

ISABEL DINIS FERREIRA

**ESTUDOS DE SUSCEPTIBILIDADE À ARTEMISININA E
DERIVADOS EM *Plasmodium falciparum***

**INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

**LISBOA
2008**

ISABEL DINIS FERREIRA

Bolseira do Projecto EEC do 5º Programa Quadro, financiado pela União Europeia:
“RESMALSHIP – Development of a malaria resistance DNA chip as a public health
tool for the management of *Plasmodium falciparum* malaria drug resistance”
(QLK2-CT-2002-01503)

**ESTUDOS DE SUSCEPTIBILIDADE À ARTEMISININA E
DERIVADOS EM *Plasmodium falciparum***

Dissertação para obtenção do grau de Doutor
Ramo das Ciências Biomédicas
Especialidade Parasitologia
Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais LA/
Unidade de Investigação e Ensino de Malária/
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**LISBOA
2008**

Aos meus Pais, ao Pedro e às populações de
São Tomé e Príncipe, Ruanda e Tucuquí.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado no Centro de Malária e outras Doenças Tropicais LA (IHMT) e foi financiado pelo projecto: “RESMALSHIP – Development of a malaria resistance DNA chip as a public health tool for management of *Plasmodium falciparum* malaria drug resistance” (QLK2-CT-2002-01503). Para a sua realização, foi fundamental o apoio e colaboração de diversas pessoas, às quais desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

Ao Professor Doutor Pedro Lemos Cravo, Professor Auxiliar do Instituto de Higiene e Medicina Tropical e membro do CMDT LA, pela orientação deste trabalho bem como por todo o apoio e disponibilidade, os quais foram fundamentais para a sua realização.

Ao Professor Doutor Virgílio do Rosário, Professor Catedrático do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Director da UEI Malária e membro do CMDT LA, pelo apoio e disponibilidade que sempre demonstrou no estabelecimento de colaborações com outras instituições de forma a tornar possível a realização de algumas fases deste trabalho.

À Doutora Dinora Lopes, pelo apoio na parte técnica e pelo excelente trabalho de equipa realizado na República Democrática de São Tomé e Príncipe, fundamental para a minha iniciação no trabalho em campo.

À Doutora Fátima Nogueira, Mestre Catarina Alves e Joana Bom pelo apoio na parte técnica e disponibilidade sempre demonstrada.

À Dr.^a Conceição Ferreira e aos técnicos do Centro Nacional de Endemias da República Democrática de São Tomé e Príncipe, por todo o apoio dado durante o período de colheitas.

À Dr.^a Marinete Póvoa, Dr.^a Salma Oliveira, Dr. Ediclei do Carmo, José Maria Nascimento e José Mário do Instituto Evandro Chagas, Belém, Brasil, pela ajuda e apoio prestado no trabalho realizado em Belém e Tucuruí.

Aos Drs. Halidou Tinto e Umberto d'Alessandro do Institut de Recherche en Sciences de la Santé, Bobo Dioulasso, Burkina Faso e Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, Antwerpen, Belgium, respectivamente, pela cedência das amostras em papel de filtro, bem como os dados correspondentes das amostras do Ruanda.

À Prof. Doutora Aida Esteves e ao Prof. Doutor Henrique Silveira, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, pela disponibilidade enquanto elementos da comissão tutorial e pelas sugestões tão importantes para o desenvolvimento deste estudo.

A toda a equipa do CMDT, em especial, à Celeste Figueiredo e D. Encarnação Horta pelo apoio e disponibilidade sempre demonstrado.

Aos amigos pelo apoio a nível pessoal, o qual foi muito importante nesta etapa da minha vida.

Aos meus pais e irmão pelo apoio incondicional, a eles devo a realização de mais este objectivo.

Ao Pedro...

SUMÁRIO

A resistência do *Plasmodium falciparum* à maioria dos antimaláricos em uso é um dos maiores obstáculos ao controlo eficaz da doença. Excepcionalmente, a resistência *in vivo* à artemisinina e seus derivados não foi ainda detectada. Contudo, é amplamente aceite que existe um risco real de aparecimento de resistência a esta classe de antimaláricos. Deste modo, este trabalho teve como finalidade investigar diversos aspectos do fenótipo e genótipo do perfil de fármaco-susceptibilidade à artemisinina e seus derivados no parasita *Plasmodium falciparum*, recorrendo a populações naturais de parasitas e a um modelo de laboratório. Neste contexto, foi efectuado um estudo multicêntrico, onde se avaliou a susceptibilidade *in vitro* a derivados da artemisinina em populações naturais de *P. falciparum* provenientes do Ruanda, da República Democrática de São Tomé e Príncipe (RDSTP) e do Brasil e se investigou o perfil genotípico de determinados genes candidatos nas mesmas amostras. No laboratório, utilizou-se o clone *P. falciparum* Dd2 para seleccionar clones resistentes à artemisinina *in vitro*. Em todos os parasitas efectuaram-se estudos de associação entre os níveis de susceptibilidade à artemisinina e derivados e mutações ou alteração no número de cópias de genes previamente apontados como potenciais moduladores da resposta a esta classe de antimaláricos tais como os genes *pfCRT*, *pfMDR1*, *pfATPase6*, *pfCTP* e *pfubp-1*, bem como genes que codificam proteínas envolvidas nos mecanismos de defesa ao stress oxidativo, propostos no âmbito deste trabalho: *pfSOD1*, *pfGST*, *pfγGCS*, *pfGR*, *pfGPX*, *pfTRX1*, *pfTRX2* e *pfPRX*.

Os resultados obtidos para as populações naturais de *P. falciparum* Africanas e do Brasil em termos de susceptibilidade *in vitro* às artemisininas, parecem estar em conformidade com o descrito em outras áreas endémicas onde se observa que apesar de existir uma variação significativa na sua susceptibilidade, não existe evidência de resistência. No entanto, verificou-se existir uma correlação positiva entre as respostas aos derivados da artemisinina e a amodiaquina, antimalárico de diferente classe, o que indicia a existência de um fenótipo de tolerância cruzada entre compostos de classes diferentes.

Apesar de não ter sido detectada uma associação estatisticamente significativa entre a resposta dos isolados às artemisininas e os genes analisados, esta componente do

trabalho permitiu que se avaliasse a estrutura populacional do parasita *P. falciparum* em termos de fenótipo bem como do perfil de genes apontados como moduladores das respostas a estes fármacos antes da aplicação em larga escala dos mesmos. Estes dados constituem assim uma ferramenta singular de fármaco-vigilância, dado poderem ser utilizados em futuros ensaios como termo de comparação que permite avaliar a evolução das populações parasitárias em termos fenotípicos e genotípicos.

A selecção *in vitro* de clones resistentes à artemisinina partindo de progenitores sensíveis, *P. falciparum* Dd2, permitiu obter uma população de parasitas com susceptibilidade 100 vezes reduzida em relação ao seu progenitor, a qual se designou Dd2-ARTmut. No entanto, a resistência obtida demonstrou ser instável, tendo desaparecido na ausência de pressão de fármaco, dando origem a uma estirpe que se passou a denominar Dd2-ARTmutREV. A comparação entre os clones Dd2-ARTmut e o progenitor sensível Dd2 em relação a potenciais genes moduladores da susceptibilidade às artemisininas, revelou ter ocorrido amplificação do gene *pfmdr1*, bem como um aumento da sua expressão. Curiosamente, a amplificação do gene *pfmdr1* foi mantida após a reversão da resistência, na estirpe Dd2-ARTmutREV, levantando novas questões sobre o efeito causal desta amplificação na modulação das respostas à artemisinina e seus derivados.

ABSTRACT

Resistance of *Plasmodium falciparum* to most antimalarials in use is one of the major obstacles to gaining effective control of the disease. Exceptionally, *in vivo* resistance to artemisinin and its derivatives has not been detected as yet. However, it is widely accepted that there is a real risk that resistance emerges also to this class of drugs. To this purpose, the objective of this work was to investigate several aspects of the phenotype and genotype of responses to artemisinin and its derivatives in *Plasmodium falciparum*, making use of natural parasite populations and of an *in vitro* culture system. In this context, a multicentric study was conducted, where the *in vitro* susceptibility to artemisinin derivatives in natural populations of *P. falciparum* was inspected in samples from Rwanda, the Democratic Republic of Sao Tome and Principe (RDSTP) and Brazil, and the genotypic profile of certain candidate genes was also assessed in the same samples. In the laboratory, the *P. falciparum* clone Dd2 was used to select *in vitro* resistance to artemisinin. In all parasites, the association between the levels of susceptibility to artemisinins and mutations or changes in the number of copies of genes identified as potential modulators of the response to this class of antimalarials was investigated. The panel of genes included those previously reported by others, such as *pfprt*, *pfmdr1*, *pfATPase6*, *pfctcp* and *pfubp-1*, as well as genes that encode proteins involved in the mechanism of oxidative stress defense, proposed within the context of this work *pf sod1*, *pf gst*, *pf ygcs*, *pf gr*, *pf gpx*, *pf trx1*, *pf trx2* and *pf prx*.

The results obtained for the natural populations of *P. falciparum* from Africa and Brazil in terms of *in vitro* susceptibility to artemisinins, appear to be within the trends of other endemic areas and are consistent with the notion that, although natural parasite populations of *P. falciparum* vary significantly with respect to their susceptibility to this class of drugs, there is no evidence of resistance. However, a positive correlation was found between the responses to artemisinins and amodiaquine, a different class of antimalarial, which indicates the existence of a cross-resistance phenotype between different classes of compounds.

Although a statistically significant association between the response to the artemisinins and the genes analyzed was not detected, this component of the work allowed to gain insights into the population structure of *P. falciparum* parasite in terms of phenotype

and genetic profile of potential modulators of the responses to these drugs before their large scale deployment. These data are therefore a unique tool for drug-surveillance since they can be used in future trials as a benchmark that can help evaluate evolution in terms genotypic and phenotypic of parasitic populations.

The *in vitro* selection of artemisinin-resistant parasites from sensitive progenitors, *P. falciparum* Dd2, gave rise to a parasite strain with 100-fold reduced susceptibility in relation to its progenitor, which was named Dd2-ARTmut. However, resistance proved to be unstable, disappearing in the absence of drug pressure, resulting in a strain that was renamed Dd2-ARTmutREV. Comparison between Dd2-ARTmut and sensitive progenitor Dd2 in relation to putative modulators of susceptibility to artemisinin proved that amplification of the gene *pfmdr1* has occurred, as well as an increase in its expression. Interestingly, this amplification of the *pfmdr1* gene was maintained after resistance reversion in the strain Dd2-ARTmutREV, raising new questions about the causal effect of this amplification in the modulation of responses to the artemisinins.

