malawi. *Acta Tropica*, Mar; **85** (3): 363-373.

Carlton, J.M.R., Hayton, K., Cravo, P.V.L., Walliker, D.. 2001. Of mice and malaria mutants: Unravelling the genetics of drug resistance using rodent malaria models. *Trends in Parasitology*, May; **17**(5), 236-242.

Certain, L.K., Sibley, C.H..2007. *Plasmodium falciparum*: A novel method for analysing haplotypes in mixed infection. *Exp.Parasitol.*, Mar; **115**(3): 233-241.

Cojean, S., Noël, A., Garnier, D., Hubert, V., Le Bras, J., Durand, R.. 2006. Lack of association between putative transporter gene polymorphisms in *Plasmodium falciparum* and chloroquine resistance in imported malaria isolates from Africa. *Malaria Journal*, Mar;**5**: 24.

Conway, D.J. , Roper, C., Oduola, A.M., Arnot, D.E., Kremsner, P.G., Grobusch, M.P., Curtis, C.F., Greenwood, B.M. 1999. High recombination rate in natural populations of *Pasmodium falciparum*. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, Apr; **96**(8):4506-4511.

Conway, D.J., Machado, R.L.D., Póvoa, M.M., Calvosa, V.S.P., Ferreira, M.U., Rossit, A.R.B., dos Santos, E.J.M..2004. Genetic Structure of *Plasmodium falciparum* Populations in the Brazilian Amazon Region. *JID*, Nov; **190**.

Conway, D.J.. 2007. Molecular Epidemiology of Malaria. *Clinical Microbiology Review*, Jan.; **20**(1):188-204.

Cooper, R.A., Carucci, D.J.. 2004. Proteomic approaches to studying drug targets and resistance in *Plasmodium*. *Current Drug Targets: Infectious Disorders*, Mar; **4** (1): 41-51.

Corcoran, L.M., Forsyth, K.P., Bianco, A.E., Brown, G.V., Kemp, D.J..1986. Chromosome size polymorphisms in *Plasmodium falciparum* can involve deletions and are frequent in natural parasite populations. *Cell*, Jan; **44** (1):87-95.

Corcoran, L.M., Thompson, J.K., Walliker, D., Kemp, D.J..1988. Homologous recombination within subtelomeric repeat sequences generates chromosome size polymorphisms in *Plasmodium falciparum*. *Cell*, Jun; **53**(5): 807-813.

Cravo, P. Culleton, R., Hunt, P., Walliker, D., Mackinnon, M.. 2001. Antimalarial drugs clear resistant parasites from partially immune hosts. *Anti Microb. Agents Chem.* **45**(10), 2897-2901.

Cravo, P. & Rosário, V.E.. 2002. Aspectos da Genética Molecular da Resistência aos Fármacos Antimaláricos. *Boletim de Biotecnologia*, **73**:2-8.

Cravo, P., Culleton, R., Afonso, A., Ferreira, I.D., do Rosário, V.E.. 2006. Mechanisms of drug resistance in malaria: Current and new challenges. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, Jan; **5** (1): 63-73.

Curtis, C.F., Kang, W., Gabo, B., Jiang, H., Wang, H., Yu, T., Yu, P., Xu, B..1995. Tests for possible effects of selection by domestic pyrethroids for resistance in culicine and anopheline mosquitoes in Schiuan and Hubei. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, Dec, **89**(6): 677-84.

Doherty, F.J., Dawson, S., Mayer, R.J..2002. The ubiquitin-proteasome pathway in intracellular proteolysis, *Essays Biochem*; 38:51-63.

Dokomajilar, C., Lankoande, Z.M., Dorsey, G., Zongo, I., Ouedraogo, J.B., Rosenthal, P.J.. 2006. Roles of specific Plasmodium falciparum mutations in resistance to amodiaquine and sulfadoxine-pyrimethamine in Burkina Faso. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Jul; **75** (1): 162-165.

Ekland, E.H., Fidock, D. A.. 2007. Advances in understanding the genetic basis of antimalarial drug resistance. *National Institute of Health*, **10**(4):363-370.