LISTA DE ABREVIATURAS

Δ - Variação ou diferença

μg - Micrograma

μl - Microlitro

A - Adenina

aa - Aminoácido

ACR - *Adequate Clinical Response*

AMD – Amodiaquina

ARMD - *Accelerated Resistance to Multiple Drugs*

ARS - Artesunato

ART - Artemisinina

ATM - Artemeter

ATP - Adenosina trifosfato

C - Citosina

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

CMDT - Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais

CO₂ - Dióxido de carbono

CQ - Cloroquina

CSP - *Circumsporozoite protein*

Ct - *Threshold cycle* (ciclo onde ocorre um aumento significativo da fluorescência emitida)

DEPC - Dietilpirocarbonato

DHA - Dihidroartemisinina

DHFR - Dihidrofolato reductase

DHPS - Dihidropteroato sintetase

DMSO - Dimetilsulfoxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNase - Deoxiribonuclease I

dNTP - 3'-deoxinucleósido-5'-trifosfato

DP - Desvio padrão

E - Eficiência

EDTA - Ácido etileno diamino tetra acético

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ETF - *Early treatment failure*

G - Guanina

γ-GCS - γ -glutamyl-cisteinil sintetase

GPx - Glutaciona peroxidase

GR - Glutaciona redutase

GS - Glutaciona sintetase

GSH - Glutaciona

GSSG - Dissulfito de glutaciona

GST - Glutaciona S-transferase

HEPES - Ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N-2-etanosulfónico

H₂O₂ - Peróxido de hidrogénio

HRP2 - *Histidine rich protein II*

IC 95% - Intervalo de confiança a 95%

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

IC90 - Concentração que inibe o crescimento de 90% dos parasitas

IC99 - Concentração que inibe o crescimento de 99% dos parasitas

IHMT - Instituto de Higiene e Medicina Tropical

I.P.C.C. - *Intergovernmental Panel on Climate Change*

KDa - Kilo dalton

Log - Logaritmo base 10

LTF - *Late treatment failure*

m - Declive da recta

mg - Miligrama

ml - Mililitro

MIC - Concentração Mínima Inibitória

MNNG - N` metil-N`-nitro-N`-nitrosoguanidina

MQ - Mefloquina

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

MSP1 - *Merozoite surface protein-1*

MSP2 - *Merozoite surface protein-2*

N - Número

NADP - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida

ng - Nanograma
nM - Nanomolar
NR - Produto não restringido
O.M.S. - Organização Mundial de Saúde
P - valor da significância estatística
pbs - Pares de bases
PBS - *Phosphate buffered saline*
PCR - Reacção de polimerização em cadeia (*Polymerase Chain Reaction*)
PfATPase6 - Proteína *Plasmodium falciparum calcium-transporting ATPase*
pfATPase6 - *Plasmodium falciparum calcium-transporting ATPase gene*
pf β actin1 - *Plasmodium falciparum beta actin 1 gene*
pfprt - *Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter gene*
PFCRT - Proteína *Plasmodium falciparum Chloroquine resistance transporter*
pfygc - *Plasmodium falciparum gamma-glutamylcysteine synthetase gene*
pfgr - *Plasmodium falciparum glutathione reductase gene*
pfgpx - *Plasmodium falciparum glutathione peroxidase gene*
pfgst - *Plasmodium falciparum glutathione S-transferase gene*
pfmdr1 - *Plasmodium falciparum multidrug resistance 1 gene*
pfprx - *Plasmodium falciparum peroxiredoxin gene*
pfpsod1 - *Plasmodium falciparum fe-superoxide dismutase gene*
pfctcp - *Plasmodium falciparum histamine-releasing factor putative gene*
pftrx1 - *Plasmodium falciparum trx peroxidase gene*
pftrx2 - *Plasmodium falciparum thioredoxin peroxidase gene*
pfubp-1 - *Plasmodium falciparum ubiquitin -specific protease gene*
Pfubp-1 - Proteína *Plasmodium falciparum ubiquitin-specific protease*
Pgh1 - P glicoproteína 1
PRX - Peroxiredoxina
p/v - Peso/ volume
QUIN - Quinino
R - Resistente
r - Spearman's rank-order correlation coefficient
RBC - *Red blod cells*
RDSTP - República Democrática de São Tomé e Príncipe
RESA - *Ring-infected erythrocyte surface antigen*

RFLP - *Restriction fragment length polymorphism*

Rn - Sinal de fluorescência do produto amplificado em qualquer momento da reacção

RNA - Ácido ribonucleico

ROS – Espécies reactivas de oxigénio

r.p.m. - Rotações por minuto

RPMIinc - Meio de cultura incompleto

rRNA - Ácido ribonucleico ribossómico

RT-PCR - *Reverse transcriptase – polymerase chain reaction*

S - Sensível

SERCA - Enzima retículo sarco/endoplasmático Ca²⁺ ATPase

SNP - *single nucleotide polymorfisme*

SOD1 - Fe-superóxido dismutase

SP - Sulfadoxina-Pirimetamina

T - Timina

TBE - Tampão constituído por Tris, ácido bórico e EDTA

TCTP - *Translationally controlled tumor protein*

TE - Tampão de eluição constituído por Tris EDTA

Tm - Temperatura de *melting*

TRIS - Tris (hidroximetil) aminometano

tRNA - Ácido ribonucleico de transferência

TRX1 – Trx peroxidase (2-Cys peroxiredoxina)

TRX2 - Tioredoxina peroxidase

Trx-(SH)₂ - Tioredoxina reduzida

Trx-S₂ - Tioredoxina oxidada

U - Unidades

UEI - Unidade de Ensino e Investigação

UNL - Universidade Nova de Lisboa

UV - Ultra violeta

V - Volt

v/v - Volume/ volume

W. H. O. - *World Health Organization*

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	I
Sumário	III
Abstract	V
Lista de abreviaturas	VII
Índice Geral	XI
Índice de Figuras	XIX
Índice de Tabelas	XXI
I – INTRODUÇÃO	1
I.1 – Malária – Dados gerais de biologia e epidemiologia	3
I.2 – <i>Plasmodium spp</i>	5
I.2.1 – Ciclo de vida	5
I.2.2 – Genética do <i>Plasmodium</i>	6
I.2.3 – Mecanismos de defesa antioxidante na fase eritrocitária	8
I.2.3.1 – Superóxido dismutases	9
I.2.3.2 – Destoxificação via glutathiona	9
I.2.3.3 – Destoxificação via tioredoxina	10
I.3 – Estratégias de controlo da malária	11
I.3.1 – Controlo do vector	11
I.3.2 – Antimaláricos	12
I.4 – Resistência aos antimaláricos	15
I.4.1. – Definição de resistência	16
I.4.2 – Monitorização da resistência	17
I.4.2.1 – Método <i>in vivo</i>	17
I.4.2.2 – Métodos <i>in vitro</i>	18
I.4.2.3 – Marcadores moleculares de resistência	19
I.4.3 – Distribuição geográfica da resistência aos antimaláricos	21
I.4.4 – Multi-resistência	22
I.4.5 – Mecanismo de acção e resistência dos principais antimaláricos	23
I.4.5.1 – Cloroquina	23
I.4.5.2 – Quinino	26

I.4.5.3 – Mefloquina	27
I.4.5.4 – Amodiaquina	28
I.4.5.5 – Sulfadoxina-Pirimetamina	29
I.5 – Artemisinina e derivados	30
I.5.1 – Mecanismo de acção	32
I.5.2 – Mecanismo de resistência	33
I.5.2.1 – Evidências de estudos em <i>Plasmodium spp</i>	33
I.5.2.1.1 – Gene <i>pfcr1</i>	33
I.5.2.1.2 – Gene <i>pfmdr1</i>	33
I.5.2.1.3 – Gene <i>pftctp</i>	34
I.5.2.1.4 – Gene <i>pfATPase6</i>	35
I.5.2.1.5 – Gene <i>pfubp-1</i>	35
I.5.2.2 – Evidências de estudos em outros sistemas biológicos	36
I.5.3 – Resistência à artemisinina em laboratório	37
I.5.4 – Resistência à artemisinina em populações naturais de <i>P. falciparum</i>	37
I.5.4.1 – Ruanda	39
I.5.4.2 – República Democrática de São Tomé e Príncipe	41
I.5.4.3 – Brasil, Estado do Pará	42
I.5.5 – Identificação de mecanismos de resistência à artemisinina: importância e estratégias	44
I.6 – Objectivos	46
II – MATERIAL E MÉTODOS	47
II.1 – Definições	49
II.2 – Material biológico e antimaláricos	54
II.2.1 – Clones de referência de <i>Plasmodium falciparum</i>	54
II.2.2 – Isolados de <i>Plasmodium falciparum</i>	54
II.2.3 – Antimaláricos	54
II.3 – Análise genética	55
II.3.1 – Genes analisados	55
II.3.2 – Extracção de DNA	56
II.3.3 – Extracção de RNA total	56
II.3.3.1 – Verificação da integridade do RNA	56
II.3.4 – Síntese de cDNA	57

II.3.4.1 – Tratamento do RNA total com <i>DNaseI</i>	57
II.3.4.2 – Transcrição reversa	57
II.3.5 – Desenho de <i>primers</i>	58
II.3.6 – Sequenciação de DNA	59
II.3.7 – PCR – <i>Polymerase Chain Reaction</i>	59
II.3.8 – Identificação dos polimorfismos genéticos por RFLP	60
II.3.9 – Electroforese em gel de agarose	62
II.3.10 – Análise estatística	62
II.3.11 – Predição da topologia membranar da proteína PfATPase6 e dos seus domínios funcionais	63
II.3.12 – PCR em tempo real	63
II.3.12.1 – Condições do PCR em tempo real	63
II.3.12.2 – <i>Primers</i>	64
II.3.12.3 – Método $2^{-\Delta\Delta Ct}$	64
II.3.12.3.1 – Validação do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$	65
II.3.12.3.1.1 – Cálculo das eficiências das reacções de amplificação	65
II.3.12.3.1.2 – Comparação das eficiências das reacções de amplificação do gene alvo e do gene normalizador	66
II.3.12.4 – Validação dos ensaios de avaliação do nº de cópias	66
II.4 – Estudos de avaliação da susceptibilidade <i>in vitro</i> aos derivados da artemisinina e amodiaquina em populações naturais de <i>P. falciparum</i>	67
II.4.1 – Descrição dos locais de colheita	67
II.4.1.1 – Ruanda	67
II.4.1.2 – República Democrática de São Tomé e Príncipe	67
II.4.1.3 – Brasil, Estado do Pará	68
II.4.2 – Selecção dos isolados	68
II.4.3 – Colheita dos isolados	69
II.4.4 – Preparação das soluções de trabalho dos antimaláricos	69
II.4.5 – Método do microteste da O.M.S. (W.H.O., 1997)	70
II.4.6 – Análise estatística	71

II.5 – Selecção <i>in vitro</i> de parasitas de <i>P. falciparum</i> resistentes à artemisinina	72
II.5.1 – Manutenção de clones de <i>P. falciparum</i> em cultura <i>in vitro</i>	72
II.5.2 – Cálculo da parasitémia	72
II.5.3 – Crioconservação de clones de <i>P. falciparum</i> em azoto líquido	73
II.5.4 – Descongelação de clones de <i>P. falciparum</i> crioconservados	73
II.5.5 – Sincronização de culturas <i>in vitro</i> de <i>P. falciparum</i> com sorbitol	74
II.5.6 – Protocolo de mutagenização	74
II.5.7 – Tratamento da cultura com artemisinina	75
II.5.8 – Clonagem por diluição limite	75
III – RESULTADOS	77
III.1 – Desenvolvimento, optimização e validação dos métodos de análise genética	79
III.1.1 – Pesquisa de polimorfismos genéticos: resultados gerais sobre optimização das técnicas de RFLP e procura de polimorfismos genéticos <i>de novo</i>	79
III.1.1.1 – Gene <i>pfmdr1</i>	80
III.1.1.2 – Gene <i>pfert</i>	82
III.1.1.3 – Gene <i>pfATPase6</i>	84
III.1.1.4 – Gene <i>pfubp-1</i>	86
III.1.1.5 – Gene <i>pfsod1</i>	86
III.1.1.6 – Gene <i>pfygc5</i>	87
III.1.1.7 – Genes <i>pfctcp</i> , <i>pfgst</i> , <i>pftrx1</i> , <i>pftrx2</i> e <i>pfprx</i>	87
III.1.2 – PCR em tempo real	88
III.1.2.1 – <i>Primers</i>	88
III.1.2.2 – Resultados da validação do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$	88
III.1.2.2.1 – Eficiências das reacções de amplificação	89
III.1.2.2.2 – Eficiências relativas	91
III.1.2.3 – Estimativa do número de cópias do gene <i>pfmdr1</i> como controlo auxiliar de validação	92