Eckstein-Ludwig, U., Webb, R.J., Van Goethem, I.D., East, J.M., Lee, A.G., Kimura, M., O'Neill, P.M., Bray, P.G., Ward, S.A., Krishna, S.. 2003. Artemisinin target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, Aug; **424** (6951): 957-961.

Frédérich, M., Dogne, J.M., Angenot, L., De Mol, P.. 2002. New trends in anti-malarial agents. *Current Medicinal Chemistry*, Aug; **9** (15): 1435-1456.

Ferone, R.. 1977. Folate metabolism in malaria. *Bulletin of the World Health Organization* **55**(2-3): 291-298.

Ferreira, I.D., do Rosário, V.E., Cravo, P.. 2006. Real-time quantitative PCR with SYBR Green I detection for estimating copy numbers of nine drug resistance candidate genes in *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*, Jan; **5**: 1.

Ferreira, I.D., Lopes, D., Martinelli, A., Ferreira, C., do Rosario, V.E., Cravo. P., 2007. In vivo assessment of artesunate, artemether and amodiaquine susceptibility and molecular analysis of putative resistance-associated mutations of *Plasmodium falciparum* from São Tomé and Príncipe. *Tropical Medicine and International Health*, Mar;12(3): 353-362.

Ferreira I.D., Martinelli A., Rodrigues L.A., Nascimento J.M.S., do Carmo, E.L., do Rosario, V.E., Póvoa, M.M., Cravo, P.. 2008. *Plasmodium falciparum* from Pará state (Brasil) shows satisfactory in vitro response to artemisinin derivatives and absence of the S769N mutation in the SERCA-type *PfATPase6*. *In Press*.

Foote, S.J., Thompson, J.K., Conway, A.F., Kemp, D.J..1989. Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P.falciparum*. *Cell*, Jun; **57**(6):921-930.

Frontali, C., Walliker, D., Mons, B..1991..Genome organization and genetics of *Plasmodium*. *Acta Leiden*, **60** (1): 13-17.

Gantt, S.M. et al.. 1998. Proteasome inhibitors block development of *Plasmodium* spp. *Antimicro. Agents Chemother*; **42**:2731-2738.

Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J.A., Rutherford, K., Salzberg, S.L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.S., Nene, V., Shallon, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea,

M.M Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M.W., Vaidya, A.B., Martin, D.M., Fairlamb, A.H., Fraunholz, M.J., Roos, D.S., Ralph, S.A., McFadden, G.I., Cummings, L.M., Subramanian, G.M., Mungall, C., Venter, J.C., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Newbold, C., Davis, R.W., Fraser, C.M., Barrell, B..2202. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, Oct; **419** (6906):498-511.

Garin, D., Chaulet, J.F., Robert, Y., Chapalain, J.C., Lamarque, D., Peyron, F.1991. Malaria: Chloroquine-resistance. *Med. Trop.* **51** (1): 29-35.

Ginsburg, H., Famin, O., Zhang, J., Krugliak, M.. 1998. Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action. *Biochemical Pharmacology*, Nov; **56** (10): 1305-1313.

Ginsburg, H., Ward, A.S., Bray, P.G.. 1999. An integrated model of chloroquine action. *Parasitol. Today*, Sep; **15**(9), 357-360.

Golenser, J., Waknine, J.H., Krugliak, M., Hunt, N.H., Grau, G.E.. 2006. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. *International Journal for Parasitology*, Dec; **36** (14): 1427-1441.

Gonzalez, J., Bai, G., Frevert, U., Corey, E.J., Eichinger, D..1999. Proteasome-dependent cyst formation and stage-specific ubiquitin mRNA accumulation in *Entamoeba invadens*. *European Journal of Biochemistry*; 264: 897-904.

Happi, C.T., Gbotosho, G.O., Folarin, O.A., Bolaji, O.M., Sowunmi, A., Kyle, D.E., Milhous, W., Wirth, D.F., Oduola, A.M.. 2006. 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. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Jul; **75** (1): 155-161.

Hastings, I.A..2004. The origins of antimalarial drug resistance, *Trends in Parasitology*. Nov; **20** (11): 512-518.

Hatabu, T., Kawazu, S., Kojima, S., Sato, K., Singhasivanon, P., Looareesuwan, S., Kano, S.. 2005. In vitro susceptibility and genetic variations for chloroquine and mefloquine in *Plasmodium falciparum* isolates from Thai-Myanmar border. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **36** (Suppl 4): 73-79.

Hatabu. T., Hagiwara, M., Taguchi, N., Kiyozawa, M., Suzuki, M., Kano, S., Sato, K..2006. *Plasmodium falciparum*: The fungal metabolite gliotoxin inhibits proteasome proteolytic activity and exerts a plasmocidal effect on *P.falciparum*, *Experimental Parasitology*; 112:179-183.

Haynes, R.K., Fugmann, B., Stetter, J., Rieckmann, K., Heilmann, H.D., Chan, H.W., Cheung, M.K., Lam, W.L., Wong, H.N., Croft, S.L., Vivas, L., Rattray, L., Stewart, L., Peters, W., Robinson, B.L., Edstein, M.D., Kotecka, B., Kyle, D.E., Beckermann, B., Gerisch, M., Radtke, M., Schmuck, G., Steinke, W., Wollborn, U., Schmeer, K., Römer, A..2006. Artemisone – a new, highly active antimalarial drug of the artemisinin class. *Angewandte Chemie International Edition in English*, Mar; **45** (13): 2082-2088.

Hayton, K., Su, X..2008. Drug resistance and genetic mapping in *Plasmodium falciparum*. *Curr Genet*, Sep, **18**.

Hershko A; Ciechanover A (2001) The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochemical* 70.

Hess F.I., Nukuro E., Judson, L., Rodgers, J., Nothdurft H.D., Rieckmann K.H..1997. Anti-malarial drug resistance, malnutrition and socio-economic status. *Trop. Med. Int.Health*; **2**(8), 721-728.

Hien, T.T., White, N.J.. 1993. Qunghaosu. *Lancet*, Mar; **341** (8845): 603-608.

Hien, T.T.. 1994. An overview of the clinical use of artemisinin and its derivatives in the treatment of falciparum malaria in Viet Nam. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Jun; **88** (Suppl. 1): S7-S8.

Holmgren, G., Björkman, A., Gil, J.P.. 2006 . Amodiaquine resistance is not related to rare findings of *pfmdr1* gene amplifications in Kenya. *Tropical Medicine and International Health*, Dec; **11** (12): 1808-1812.

Holmgren, G., Hamrin, J., Svärd, J., Martensson, A., Gil, J.P., Björkman, A.. 2007. Selection of *pfmdr1* mutations after amodiaquine monotherapy and amodiaquine plus artemisinin combination therapy in East Africa. *Infection, genetics and evolution*, Sep; **7** (5): 562-569.

Hunt,P., Afonso, A., Creasey, A., Culleton, R., Sidhu, A.B.S., Logan, J., Valderramos, S.G., Mcnae, I., Cheesman, S., do Rosario, V., Carter, R., Fidock, D.A., Cravo, P.. 2007. Gene encoding a deubiquitinating enzyme is mutated in artesunate- and chloroquine-resistant rodent malaria parasites. *Molecular Microbiology*; **65**(1):27-40.

I.P.C.C., 2007: *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel and Climate*

Change, M.L. Parry, O.F. Canziani, J.P. Palutikof, P.J. van der Linden and C.E. Hanson, Eds, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 976pp.

Ittarat W., Pickard A. L., Rattanasinganchan P., Wilairatana P., Looareesuwan S., Emery K., Low J., Udomsangpetch R., & Meshnick, S. R. 2003. Recrudescence in artesunate-treated patients with falciparum malaria is dependent on parasite burden not on parasite factors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Feb.; **68**:147-152.

Jambou R., Legrand E., Niang M., Khim N., Lim P., Volney B., Elaka M.T., Bouchier C., Esterre P., Fandeur T., Mercereau-Puijalon O..2005. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in vitro artemether and point mutations of the SERCA-type *PfATPase6*. *Lancet. Dec*; 366(3):1960-1963.