III.2 – Estudo multicêntrico de avaliação da susceptibilidade <i>in vitro</i> aos derivados da artemisinina e estudo genético <i>multilocus</i> em populações naturais de <i>P. falciparum</i> de África e América do Sul	94
III.2.1 – Selecção e colheita dos isolados: dados gerais	94
III.2.2 – Avaliação da susceptibilidade <i>in vitro</i> e análise genética <i>multilocus</i>	95
III.2.2.1 – Actividade <i>in vitro</i> dos antimaláricos testados	96
III.2.2.2 – Correlação entre os perfis de susceptibilidade <i>in vitro</i> dos antimaláricos	98
III.2.2.3 – Pesquisa de polimorfismos genéticos e sua prevalência	100
III.2.2.3.1 – Gene <i>pfmdr1</i>	101
III.2.2.3.2 – Gene <i>pfcr1</i>	103
III.2.2.3.3 – Gene <i>pfATPase6</i>	104
III.2.2.3.3.1 – Localização das mutações descritas em termos de topologia membranar predita da proteína PfATPase6 e seus domínios funcionais	105
III.2.2.3.4 – Gene <i>pfubp-1</i>	108
III.2.2.3.5 – Gene <i>pfsod1</i>	109
III.2.2.3.6 – Gene <i>pfygc5</i>	110
III.2.2.3.7 – Genes <i>pfctcp</i> , <i>pfgst</i> , <i>pftrx1</i> e <i>pftrx2</i>	112
III.2.2.4 – Correlação dos polimorfismos genéticos com a eficácia <i>in vitro</i> dos antimaláricos testados	112
III.2.2.5 – Estimativa do nº de cópias dos genes em estudo	114
III.3 – Selecção <i>in vitro</i> de parasitas de <i>P. falciparum</i> resistentes à artemisinina e sua análise genotípica	116
III.3.1 – Protocolo de selecção	116
III.3.2 – Resultados do processo de selecção	117
III.3.3 – Clonagem	119
III.3.4 – Investigação da estabilidade do fenótipo de resistência na estirpe <i>P. falciparum</i> Dd2-ARTmut	119
III.3.5 – Caracterização do perfil genotípico da estirpe <i>P. falciparum</i> Dd2-ARTmut	120
III.3.5.1 – Pesquisa de polimorfismos	120

III.3.5.2 – Estimativa do nº de cópias dos genes <i>pfATPase6</i> e <i>pfmdr1</i>	122
III.3.5.3 – Resultados dos níveis de expressão do gene <i>pfmdr1</i>	123
IV – DISCUSSÃO	125
IV.1 – Estudo multicêntrico de avaliação da susceptibilidade <i>in vitro</i> aos derivados da artemisinina e estudo genético <i>multilocus</i> em populações naturais de <i>P. falciparum</i> de África e América do Sul	128
IV.1.1 – Susceptibilidade <i>in vitro</i> relativamente à amodiaquina	130
IV.1.2 – Susceptibilidade <i>in vitro</i> relativamente aos derivados da artemisinina	131
IV.1.3 – Correlação das susceptibilidades <i>in vitro</i> entre os antimaláricos testados	133
IV.1.4 – Análise do perfil genotípico das amostras colhidas nas diferentes áreas endémicas	134
IV.1.4.1 – Genes codificantes de transportadores membranares: <i>pfmdr1</i> e <i>pfert</i>	134
IV.1.4.2 – Gene <i>pfATPase6</i>	138
IV.1.4.3 – Gene <i>pfubp-1</i>	140
IV.1.4.4 – Gene <i>pftctp</i>	141
IV.1.4.5 – Genes envolvidos na defesa do <i>stress</i> oxidativo	142
IV.2 – Selecção <i>in vitro</i> de parasitas de <i>P. falciparum</i> resistentes à artemisinina e sua análise genotípica	144
IV.3 – Considerações Finais	148
V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149
VI – ANEXOS	183
Anexo 1	185
Anexo 2	187
Anexo 3	189
Anexo 4	191
Anexo 5	193
Anexo 6	195
Anexo 7	197

Anexo 8	199
Anexo 9	201
Anexo 10	203
Anexo 11	205
Anexo 12	207
VII – PUBLICAÇÕES	209

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa da distribuição geográfica da malária.	4
Figura 2 – Ciclo de vida do <i>Plasmodium spp.</i>	6
Figura 3 – Esquema resumido do mecanismo de combate ao <i>stress</i> oxidativo em <i>Plasmodium</i> .	10
Figura 4 – Mapa da distribuição geográfica da resistência de <i>P. falciparum</i> aos antimaláricos.	22
Figura 5 – Estrutura química da artemisinina e seus derivados.	31
Figura 6 – Mapa do Ruanda.	39
Figura 7 – Mapa da RDSTP.	41
Figura 8 – Mapa do Estado do Pará, Brasil.	42
Figura 9 – a) Esquema exemplificando uma placa de microtestes de dois isolados (1 e 2) para três antimaláricos em estudo; b) Lâmina correspondente ao microteste relativo ao artesunato, do isolado 1.	71
Figura 10 – Esquema exemplificativo de uma placa de clonagem indicando o número de parasitas inoculados por poço.	76
Figura 11 – Esquema representativo do gene <i>pfmdr1</i> e das sequências polimórficas inspeccionadas.	81
Figura 12 – Géis de agarose (3%) com resultados típicos de PCR-RFLP para identificação de polimorfismos no gene <i>pfmdr1</i> .	81
Figura 13 – Esquema representativo do gene <i>pfprt</i> e das sequências polimórficas inspeccionadas.	83
Figura 14 – Géis de agarose (3%) com resultados típicos para identificação de polimorfismos no gene <i>pfprt</i> .	83
Figura 15 – Esquema representativo do gene <i>pfATPase6</i> e das sequências polimórficas inspeccionadas.	85
Figura 16 – Géis de agarose (3%) com resultados típicos de PCR-RFLP para identificação de polimorfismos no gene <i>pfATPase6</i> .	85
Figura 17 – Esquema representativo do gene <i>pfubp-1</i> .	86
Figura 18 – Esquema representativo do gene <i>pfsod1</i> e da sequência polimórfica inspeccionada.	86
Figura 19 – Gel de agarose (3%) com resultado típico de PCR-RFLP para identificação do polimorfismo D84G.	86

Figura 20 – Esquema representativo do gene <i>pfygcS</i> .	87
Figura 21 – Gel de agarose (3%) exemplificando um resultado da pesquisa do polimorfismo de tamanho do gene <i>pfygcS</i> .	87
Figura 22 – Exemplo do cálculo dos <i>Cts</i> para as várias diluições seriadas de DNA.	89
Figura 23 – Cálculo da eficiência (E) da reacção do gene <i>pfmdr1</i> .	90
Figura 24 – Comparação das eficiências de reacção de amplificação do gene <i>pfmdr1</i> e do gene <i>pfβactinaI</i> (gene normalizador).	91
Figura 25 – Resultado típico da estimativa do nº de cópias do <i>pfmdr1</i> no clone Dd2 relativamente ao clone 3D7.	93
Figura 26 – Distribuição dos IC50s (nM) relativos aos fármacos em estudo.	97
Figura 27 – Gráficos de correlação entre as respostas <i>in vitro</i> dos antimaláricos testados nas áreas em estudo.	99
Figura 28 – Prevalência dos SNPs analisados no gene <i>pfmdr1</i> .	102
Figura 29 – Prevalência dos SNPs analisados no gene <i>pfcrT</i> .	103
Figura 30 – Prevalência dos SNPs analisados por PCR-RFLP no gene <i>pfATPase6</i> .	105
Figura 31 – Topologia membranar predita da proteína PfATPase6.	107
Figura 32 – Disposição dos domínios funcionais da proteína PfATPase6.	107
Figura 33 – Prevalência do SNP analisado no gene <i>pfSod1</i> .	110
Figura 34 – Sequências traduzidas da região polimórfica do gene <i>pfygcS</i> em algumas amostras da RDSTP, exemplificando inserções repetidas da sequência YQSNLQQQ na proteína predita.	111
Figura 35 – Prevalência do polimorfismo de tamanho do gene <i>pfygcS</i> nos isolados das três áreas endémicas estudadas.	112
Figura 36 – Esquema do protocolo de selecção realizado.	117
Figura 37 – Processo de selecção.	118
Figura 38 – Géis de agarose (2%) com resultados das amplificações dos fragmentos para sequenciação dos genes <i>pfATPase6</i> (A), <i>pfubp-1</i> (B) e <i>pfcrT</i> (C).	121
Figura 39 – Nº de cópias do gene <i>pfmdr1</i> na estirpe Dd2-ARTmut relativamente ao clone progenitor Dd2 e ao clone 3D7.	123
Figura 40 – Expressão do gene <i>pfmdr1</i> na estirpe Dd2-ARTmut relativamente ao clone progenitor Dd2 e ao clone 3D7.	124

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Medidas de controlo do vector.	12
Tabela 2 – Antimaláricos classificados de acordo com: a estrutura química, o principal mecanismo de acção e a fase do ciclo em que actuam.	14
Tabela 3 – Resistência do <i>P. falciparum</i> aos antimaláricos.	16
Tabela 4 – Aminoácidos e seus símbolos.	53
Tabela 5 – Clones de referência <i>P. falciparum</i> .	54
Tabela 6 – Genes analisados.	55
Tabela 7 – Informações acerca dos PCR-RFLP para detecção dos SNPs.	61
Tabela 8 – Período decorrido desde a última toma de antimalárico.	69
Tabela 9 – Concentrações de antimalárico utilizadas nos testes de avaliação da susceptibilidade <i>in vitro</i> a antimaláricos.	70
Tabela 10 – Eficiências de reacção para os genes em estudo.	90
Tabela 11 – Valores de $ m $ para os genes em estudo.	92
Tabela 12 – Resultados da avaliação da robustez do método de validação.	92
Tabela 13 – Número de isolados seleccionados, colhidos e fenotipados por área endémica.	95
Tabela 14 – Actividade <i>in vitro</i> dos isolados das áreas endémicas estudadas.	98
Tabela 15 – Correlação entre as respostas <i>in vitro</i> dos antimaláricos testados nas áreas em estudo.	99
Tabela 16 – Número de amostras analisadas por área endémica.	100
Tabela 17 -SNPs do gene <i>pfATPase6</i> analisados por sequenciação e polimorfismo de tamanho do gene <i>pfubp-1</i> .	109
Tabela 18 – Valores de <i>P</i> , significância estatística da correlação entre os diferentes SNPs e a susceptibilidade aos antimaláricos.	113
Tabela 19 – N° estimado de cópias dos genes em análise.	115
Tabela 20 – Resultados da análise dos SNPs.	121
Tabela 21 – N ° de cópias dos genes <i>pfmdr1</i> e <i>pfATPase6</i> , no clone Dd2, Dd2-ARTmut e Dd2-ARTmutREV, relativamente ao clone 3D7.	122
Tabela 22 – Expressão do gene <i>pfmdr1</i> relativamente ao clone 3D7.	124

I – INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

I.1 – MALÁRIA – DADOS GERAIS DE BIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA

A malária ou paludismo é uma doença parasitária causada por protozoários do género *Plasmodium*, transmitida por mosquitos do género *Anopheles*. Estes parasitas pertencem ao Reino Protista, Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea, Ordem Hemosporidiida, Família Plasmodiidae e Género *Plasmodium*. Existem quatro espécies que infectam humanos: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium falciparum*, sendo a última a mais patogénica.