Jeffares, D.C., Pain, A., Berry, A., Cox A.V., Stalker, J., Ingle, C.E., Thomas, A., Quail, M.A., Siebenthall, K., Uhlemann, A.C.*et al.*.2007. Genome variation and evolution of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat.Genet.*, **39**:120-122.

Krishna, S., Uhlemann, A.C., Haynes, R.K.. 2004. Artemisinins: mechanisms of action and potential for resistance. *Drug Resistance Update*, Aug-Oct; **7** (4-5): 233-244.

Kublin, J.G., Dzinjalama, F.K., Kamwendo, D.D., Malkin, E.M., Cortese, J.F., Martino, L.M., Mukadam, R.A., Rogerson, S.J., Lescano, A.G., Molyneux, M.E., Winstanley, P.A., Chimpeni, P., Taylor, T.E., Plowe, C.V.. 2002. Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *Journal of Infectious Diseases*, Feb; **185** (3): 380-388.

Lanzer, M., de Bruin, D., Wertheimer, S.P., Ravetch, J.V.. 1994. Organisation of chromosomes in *Plasmodium falciparum*: a model for generating karyotypic diversity. *Parasitology Today*, Mar; **10**(3):114-117.

Laufer, M.K., Phillip, M.D., Thesing, C., D.O., Eddington, N.C., M.S., Masonga, R., Dzinjalama, F.K., Takala, S.L., Taylor, T.E., Plowe, C.V..2006. Return of Chloroquine Antimalarial Efficacy in Malawi. *The New England Journal of Medicine*, Nov; **355**; 19:1959-1966.

Le Bras, J., Durand, R..2003. The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, Apr; **17** (2): 147-153.

MacPherson, D.W., Gushulak, B.D., Macdonalda, L.. 2007. Health and foreign policy: influences of migration and population mobility. *Bulletin of the World Health Organization*, Mar; **85**(3):200-206.

Maïga, O. Djimdé, A.A., Hubert, V., Renard, E., Aubouy, A., Kironde, F., Nsimba, B., Koram, K., Doumbo, O.K., Le Bras, J., Clain, J..2007. A shared asian origin of the triple-mutant *dhfr* allele in *Plasmodium falciparum* from sites across Africa. *J Infect Dis*, Jul,1; **196**(1): 165-172.

Martínez- Baylach, J., Cabot Damau, A., García- Rodríguez, Saucá, G..2007. Malaria Importada: revision epidemiológica y clínica de una enfermedad emergente cada vez más frecuente. *An. Pediatr. Sep.*; **67**(3):199-205.

Meshnick, S.R., Taylor T.E., Kamchonwongpaisan, S.. 1996. Artemisinin and the Antimalarial Endoperoxides: from Herbal Remedy to Target Chemotherapy; *Microbiological Reviews*, Jun; **60**(2): 301-315.

Meshnick, S.R..2002. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *International Journal of Parasitology*, Dec; **32**(13):1655-1660.

Mu, J., Awadalla, P., Duan, J., McGee, K.M., Joy, D.A., McVean, G.A.T., Su, X..2005. Recombination Hotspots and Population Structure in *Plasmodium falciparum*. *PLOS Biology*, Oct.; **3**(10):1734-1741.

Nagelschimitz, J., Voith, B., Wensing, G., Roemer, A., Fugmann, B., Haynes, R.K., Kotecka, B.M., Rieckmann, K.H., Edstein, M.D..2008. First Assessment in Humans of the safety, tolerability, pharmacokinetics and ex vivo pharmacodynamic antimalarial activity of the new artemisinin derivative artemisone. *Antimicrob. Agents Chemother*, Sep; **52**(9): 3085-91.

Nguyen, M.H., Davis, T.M., Cox-Singh, J. *et al.*.2003.Treatment of uncomplicated falciparum malaria in Southern Vietnam: can chloroquine or sulfadoxine-pyrimethamine be introduced in combination with artesunate? *Clin Infect Dis* 2003; 37: 1461-6.