Os primeiros sintomas de malária ocorrem geralmente entre 9 e 14 dias depois de um mosquito inocular o parasita no hospedeiro. A malária caracteriza-se inicialmente por sintomas inespecíficos, tais como dores de cabeça, fadiga, febre, anorexia e náuseas, confundindo-se frequentemente com a sintomatologia da gripe (W. H. O., 2006c). A condição *sine qua non* para o diagnóstico de malária é a ocorrência de arrepios e tremores, seguidos de febre, os quais duram entre 2 e 3 dias (W. H. O., 2006c). Os sintomas subsequentes e os padrões que a doença apresenta variam para cada tipo de paludismo, consistindo em febre superior a 40°C, cefaleia intensa, vertigens, delírio e confusão (W. H. O., 2006c). No paludismo por *P. falciparum* pode verificar-se uma alteração da função cerebral, complicação denominada malária cerebral e pode também ocorrer morte por anemia ou insuficiência renal. A malária é curável em apenas 48 horas, mas pode evoluir rapidamente, podendo ser fatal se o diagnóstico e tratamento não forem atempados (W. H. O., 2006c). A malária causada por outras espécies de *Plasmodium* resulta em debilitação crónica e, mais raramente, em morte (W. H. O., 2006c).

A malária continua a ser uma das maiores ameaças para a saúde pública e desenvolvimento económico das regiões tropicais e subtropicais do mundo. Aproximadamente 40% da população mundial vive em áreas onde a doença é transmitida afectando 350 a 500 milhões de pessoas e causando a morte de mais de um milhão de pessoas anualmente. O risco de malária grave ou fatal é maior em crianças abaixo dos 5 anos, mulheres grávidas e pessoas não imunes que viajam para áreas onde existe transmissão (W. H. O., 2005b). A taxa de mortalidade atribuída à malária está a aumentar, especialmente na África sub-Sahariana e existe evidência que o parasita está a reemergir em áreas onde a malária já foi controlada ou erradicada (W. H. O., 2005b).

INTRODUÇÃO

A malária encontra-se distribuída nas áreas onde se reúnem as condições ideais para a existência do mosquito vector e consequente transmissão da doença, ou seja nas regiões tropicais e subtropicais, nomeadamente África sub-Sahariana, América Central e do Sul, Sudeste Asiático e Oceânia (Figura 1). A distribuição 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. A segunda espécie mais comum, o *P. vivax*, raramente fatal, é frequente na Ásia, em zonas da América e no Norte de África.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, 107 países e territórios possuem áreas de risco de transmissão de malária, sendo que 3200 milhões de pessoas vivem em áreas onde existe risco de transmissão. Aproximadamente 59% dos casos de malária ocorrem em África, 38% na Ásia e 3% na América (W. H. O., 2005b). Em face do fenómeno do aquecimento global e o aumento das migrações humanas, a malária é hoje considerada uma doença com possibilidade de reemergir em áreas de onde já foi erradicada ou onde é controlada (I.P.C.C., 2007; MacPherson *et al.*, 2007).

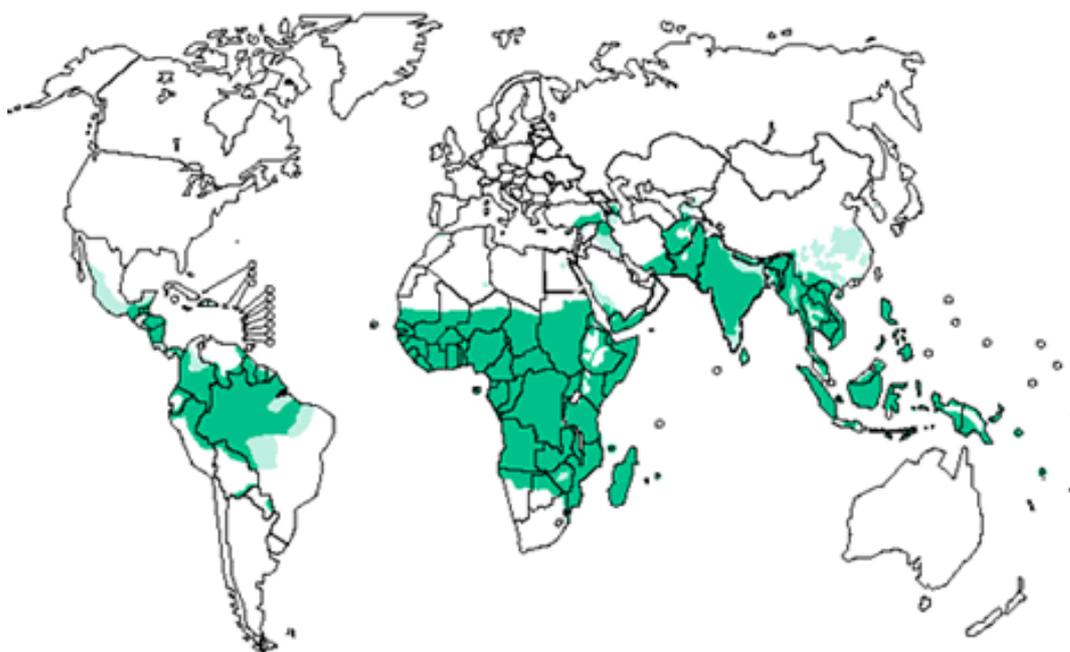


Figura 1 – Mapa da distribuição geográfica da malária (adaptado de W. H. O., 2005b), ○ - Áreas sem malária; ● - Áreas onde ocorre transmissão de malária; ◐ - Áreas com risco limitado de transmissão de malária.

I.2 – *Plasmodium spp*

I.2.1 – Ciclo de vida

O ciclo de vida do *Plasmodium spp* (Figura 2) é constituído por uma fase sexuada exógena (esporogónica), durante a qual ocorre a multiplicação dos parasitas nos mosquitos do género *Anopheles* (hospedeiro definitivo) e uma fase assexuada endógena (esquizogónica), onde ocorre a multiplicação no Humano (hospedeiro intermediário); esta fase ocorre em células parenquimatosas do fígado (esquizogonia hepática) ou nos eritrócitos (esquizogonia eritrocitária).

A infecção inicia-se durante a refeição sanguínea do mosquito fêmea infectado quando este inocula, juntamente com a saliva, esporozoítos na corrente sanguínea ①. Os esporozoítos invadem os hepatócitos ②, onde crescem e se multiplicam, diferenciando-se em esquizontes hepáticos ③. A esta fase chama-se esquizogonia hepática **A**; a sua duração depende da espécie de *Plasmodium*. No ciclo de vida do *P. vivax* e do *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, denominando-se a estes casos tardios de sintomatologia, relapsos. No ciclo do *P. falciparum* e do *P. malariae*, 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 ④ com consequente invasão dos eritrócitos. Após esta invasão ⑤, inicia-se a esquizogonia eritrocitária **B**, na qual os merozoítos se diferenciam em trofozoítos e estes por divisões sucessivas dão origem aos esquizontes eritrocitários. Após lise do eritrócito parasitado, são libertados novos merozoítos na corrente sanguínea ⑥, com invasão cíclica de novos eritrócitos e sintomatologia febril associada à referida lise celular. Alguns merozoítos, após invasão dos eritrócitos, não evoluem para esquizontes, mas diferenciam-se nas formas sexuadas do parasita ⑦, os gametócitos feminino e masculino. Estes, em fase de maturação, se e quando ingeridos pela fêmea do mosquito durante a refeição sanguínea ⑧, desenvolvem-se no seu estômago, dando origem, a macrogâmetas e microgâmetas (4 a 8 microgâmetas flagelados) que após fertilização dão início ao ciclo esporogónico **C**. O zigoto formado ⑨ evolui para oocineto ⑩ móvel, que invade o espaço entre as células epiteliais da parede do estômago do mosquito, fixando-se e originando o oocisto ⑪. Aqui, por

INTRODUÇÃO

mitoses sucessivas, resultam inúmeros parasitas individuais e alongados denominados esporozoítos ¹², que após um período de maturação e por ruptura do oocisto, invadem a cavidade corporal do mosquito e migram para as suas glândulas salivares, acumulando-se nos ductos salivares e tornando-se infectantes. Quando o mosquito infectado faz nova refeição sanguínea ¹, os esporozoítos são inoculados e começa uma nova infecção no hospedeiro vertebrado.

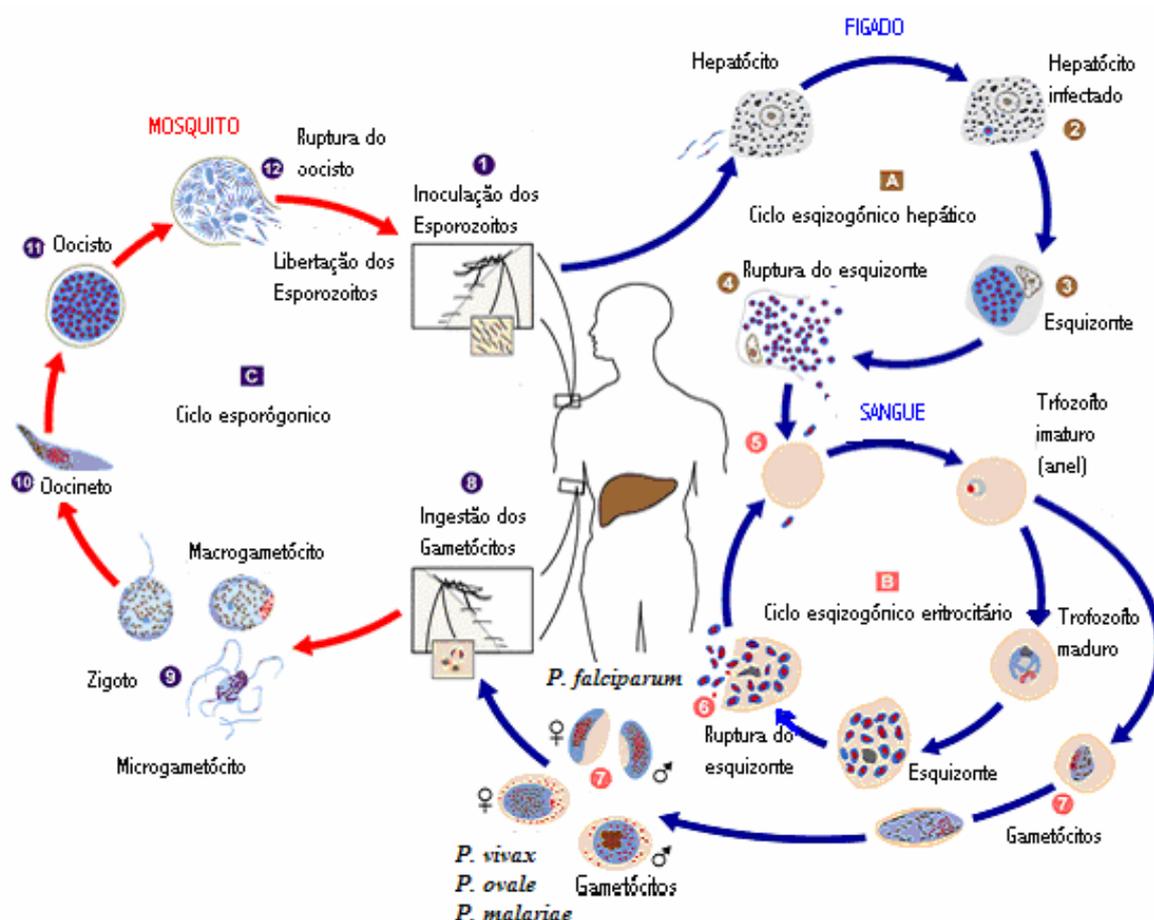


Figura 2 – Ciclo de vida do *Plasmodium* spp (adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>).

I.2.2 – Genética do *Plasmodium*

Durante o ciclo eritrocitário, hepático, esporogônico e microgametogênese onde ocorrem divisões mitóticas, o *Plasmodium* é um organismo haplóide, sendo o oocineto a única fase do seu ciclo de vida em que é diplóide (Sinden *et al.*, 1985).

INTRODUÇÃO

O material genético do *Plasmodium* encontra-se organizado em três genomas (Wilson *et al.*, 1991): 1) genoma mitocondrial, com 6kb, contém os genes que codificam as proteínas de enzimas responsáveis pelo transporte de electrões; 2) genoma circular plasmídico, com 35kb, contém os genes que codificam principalmente rRNA, tRNA e proteínas ribossomais; e 3) genoma nuclear, que comporta a maioria dos genes, alguns deles envolvidos na resistência a antimaláricos. O genoma nuclear haplóide é composto por 22,8 Mb, sendo a composição em A+T de aproximadamente 80,6%. O genoma compreende cerca de 5300 genes distribuídos por 14 cromossomas (Gardner *et al.*, 2002). Os cromossomas dos parasitas da malária são divididos em duas zonas: um domínio central que contém as regiões codificantes conservadas e as extremidades que são regiões polimórficas (Lanzer *et al.*, 1994). Cada extremidade consiste em regiões teloméricas e subteloméricas, sendo nestas últimas que se encontram os genes envolvidos nas variações antigénicas e onde ocorrem a maioria das variações de tamanho (Gardner *et al.*, 2002).

Os polimorfismos de tamanho nos cromossomas que são observados entre populações parasitárias da mesma espécie, podem ser devidas a re-arranjos dos cromossomas (Frontali *et al.*, 1991), recombinação génica durante a meiose (Sinnis & Wellems, 1988; Corcoran *et al.*, 1988), amplificação génica (Foote *et al.*, 1989; Triglia *et al.*, 1991) e deleções ou inserções de sequências de DNA telomérico e subtelomérico (Corcoran *et al.*, 1986; Pologe & Ravetch, 1988).

A recombinação genética ocorre a taxas bastante elevadas em populações naturais de *P. falciparum* (Conway *et al.*, 1999). Em concordância, a mesma tendência foi verificada em duas experiências laboratoriais independentes *in vitro* onde se efectuaram dois cruzamentos genéticos entre clones de *P. falciparum* bem caracterizados. Num dos casos, utilizaram-se os clones HB3 e 3D7 (Walliker *et al.*, 1987) e no outro os clones HB3 e Dd2 (Wellems *et al.*, 1990). Da recombinação genética resultam novos genótipos gerando diversidade, que pode levar a uma maior capacidade de sobrevivência e adaptação a alterações do ambiente circundante, tais como pressão de fármaco e resposta imune.

O genoma do clone de *P. falciparum* 3D7 foi totalmente sequenciado em 2002, o que permitiu alargar os conhecimentos nesta área e desenvolver estudos de proteómica, a partir dos quais foram identificadas cerca de 2400 proteínas (Florens *et al.*, 2002). A publicação da sequência completa do genoma do *P. falciparum* e de outros parasitas da malária proporcionou novas oportunidades em termos de estratégias para identificação de mecanismos de resistência aos antimaláricos. Na era “pré-genoma” os estudos de resistência eram focados principalmente no conceito de “gene isolado”. A era “pós-genómica” veio facilitar a investigação em malária através do recurso a novas e poderosas ferramentas que proporcionam aos investigadores a possibilidade de executarem estudos genómicos comparativos em larga escala (Cravo *et al.*, 2006). Um exemplo duma técnica que foi desenvolvida na era “pós-genómica” são os *microarrays* de DNA e/ou RNA, que podem ser utilizados, por exemplo, para avaliar alterações na expressão de genes entre parasitas fármaco-sensíveis e fármaco-resistentes, ou em parasitas sob pressão de droga, o que permite eventualmente uma elucidação do alvo terapêutico da droga e conseqüentemente do seu modo de acção (Bozdech *et al.*, 2003).

Dum modo semelhante, a proteómica de malária sofreu um desenvolvimento bastante significativo após a descodificação do genoma. A proteómica combina a alta resolução de proteínas ou separação de peptídeos com espectrometria de massa e bioinformática para rapidamente identificar, por exemplo, um elevado número de proteínas parasitárias diferencialmente reguladas, expressas sob pressão de droga. A proteómica pode ainda ser uma ferramenta complementar para validar estudos de transcrição e estudos genómicos (Cooper & Carucci, 2004).

I.2.3 – Mecanismos de defesa antioxidante na fase eritrocitária

O *Plasmodium* encontra-se sob constante *stress* oxidativo dentro dos eritrócitos. Este *stress* é maioritariamente causado pela produção endógena de compostos tóxicos e espécies reactivas de oxigénio (ROS), como aniões superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e radicais hidroxilo (OH), durante a digestão da hemoglobina e outros processos bioquímicos e por espécies reactivas de oxigénio (ROS) exógenos produzidos pelo sistema imunitário do hospedeiro (Bozdech & Ginsburg, 2004). No entanto o parasita consegue sobreviver graças a um eficaz sistema antioxidante

enzimático e não enzimático (Figura 3). Este sistema engloba as enzimas Superóxido dismutase, a Glutathione e a Tioredoxina.

I.2.3.1 – Superóxido dismutases

Os radicais livres produzem iões superóxido que sofrem dismutação originando H_2O_2 espontaneamente ou pela acção de enzimas específicas (Bozdech & Ginsburg, 2004). Essas enzimas responsáveis pela reacção de dismutação são as Superóxido dismutases (Figura 3), o parasita possui duas com diferentes localizações, a Fe-Superóxido dismutase que se encontra no citoplasma e a Mn-Superóxido dismutase localizada na mitocôndria (Sienkiewicz *et al.*, 2004).

I.2.3.2 – Destoxificação via glutathione

A Glutathione (GSH ou glutamyl cysteinyl glycine) desempenha um papel muito importante na manutenção do estado *redox* celular, na destoxificação de xenobiontes (Lüersen *et al.*, 1999) e na destoxificação do grupo heme produzido durante a digestão da hemoglobina (Ginsburg *et al.*, 1998). Durante as reacções antioxidantes ou de destoxificação a GSH é oxidada a dissulfido de glutathione (GSSG), ou é conjugada a substâncias tóxicas por acção da enzima glutathione S – transferase (GST) (Liebau *et al.*, 2002).

A membrana parasitária é impermeável a γ -glutamyl-cysteine e à GSH da célula hospedeira, não permitindo a sua utilização, logo a GSH utilizada durante as reacções antioxidantes é repostada pelo parasita principalmente por duas vias: redução do GSSG ou síntese *de novo* (Atamna & Ginsburg, 1997). A síntese de GSH é realizada pela acção de duas enzimas, a γ -glutamyl-cysteinyl synthetase e a glutathione synthetase, a partir de aminoácidos provenientes da digestão da hemoglobina (Atamna & Ginsburg, 1997), sendo a redução de GSSG catalizada pela glutathione reductase (Ginsburg *et al.*, 1999). O parasita mantém assim a concentração fisiológica de GSH, permitindo a sua sobrevivência (Ginsburg *et al.*, 1999).

INTRODUÇÃO

I.2.3.2 – Destoxificação via tioredoxina

A destoxificação via tioredoxina inclui várias proteínas como, a tioredoxina redutase, as tioredoxinas e as peroxidoredoxinas (Bozdech & Ginsburg, 2004). Neste sistema, a tioredoxina redutase é responsável pela catalise da redução da tioredoxina oxidada (Trx-S₂) pelo NADPH a tioredoxina reduzida (Trx-(SH)₂) (Figura 3).

Todo este mecanismo de antioxidação e destoxificação é vital para o parasita.

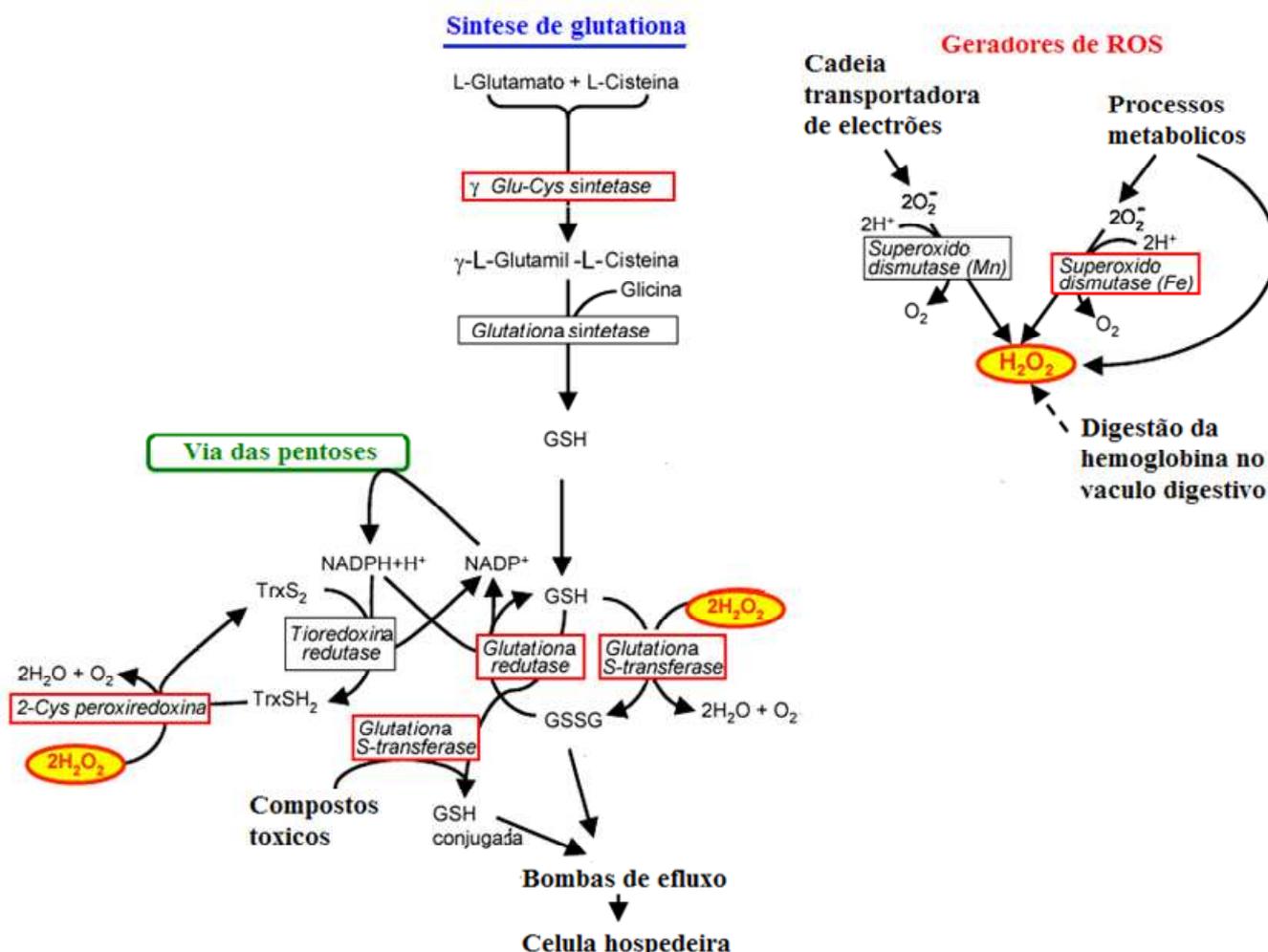


Figura 3 – Esquema resumido do mecanismo de combate ao stress oxidativo em *Plasmodium* (adaptado de Bozdech & Ginsburg, 2004). ROS – Espécies reactivas de oxigénio; H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio; GSH – Glutaciona; GSSG – Dissulfito de glutatião; Trx-S₂ – Tioredoxina oxidada; Trx-(SH)₂ – Tioredoxina reduzida.