Nsoby, S.L., Dokomajilar, C., Joloba, M., Dorsey, G., Rosenthal, P.J.. 2007. Resistance mediating *Plasmodium falciparum* *pfcr1* and *pfmdr1* alleles after treatment with artesunate-amodiaquine in Uganda. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Aug; **51** (8): 3023-3025.

Ochong, E.O., van den Broek, I.V., Keus, K., Nzila, A.. 2003. Short report:association between chloroquine and amodiaquine resistance and allelic variation in the *Plasmodium falciparum* multiple drug resistance 1 gene and the chloroquine resistance transporter gene in isolates from the upper Nile in Southern Sudan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Aug; **69** (2):184-187.

Ojurongbe, O., Ogunbamigbe, T.O., Fagbenro-Beyioku, A.F., Fendel, R., Kremsner, P.G., Kun, J.F.J.. 2007. Rapid detection of Pfert and Pfmdr1 mutations in *Plasmodium falciparum* isolates by FRET and *in vivo* response to chloroquine among children from Osogbo, Nigeria. *Malaria Journal*, Apr; **6**: 41.

Olliaro, P., Mussano, P.. 2003. Amodiaquine for treating malaria. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, **2**: CD000016.

Paugam A; Belteau Anne-Laure; Camet-Dopouy J;Crezeut C; Friguet B (2003). Characterization and role of protozoan parasite proteasomes. *TRENDS in Parasitology* 19: 55-59.

Peters,W.. 1990. The prevention of antimalarial drug resistance. *Pharmacol.Therapy*. **47**:499-508.

Pickart C. M; Cohen R. E. (2004). Proteasome and their kin: proteases in machine age. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 5: 177-187.

Plowe, C.V., Djimde, A., Bouare, M., Doumbo, O., Wellems, T.E.. 1995. Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Jun; **52** (6): 565-568.

Plowe, C.V..2003. Monitoring antimalarial drug resistance: making the most of the tools at hand. *The Journal of Experimental Biology*; **206**: 3745-3756.

Polley, S.D., Chocejindachai, W., Conway, D.J..2003. Allele frequency based analysis robustly identify sites under balancing selection in a malaria vaccine candidate antigen. *Genetics*; **165**: 555-561.

Pologe, L.G., Ravetch, J.V..1988. Large deletions result from breakage and healing of *P.falciparum* chromosomes. *Cell*, Dec; **55**(5).869-874.

Robert, A., Benoit-Vical, F., Dechy-Cabaret, O., Meunier, B..2001. From classical antimalarial drugs to new compounds based on the mechanism of action of artemisinin. *Pure and Applied Chemistry*, **73**(7): 1173-1188.

Sarr, O., Myrick, A., Daily, J., Diop, B.M., Dieng, T., Ndir, O., Sow, P.S., Mboup, S., Wirth, D.F.. 2005. In vivo and in vitro analysis of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Senegal. *Parasitology Research*, Sep; **97** (2):136-140.

Schönfeld, M., Barreto, M.I, Schunk, M., Maduhu, I., Maboko, L., Hoelscher, M., Berens-Riha,N., Kitua, A., Löscher, T.. 2007. Molecular surveillance of drug-resistance associated mutations of *Plasmodium falciparum* in south-west Tanzania. *Malaria Journal*, Jan; **6**:2.

Sinnis, P., Wellems, T.E..1988. Long-range restriction maps of *Plasmodium falciparum* malaria to an ususal combination of antimalarial drugs. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, Jun; **96**(4): 417-418.

Slater, A.F., Swiggard, W.J., Orton, B.R., Flitter, W.D., Goldberg, D.E., Cerami, A., Henderson, G. B.. 1991. An iron-carboylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proc.Natl.Acad.Sci* .USA, **18**; **94**(4):1124-1129.

Su, X.-Z, Ferdig, M.T., Huang, Y. Huynh, C.Q., Liu, A., You, J., Wootton, J.C., Wellems, T.E. 1999. A genetic map and recombination parameters of the human malaria parasite *P.falciparum*. *Science*, **286**:1351-1353.