I.3 – ESTRATÉGIAS DE CONTROLO DA MALÁRIA

O controlo da malária tem por objectivo principal a redução da taxa de infecção, bem como a de morbilidade e mortalidade causada pela doença. Devido à ausência duma vacina eficaz, apesar de inúmeros candidatos à mesma, os métodos utilizados no controlo da malária baseiam-se na prevenção através da minimização da exposição ao vector, ou seja controlo do vector e por tratamento farmacológico dos sintomas da doença.

A educação social é muito importante num programa de controlo de malária, pois só com a participação activa das populações em risco é possível obter resultados.

I.3.1 – Controlo do vector

O controlo do vector continua a ser o meio mais eficaz para prevenir a transmissão da malária sendo o seu objectivo principal a redução da morbilidade e mortalidade através da redução dos níveis de transmissão (W. H. O., 2006a). Esta estratégia resulta dum conjunto de acções integradas que têm por base as características dos locais de intervenção, como a biologia do vector existente, a taxa de transmissão e morbilidade da doença nessa área, infra-estruturas de saúde existentes e seus recursos, condições ambientais e a situação económica. Para o sucesso duma campanha de controlo do vector é necessário a colaboração entre serviços de saúde e entidades públicas ou privadas que tenham impacto na educação sobre o vector, o envolvimento das comunidades locais, a existência de legislação e regulamentos de suporte, assim como o uso racional de insecticidas e boas práticas de manuseamento dos mesmos (W. H. O., 2006a).

As medidas de controlo do vector (Tabela 1) variam consideravelmente na sua aplicabilidade, custos e na sustentabilidade dos seus resultados, sendo importante que a escolha das medidas a aplicar seja cuidadosa.

INTRODUÇÃO

Tabela 1 – Medidas de controlo do vector

Acção	Medida
Redução do contacto homem-mosquito	Redes mosquiteiras tratadas com insecticidas Uso de repelentes Uso de roupa protectora Protecção das casas
Destruição dos mosquitos adultos	Redes mosquiteiras tratadas com insecticidas Uso de insecticidas
Destruição das larvas de mosquitos	Controlo biológico Uso de larvicidas nas águas
Redução dos criadouros	Saneamento básico Drenagem
Participação social	Educar e motivar a participação da comunidade

I.3.2 – Antimaláricos

Um diagnóstico atempado e um tratamento adequado são componentes fundamentais na estratégia de controlo da malária. O uso correcto dum antimalárico eficaz não só diminui a duração do episódio de malária, como também reduz a incidência de complicações e o risco de morte (W. H. O., 2001b).

Existem diversos antimaláricos disponíveis para o tratamento de infecções por *Plasmodium spp* que podem ser classificados por dois critérios: i) com base na estrutura química e/ou no principal mecanismo de acção, ou ii) com base no local de acção no ciclo evolutivo do parasita, sendo neste caso classificados em esquizontícida sanguíneo quando actua sobre a fase intra-eritrocitária impedindo a proliferação dos parasitas até esquizonte; esquizontícida tecidular quando previne o desenvolvimento de esquizontes hepáticos; hipnozoitícida se actua sobre os hipnozoítos hepáticos; gametocída quando destrói as formas sexuais intra-eritocíticas (Frédérich *et al.*, 2002) (Tabela 2).

No decorrer do último século, o uso incorrecto dos antimaláricos e a ausência de uma fámaco-vigilância adequada levou à situação actual de elevados níveis de resistência.

INTRODUÇÃO

Uma forma de combater a resistência e obter melhores resultados com o tratamento, baseia-se no uso de combinações terapêuticas, que consiste no uso de dois ou mais esquizontíctidas sanguíneos com mecanismos de acção independentes e diferentes alvos bioquímicos no parasita (W. H. O., 2001a). Actualmente a O.M.S. recomenda o uso de combinações terapêuticas, preferencialmente com derivados de artemisinina, no tratamento de malária não complicada por *P. falciparum*. 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 das combinações terapêuticas com derivados da artemisinina estão relacionadas com o modo de acção e características muito particulares desta classe de fármacos, tais como: rápida e significativa redução da parasitémia, rápida resolução dos sintomas clínicos, eficácia contra estirpes de *P. falciparum* multi-resistentes, redução do número de gametócitos (o que reduz a transmissão), boa tolerância e ausência de resistência documentada (W. H. O., 2001a). A artemisinina e seus derivados têm tempos de semi-vida muito curtos o que significa que a cura efectiva implica tratamentos em regime de multi-doses com duração de 7 dias. Regimes de tratamento de duração inferior e uso dos derivados da artemisinina em condições de monoterapia frequentemente originam recrudescências (Hien, 1994). Deste modo, a combinação com outro antimalárico de tempo de semi-vida mais longo aumenta a eficácia da artemisinina e seus derivados, reduz o tempo de duração do tratamento, e diminui a probabilidade de desenvolvimento de fármaco-resistência (W. H. O., 2001a).

Existem quatro combinações terapêuticas com derivados de artemisinina recomendadas: a combinação de artemeter com lumefantrina (Coartem®) e as combinações de artesunato com amodiaquina, sulfadoxina-pirimetamina ou mefloquina. A O.M.S. recomenda a combinação artesunato com amodiaquina, ou artesunato com sulfadoxina-pirimetamina em áreas onde a taxa de sucesso na cura usando em monoterapia a amodiaquina ou a sulfadoxina-pirimetamina, respectivamente, é superior a 80%. Em áreas onde os derivados da artemisinina não podem ser disponibilizados, a utilização da combinação de amodiaquina com sulfadoxina-pirimetamina, é ainda frequentemente utilizada (W. H. O., 2006c).

INTRODUÇÃO

Em muitos dos países endêmicos, os derivados de artemisinina são disponibilizados em monoterapia nos mercados paralelos a preços inferiores aos das combinações terapêuticas com derivados de artemisinina. Actualmente só 11 países com *P. falciparum* resistente não permitem a venda de monoterapias de artemisinina e seus derivados (Afeganistão, Brasil, Eritreia, Irão, México, Malásia, Filipinas, Arábia Saudita, Sudão, África do Sul e Tailândia) (W. H. O., 2006b). O aumento do consumo da artemisinina e seus derivados em monoterapia poderá promover o aparecimento de resistência e comprometer a eficácia desta classe de antimaláricos, tal como aconteceu para os outros fármacos. Devido à ameaça eminente de resistência à artemisinina e seus derivados, a O.M.S., recentemente reforçou as recomendações de que estes fármacos só devem ser utilizados em combinação com outros antimaláricos (W. H. O., 2006b).

É amplamente aceite que se o *P. falciparum* desenvolver resistência aos derivados da artemisinina, não haverá alternativas terapêuticas eficazes para a malária nos próximos 10 anos (W. H. O., 2006b).

Tabela 2 – Antimaláricos classificados de acordo com: a estrutura química, o principal mecanismo de acção e a fase do ciclo em que actuam

Antimalárico	Classe química	Mecanismo de acção	Fase do ciclo do em que actuam
Quinino e derivados			
Quinino#	Metanolquinoleína	Interferência na destoxificação do grupo heme	Esquizontícidas sanguíneos
Amodiaquina	4-Aminoquinoleína		*Esquizontícidas tecidulares
Cloroquina	4-Aminoquinoleína		*Hipnozoitícida
Halofantrina	Fenantreno-metanol		*Gametocída (<i>P. falciparum</i>)
Mefloquina	4-metanolquinoleína		#Gametocída (<i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. ovale</i>)
Primaquina*	8-Aminoquinoleína		
Antagonistas dos Folatos			
Pirimetamina*	2,4-diaminopirimidina	Inibição da síntese de ácidos nucleicos	Esquizontícidas sanguíneos
Proguanil	Biguanida		*Esquizontícidas tecidulares
Sulfonamidas			
Sulfadoxina	Sulfonamida	Inibição da síntese de ácidos nucleicos	Esquizontícidas sanguíneos
			Esquizontícidas tecidulares

INTRODUÇÃO

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

I.4 – RESISTÊNCIA AOS ANTIMALÁRICOS

A resistência aos antimaláricos é um dos principais factores que limitam o sucesso do tratamento da malária, sendo responsável pelo mais recente aumento de mortalidade relacionado com malária, principalmente em África (White, 2004). Fármacos ineficazes levam ao aumento de falhas terapêuticas, o que aumenta o risco de malária grave e anemia, incrementando a transmissão. Infecções parcialmente tratadas produzem oito vezes mais gametócitos comparado com infecções tratadas com sucesso (Price & Nosten, 2001). A resistência tem ainda como consequência imediata um aumento do custo global do controlo da doença, as falhas terapêuticas requerem nova consulta nos centros de saúde ou hospitais para novo diagnóstico e tratamento, resultando na perda de dias de trabalho pelos adultos e absentismo escolar por parte das crianças (W. H. O., 2005b).

INTRODUÇÃO

A resistência aos antimaláricos já foi descrita em três das quatro espécies que infectam humanos. O *P. falciparum* já desenvolveu resistência à maioria dos antimaláricos utilizados actualmente, excepto para a artemisinina e seus derivados (Tabela 3), o *P. vivax* possui já documentada resistência à cloroquina, à primaquina e à sulfadoxina-pirimetamina (Murphy *et al.*, 1993; Looareesuwan *et al.*, 1997) e em *P. malariae* foi descrita resistência à cloroquina (Maguire *et al.*, 2002).

Tabela 3 – Resistência do *P. falciparum* aos antimaláricos

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	1980	-

I.4.1. – Definição de resistência

A resistência *in vivo* é definida pela Organização Mundial de Saúde (O.M.S.), como “a capacidade que uma dada população de parasitas tem para se multiplicar ou sobreviver, na presença de concentrações de fármaco, que habitualmente destruiriam parasitas da mesma espécie ou impediriam a sua multiplicação”. Quando a definição foi criada ainda não existia a técnica de cultura *in vitro* de *P. falciparum* nem a cromatografia líquida de elevada resolução e a biologia molecular estava a iniciar-se como ciência. Por isso ela é baseada na observação clínica. Contudo, actualmente, para que se confirme a existência de resistência a um antimalárico é necessário que se demonstre que os parasitas são recrudescentes num paciente que comprovadamente recebeu recentemente tratamento e que a concentração sanguínea eficaz de fármaco ou seus metabolitos foi mantida pelo

menos no decorrer de quatro ciclos parasitários (White, 1998). Os resultados de teste *in vitro* e a existência de mutações em genes implicados na resistência ao antimalárico são indicadores adicionais de resistência (W. H. O., 2005a).

Resistência a um antimalárico e falha terapêutica podem ser dois fenómenos distintos, significando a última a ausência da resolução dos sintomas clínicos após tratamento com um antimalárico. Vários factores podem contribuir para a falha terapêutica, tais como: dosagem incorrecta, não aderência do indivíduo ao tratamento ou ao tempo de tratamento, fraca qualidade do fármaco, interações farmacológicas, variações inter-individuais na farmacocinética [baixa absorção ou rápida eliminação (diarreias, vômitos)] e insuficiente ou fraca biotransformação das pró-drogas devido a características farmacogenéticas (W. H. O., 2005a). Neste sentido, a resistência é um fenómeno mais complexo do que a falha terapêutica cujo aparecimento pode ser influenciado por diversos factores relacionados com o parasita, o hospedeiro, o vector e o antimalárico (W. H. O., 2001b).

I.4.2 – Monitorização da resistência

O aparecimento da resistência aos antimaláricos levou ao desenvolvimento de métodos para determinar a susceptibilidade/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 e, posteriormente, desenvolveram-se os marcadores moleculares de resistência.

I.4.2.1 – Método *in vivo*

O método *in vivo* é um teste de avaliação da eficácia terapêutica, ou seja, avalia a resposta do *P. falciparum* aos antimaláricos no paciente infectado. O primeiro teste *in vivo* foi desenvolvido em 1965, logo após terem surgido os primeiros casos de resistência à cloroquina.

Em 1973 a O.M.S. definiu uma classificação de resistência *in vivo* em três níveis: RI, RII, RIII e S (susceptibilidade), baseado no período de tempo que decorre entre o

INTRODUÇÃO

desaparecimento dos parasitas após o tratamento e uma recrudescência (W. H. O., 1973). Esta classificação foi modificada em 2003 e reagrupada em:

- 1) ETF (*Early Treatment Failure*) – agravamento ou persistência dos sintomas clínicos com parasitemia no decorrer dos três dias após o tratamento;
- 2) LTF (*Late Treatment Failure*) – reaparecimento dos sintomas com parasitemia entre o 4º dia e o 28º dia após o tratamento;
- 3) ACR (*Adequate Clinical Response*) – ausência de parasitemia ou de sintomas clínicos ao 28º dia após o tratamento (W. H. O., 2006).

O teste de avaliação da eficácia terapêutica continua a ser o método de referência para determinação da eficácia dos antimaláricos, não sendo por si só, no entanto, suficiente para confirmar resistência. As suas limitações originam-se na dificuldade interpretativa resultante da interferência de três factores: o factor Humano (imunidade), o factor parasita (resistência aos fármacos) e farmacogenética (variação inter-individual), tal como referido anteriormente. No entanto e apesar destes testes não fornecerem os dados científicos necessários para compreender a resistência num determinado ambiente, providenciam os dados básicos sobre eficácia dos fármacos utilizados como primeira e segunda linha de tratamento e permitem o desenvolvimento racional de estratégias de tratamento, assim como das políticas terapêuticas a implementar. Assim, os resultados dos testes *in vivo* fornecem informação essencial para se determinar se um antimalárico permanece eficaz. A vigilância da eficácia terapêutica ao longo do tempo é deste modo um componente essencial no controlo da malária.

I.4.2.2 – Métodos *in vitro*

Os testes *in vitro* são usados para medir a susceptibilidade intrínseca do *P. falciparum* aos antimaláricos sem a interferência dos factores do hospedeiro que influenciam os resultados dos testes *in vivo*. Os parasitas são expostos a concentrações conhecidas de antimalárico e os parâmetros de desenvolvimento e/ou crescimento são avaliados.

Existem quatro tipos de aproximações fundamentais para avaliação *in vitro* da susceptibilidade a antimaláricos, cujo princípio base é comum, diferindo apenas entre si no método de avaliação do crescimento/inibição parasitário:

INTRODUÇÃO

Método da O.M.S – baseado na avaliação do crescimento do parasita pela sua maturação de trofozoíto jovem a esquizonte viável, por microscopia óptica (W. H. O., 1997).

Métodos colorimétricos – baseados na medição quantitativa de uma determinada proteína do parasita. Apresenta-se a título de exemplo, o método do *HRP2* que se baseia na medição por ELISA, duma proteína rica em Histidina e Alanina (*HRP2-Histidine-Rich Protein II*), produzida pelo *P. falciparum* durante o seu crescimento e multiplicação. A quantidade de *HRP2* é proporcional à quantidade de parasitas presentes na cultura (Noedl *et al.*, 2002).

Métodos isotópicos – baseados na incorporação pelos parasitas de hipoxantina marcada radioactivamente (Desjardins *et al.*, 1979).

Método do SYBR Green I – baseia-se na fluorescência que a molécula *SYBR Green I* emite quando se intercala nas cadeias de DNA dos parasitas (Bennett *et al.*, 2004).

Os testes *in vitro* são indicados na monitorização epidemiológica para determinação de resistência cruzada entre antimaláricos, obtenção de dados de susceptibilidade de um determinado antimalárico antes do mesmo ser integrado na política terapêutica dum país, fármaco-vigilância temporal e espacial e na tentativa de validação de marcadores moleculares de resistência.

I.4.2.3 – Marcadores moleculares de resistência

A investigação dos mecanismos moleculares de fármaco-resistência parasitária é relevante para o combate à malária, sobretudo a causada por *P. falciparum*, por duas razões principais: i) permite uma identificação racional de novos alvos terapêuticos, ii) e permite que se estabeleçam novos métodos de identificação e diagnóstico da resistência aos antimaláricos, individualmente, por paciente. Consequentemente, seria possível efectuar uma avaliação da frequência de “mutações resistentes” numa determinada região endémica. Assumindo que exista uma correlação total (ou pelo menos elevada) entre uma determinada mutação ou mutações devidamente caracterizadas e a resistência a um determinado composto antimalárico, espera-se que a frequência de alelos mutantes

INTRODUÇÃO

reflecta, aproximadamente, a frequência da população parasitária fenotipicamente resistente. Assim, a detecção das mutações dos parasitas directamente associados à resistência, obtida através de técnicas moleculares e a sua relação com o fenótipo “resistência”, apresenta vantagens em relação aos métodos tradicionais utilizados na mesma identificação (*i.e.* testes *in vitro* e testes *in vivo*). Entre outras, estas vantagens incluem: i) o facto de ser necessária apenas uma quantidade de amostra de sangue infectado do paciente para estudo molecular posterior, em oposição à necessidade de se utilizarem parasitas em cultura *in vitro*, que requer maior volume de sangue a colher; ii) independência da intervenção de factores ambientais (condições de cultura adequadas) e do hospedeiro (influência da imunidade sobre o crescimento parasitário, mesmo em caso de resistência aos antimaláricos); e iii) o elevado número de testes realizados em curtos espaços de tempo. No entanto, é importante realçar que o elevado custo dos equipamentos e reagentes utilizados nestas técnicas e a formação contínua de pessoal nas técnicas de biologia molecular, representam factores restritivos na utilização destas ferramentas, principalmente nos países em vias de desenvolvimento com recursos limitados. Além disso, é de ter em conta que a presença de um determinado polimorfismo genético poderá não ser suficiente para prever com total certeza a resposta a um determinado fármaco *in vivo*. Por estas razões, a avaliação da prevalência de parasitas resistentes a um determinado antimalárico, numa área geográfica definida, deve ainda hoje, ser uma actividade de complementação, utilizando informação resultante da combinação de testes *in vitro*, *in vivo* e análise molecular. Deste modo, poder-se-ão efectuar comparações entre os resultados obtidos pelos diferentes métodos, o que permite estabelecer os valores predictivos de resistência relativos a um determinado marcador molecular. A título de exemplo, realça-se a utilização do marcador *pfcr* K76T para a monitorização da resistência à cloroquina em regiões endémicas para *P. falciparum*. Vários estudos de campo parecem indicar que este marcador é altamente indicativo quer de resistência *in vitro* e quer de falência terapêutica em doentes infectados com *P. falciparum* resistente à cloroquina (Wellems & Plowe, 2001). O resultado de um destes estudos, efectuado no Mali (Djimde *et al.*, 2001), serviu inclusivamente para que a política terapêutica da malária fosse reajustada naquele País, realçando assim a importância prática da utilização da informação molecular no controlo da malária.

A implementação de marcadores moleculares como métodos objectivos de avaliação da resistência depende no entanto do conhecimento adequado dos mecanismos genéticos de resistência para cada fármaco em estudo. Deste modo, o estado da arte relativamente aos mecanismos moleculares de resistência a antimaláricos será descrito em detalhe nas secções subsequentes.

I.4.3 – Distribuição geográfica da resistência aos antimaláricos

A resistência aos antimaláricos distribui-se geograficamente de forma diferente dependendo da espécie de *Plasmodium* e do antimalárico.

No *P. malariae* foi registada resistência à cloroquina na Indonésia (Maguire *et al.*, 2002). No *P. vivax* a resistência à sulfadoxina-pirimetamina foi registada em diversas regiões, no caso da cloroquina encontra-se confinada maioritariamente na Indonésia, Timor Este, Papua Nova Guiné e outras partes da Oceânia, existindo também alguns registos no Peru (W. H. O., 2006c). Na Tailândia surgiu *P. vivax* tolerante à primaquina (Looareesuwan *et al.*, 1997).

A distribuição geográfica da resistência ao *P. falciparum* está representada na Figura 4. No caso da cloroquina, já foi descrita resistência em todas as regiões onde a malária é transmitida excepto na América Central (nordeste do canal do Panamá). A resistência à sulfadoxina-pirimetamina ocorre frequentemente no Sudeste Asiático e na América do Sul e é prevalente em África. A resistência à mefloquina é frequente em algumas áreas do Sudeste Asiático, como Cambodja, Tailândia, Vietname, e na América do Sul (Amazónia). Em África foram descritos casos de falha terapêutica com mefloquina, e vários estudos *in vitro* revelaram diminuição da susceptibilidade, assim como existência de estirpes com baixa susceptibilidade relativamente à mefloquina (W. H. O., 2005a). A resistência a dois ou mais antimaláricos pertencentes a classes químicas diferentes, ou seja multi-resistência, tornou-se um problema no Cambodja e na Tailândia (Wongsrichanalai *et al.*, 2002).