Suh, K. N., Kain, K.C., Keystone, J.S.. 2004. Malaria, *Canadian Medical Association or its licensors*, May; **170**(11): 1693-1700.

Sujashvili R..2008. Ubiquitin-26s proteasome system. New therapeutic implications, *Georgian Med News*, Jul-Aug; (**160-161**): 48-51

Tangpukdee, N., Krudsood, S., Srivilarit, S., Phophak, N., Chonsawat, P., Yanpanich, W., Kano, S., Wilairatana, P.. 2008. Gametocyte Clearance in Uncomplicated and Severe *Plasmodium falciparum* Malaria after Artesunate-Mefloquine Treatment in Thailand, *Korean J Parasitol.*, Jun; **46** (2): 65-70.

Tinto, H., Rwagacondob, C., Karemb, C., Mupfasonib, D., Vandoren, W., Rusanganwac, E., Erhardt, A., Overmeird, C.V., Marcke, E.V., D'Alessandro, U.. 2006. *In-vitro* susceptibility of *Plasmodium falciparum* to monodesethylamodiaquine, dihydroartemisinin and quinine in an area of high chloroquine resistance in Rwanda. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Jun; **100** (6): 509-514.

Triglia, T., Cowman, A.F.. 1994. Primary structure and expression of the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, Jul; **91** (15): 7149-7153.

Uhlemann, A.C., Cameron, A., Eckstein-Ludwig, U., Fischbarg, J., Iserovich, P., Zuniga, F.A., East, M., Lee, A., Brady, L., Haynes, R.K., Krishna, S.. 2005. A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinins. *Nature Structural and Molecular Biology*, Jun; **12** (7): 628-629.

Ursing, J., Kofoed, P.E., Rodrigues, A., Rombo, L., Gil, J.P.. 2007. *Plasmodium falciparum* genotypes associated with chloroquine and amodiaquine resistance in Guinea-Bissau. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, May; **76** (5): 844-848.

Vasconcelos, C.H., Novo, E.M.L.M., Donalisio, M.R.. 2006. Use of remote sensing to study the influence of environmental changes on malaria distribution in the Brazilian Amazon. *Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro*, Mar; **22** (3): 517-526.

Vieira, P.P., Alecrim, M.G., Silva, L.H., Gonzales-Jimenez, I., Zalis, M.G.. 2001. Analysis of the *Pfcr* K76T mutation in *Plasmodium falciparum* isolates from the Amazon region of the Brazil. *Journal of Infectious Diseases*, Jun; **183** (12): 1832-1833.

Vieira P.P., Ferreira, Mu, Alecrim, M.G., et al..2004. Polimorphism and the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* populations across the Amazon Basin. *J Infect Dis*; 190:417-24.

Vivas, L., Rattray, L., Stewart, L.B., Robinson, B.L., Fugmann, B., Haynes, R.K., Peters, W., Croft, S.L.. 2007. Antimalarial efficacy and drug interactions of the novel semisynthetic endoperoxide artemisone in vitro and in vivo. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Apr; **59** (4): 658-665.

Volkman, S.K., Lozovsky, E., Barry, A.E., Bedford, T., Bethke, L., Myrick, A., Day, K.P., Hartl, D.L., Wirth, D.F., Sawyer, S. A.. 2007. Genomic heterogeneity in the density of noncoding single-nucleotide and microsatellite polymorphisms in *Plasmodium falciparum*. *Gene*, **387**:1-6.

Volkman, S.K., Sabeti, P.C., DeCaprio, D., Neafsey, D.E., Schaffner, S.F., Milner, Jr, Sarr, O, Ndiya, D., Ndir, O., Mboup, S., Duraisingh, M.T., Lukens, A., Derr, A., Stange-Thomann, N., Waggoner, S., Onofrio, R., Ziaugra, R., Mauceli, E., Gnerre, S., Jaffe, D.B., Zainoun, J., Wiegand, R.C., Birren, B.W., Hartl, D.L., Galagan, J.E., Lander, E.S., Wirth, D.F..2007. A genome-wide map of diversity in *Plasmodium falciparum*. *Nat.Genet.*, Jan; **39**(1): 113-9.

Voutsadakis, I.A..2008. The ubiquitin-proteasome system in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta*, Jun; 19.

Wang, J., Maldonado, M..2006. The Ubiquitin-Proteasome System and its role in inflammatory and Autoimmune Diseases. *Cellular & Molecular Immunology*, Aug; 3(4): 255-61.

Wang X., Mu, J., *et al.*.2005. Decreased prevalence of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter 76T marker associated with cessation of chloroquine use against *P.falciparum* malaria in Hainan, People's Republic of China. *Am J Trop Med Hyg*; 72:410-4.

Whitby F. G; Xia G; Pickart C. M; Hill C. P (1998). Crystal structure of human ubiquitin-like protein NEDD8 and interactions with ubiquitin pathway enzymes. *The Journal Biology Chemistry* 273:34983-34991.

Whatley, B.R., Li, L, Chin S..2008. The ubiquitin-proteasome system in spongiform degenerative disorders, *Biochim Biophys Acta*, Aug; 23.

White, N.J., Olliaro, P. L.. 1996. Strategies for the prevention of antimalarial drug-resistance: rationale for combination chemotherapy for malaria. *Parasitol.Today* **12**:399-401.

White, N. J.. 1997. Assessment of the Pharmacodynamic Properties of Antimalarial Drugs in Vivo, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**:1413-1422.

White, N.J.. 1998. Why is it that antimalarial drug treatments do not always work? *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, Jun; **92** (4): 449-458.

White, N. J.. 1999. Delaying antimalarial drug resistance with combination chemotherapy. *Parassitologia* **41**(1-3), 301-8

White, N.J.. 2004. Antimalarial drug resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, Apr; **113** (4): 1084-1092.

White, N. J., Pongtavornpinyo, W.. 2003. The de novo selection drug-resistant malaria parasites, *Transactions of the Royal of Society of Trpoical Medicine and Hygiene*, Feb; **270**:545-554.

Wongsrichanalai, C., Pickard, A.L., Wernsdorfer, W.H., Meshnick, SR.. 2002. Epidemiological of drug-resistant malaria. *Lancet Infect. Dis.* **2**(4), 209-218.

World Health Organization. 2001a. Antimalarial drugs combination therapy. Report of a W.H.O. Technical Consultation WHO/CDS//RBM/2001.35. Geneva:WHO.

World Health Organization. 2001b. Drug Resistance in Malaria 2001. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.4.Geneva: WHO.

World Health Organization. 2005b. World Malaria Report 2005. WHO/HTM/MAL/2005.1102.Geneva:WHO.

World Health Organization. 2006a. WHO Guidelines for the Treatment of Malaria.HTM/MAL/2006.1108.Geneva:WHO.

World Health Organization. 2006b. WHO briefing on Malaria Treatment Guidelines and artemisinin monotherapies. Geneva:WHO.

World Health Organization. 2006c. WHO guidelines for the treatment of malaria. HTM/MAL/2006/.1108.Geneva: WHO.

Yang, H., Liu, D., Yang, Y., Fan, B., Yang, P., Li, X., Li, C., Dong, Y., Yang, C.. 2003.Changes in susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artesunate in vitro in Yunnan province, China. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*,Mar-Apr; **97** (2): 226–228.

Zakeri, S., Afshapard, M., Kazemzadeh, T., Mehdizadeh, K., Shabani, A., Djadid, N.D..2008. Association of *pfcr1* but not *pfmdr1* alleles with chloroquine resistance in Iranian isolates of *Plasmodium falciparum*. *Am. J.Trop. Med. Hyg.* Apr; **78**(4): 633-40.

VIII- ANEXOS

ANEXO 1:

Solução Tampão utilizada na corrida dos geis de electroforese:

Tampão TAE 1X: Tris HCL 10 Mm (pH 8.0), EDTA 0.1 mM (pH 8.0).

Aminoácidos e seus Símbolos

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