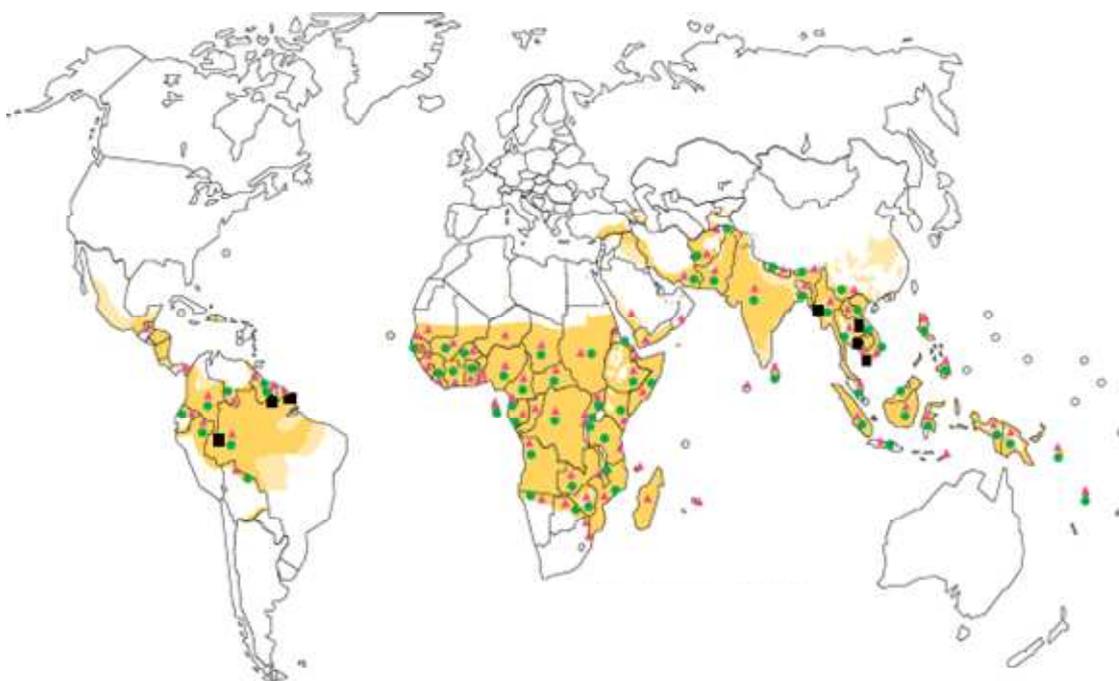


Figura 4 – Mapa da distribuição geográfica da resistência de *P. falciparum* aos antimaláricos (adaptado de W.H.O., 2005b).

▲-Resistência à cloroquina; ● -Resistência à sulfadoxina-pirimetamina; ■ - Resistência à mefloquina; ○ - Áreas sem malária; □ - Áreas onde ocorre transmissão de malária.

I.4.4 – Multi-resistência

A multi-resistência a antimaláricos refere-se ao fenótipo de resistência a dois ou mais fármacos, fenómeno este que tem sido observado em *P. falciparum*. Este fenótipo pode surgir em simultâneo ou como resistência cruzada. A resistência a vários antimaláricos em simultâneo resulta da utilização frequente e simultânea dos mesmos, provocando uma pressão selectiva que culmina no aparecimento deste fenómeno de multi-resistência; a resistência cruzada entre antimaláricos está relacionada com os aspectos comuns dos seus mecanismos de acção, bem como dos mecanismos de resistência que lhes estão associados (Le Bras & Durand, 2003).

I.4.5 – Mecanismo de acção e resistência dos principais antimaláricos

I.4.5.1 – Cloroquina

Descoberta em 1930 e sintetizada pela primeira vez na Alemanha durante a II Guerra Mundial, a cloroquina foi introduzida em 1944-1945 e rapidamente se tornou a principal medida terapêutica e profilática para a malária, devido ao seu baixo custo, ausência de efeitos secundários significativos e elevada eficácia. A cloroquina permaneceu como fármaco de primeira linha no tratamento da malária não grave até ao aparecimento dos primeiros relatos de resistência, no final dos anos 50, na América Latina e Sudeste Asiático (Young *et al.*, 1961; Harinasuta *et al.*, 1962), continuando no entanto a ser frequentemente utilizado, principalmente em África. Em 1994, a cloroquina era o terceiro fármaco mais consumido mundialmente, depois da aspirina e do paracetamol (Foster, 1994).

Diversas teorias têm sido propostas para explicar o seu modo de acção, tais como a inibição da síntese de DNA e RNA (Cohen & Yielding, 1965) e inibição da síntese proteica (Surolia & Padmanaban, 1991). Estas explicações parecem pouco prováveis visto que as concentrações de fármaco necessárias para um efeito letal no parasita teriam de ser muito maiores do que as observadas *in vivo*. A teoria de que a cloroquina actua através da interacção com proteínas humanas (Graves *et al.*, 2002), não foi comprovada.

A explicação mais aceite sobre o modo de acção é baseada na interferência da cloroquina no mecanismo de destoxificação do grupo heme. O parasita durante o seu desenvolvimento intra-eritrocitário digere a hemoglobina no vacúolo digestivo de onde resulta ferriprotoporfirina IX ou grupo heme, que é altamente tóxico para o parasita (Chau & Fitch, 1981; Vander Jagt *et al.*, 1986; Slater *et al.*, 1991). Assim, o parasita possui mecanismos de destoxificação para evitar os seus efeitos nocivos, tais como a polimerização do grupo heme no vacúolo digestivo, da qual resultam cristais inertes inofensivos para o parasita, chamados de hemozoína ou pigmento malárico. Aproximadamente 25-30% do grupo heme é neutralizado por esta via. Os restantes 70-80% de heme livre difundem-se através da membrana vacuolar alcançando o citosol do parasita onde é “degradado” pela glutatona reduzida (Ginsburg *et al.*, 1998).

INTRODUÇÃO

O efeito tóxico da cloroquina é então explicado pela inibição do mecanismo de destoxificação do grupo heme. A formação de complexos cloroquina / heme impede a polimerização do heme em hemozoína no vacúolo e inibe a degradação do heme pela glutatona reduzida no citosol, permanecendo o heme sob a forma livre. A acumulação de heme livre em concentrações elevadas provoca a morte do parasita (Ginsburg *et al.*, 1998).

A resistência à cloroquina foi observada no final dos anos 50 no Sudeste Asiático e na América do sul e no final dos anos 70 em África (W. H. O., 2001b).

Os parasitas resistentes acumulam menor quantidade de cloroquina no vacúolo digestivo que os sensíveis, indicando que a resistência pode ser devido a uma diminuição da sua acumulação (Geary *et al.*, 1986a; Sanchez *et al.*, 1997; Wunsch, *et al.*, 1998) ou ao aumento do seu efluxo (Krogstad *et al.*, 1987; Wellemes *et al.*, 1990). Dois genes, *pfmdr1* e *pfcr1*, têm sido propostos como os principais moduladores da resistência à cloroquina no *P. falciparum*, ambos codificam produtos localizados na membrana do vacúolo digestivo (Cravo *et al.*, 2006).

Estudos iniciais sobre resistência à cloroquina constataram que ela era revertida por antagonistas dos canais de cálcio, tais como o verapamil (Martin *et al.*, 1987), que actua também como modulador de resistência a drogas em células tumorais multi-resistentes por interacção com glicoproteínas (*ATP-binding cassette transporters*) super-expressas que efectuem o transporte inter-membranar de diversos fármacos anti-tumorais. Esta observação incitou à pesquisa de homólogos em *Plasmodium* levando à descoberta e identificação da proteína Pgh1 (*P-glicoprotein homologue 1*) localizada no vacúolo digestivo do *P. falciparum*. A Pgh1 é uma proteína transportadora com 162 kDa, dependente de ATP, pertencente à super-família ABC (*ATP – Binding Cassette*), sendo codificada pelo gene *pfmdr1* localizado no cromossoma 5. Inicialmente num estudo realizado em clones de laboratório, foi observado que mutações nos aminoácidos 86, 184, 1034, 1042 e 1246 no gene *pfmdr1* se encontravam fortemente associadas com a resistência à cloroquina (Foote *et al.*, 1990). No entanto a associação entre o gene *pfmdr1* e a resistência à cloroquina não está completamente esclarecida e é controversa. Alguns estudos com isolados provenientes de várias áreas geográficas da Ásia e África indicam existir uma correlação positiva entre a mutação *pfmdr1* N86Y e a resistência à

INTRODUÇÃO

cloroquina (Gomez-Saladin *et al.*, 1999; Nagesha *et al.*, 2001; Ngo *et al.*, 2003; Hatabu *et al.*, 2005; Cojean *et al.*, 2006; Duah *et al.*, 2007). Em isolados provenientes do Brasil foi verificada uma associação entre os polimorfismos *pfmdr1* N1042D e *pfmdr1* D1246Y e a resistência *in vitro* à cloroquina (Póvoa *et al.*, 1998). No entanto, a análise dos resultados do cruzamento genético entre Hb3 (clone sensível à cloroquina) e Dd2 (clone resistente à cloroquina), demonstraram uma segregação independente entre as respostas à cloroquina e polimorfismos no gene *pfmdr1* (Wellems *et al.*, 1990) e diversos estudos em populações naturais não demonstraram uma associação clara entre alelos do *pfmdr1* e as respostas à cloroquina (Póvoa *et al.*, 1998; Chaiyaroj *et al.*, 1999; Basco & Ringwald, 2002; Thomas *et al.*, 2002; Ochong *et al.*, 2003; Sarr *et al.*, 2005; Menard *et al.*, 2006; Rason *et al.*, 2007). Por outro lado um estudo de transfecção genética demonstrou que determinados polimorfismos no gene *pfmdr1*, alteram a sensibilidade dos parasitas à cloroquina (Reed *et al.*, 2000), assim como outros estudos em populações naturais mostraram que certos alelos deste gene são capazes de modular a susceptibilidade à cloroquina (Duraisingh & Cowman, 2005).

De um modo geral, os estudos acima referidos parecem indicar que o *pfmdr1* poderá desempenhar um papel secundário na resistência à cloroquina, sendo esta determinada por outro gene ou genes. De facto, a análise detalhada da progenia do cruzamento HB3 X Dd2 mostrou que o principal gene associado à resistência se encontrava no cromossoma 7 (Wellems *et al.*, 1991). A análise do mapa de *linkage* levou inicialmente à identificação de um gene denominado *pfcg2*, como determinante da resistência à cloroquina (Su *et al.*, 1997). Posteriormente verificou-se que o seu envolvimento na resistência não era directo mas era devido à sua proximidade física no cromossoma 7 com o gene *pfCRT*, mais tarde identificado como o determinante da resistência (Fidock *et al.*, 2000).

O gene *pfCRT* codifica uma proteína transmembranar, PfCRT, localizada no vacúolo digestivo do parasita. Pode apresentar entre 6 a 8 mutações pontuais que podem modular os níveis de susceptibilidade da cloroquina, incluindo uma que aparentemente desempenha um papel fundamental na resistência à cloroquina, a *pfCRT* K76T (Severini *et al.*, 2006). Mutações pontuais neste gene, em particular a mutação *pfCRT* K76T, têm sido associadas com a resistência do *P. falciparum* à cloroquina *in vitro* e *in vivo* em isolados provenientes de África, Sudeste Asiático e América do Sul (Adagu &

Warhurst, 2001; Djimde *et al.*, 2001; Durand *et al.*, 2001; Labbé *et al.*, 2001; Vieira *et al.*, 2001; Lopes *et al.*, 2002a; Ngo *et al.*, 2003; Ochong *et al.*, 2003; Huaman *et al.*, 2004; Plummer *et al.*, 2004; Hatabu *et al.*, 2005; Sarr *et al.*, 2005; Cojean *et al.*, 2006; Menard *et al.*, 2006; Mita *et al.*, 2006; Duah *et al.*, 2007; Ojuronbe *et al.*, 2007; Ursing *et al.*, 2007). Contudo outros estudos demonstram existir uma fraca ou não existir associação entre a mutação K76T do gene *pfcr* e a resistência à cloroquina *in vivo* e *in vitro* (Talisuna *et al.*, 2002; Kyosiimire-Lugemwa *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2002; Daily *et al.*, 2003).

I.4.5.2 – Quinino

O quinino é um alcalóide derivado da casca da Cinchona usado na clínica há mais de 350 anos. Foi “descoberto” no século XVII no Peru por padres jesuítas, os quais verificaram que a casca da planta Cinchona usada na medicina indígena, possuía propriedades antipiréticas. Em 1820, o quinino foi isolado por Pelletier e Caventou, a partir da casca e em 1944 foi sintetizado pela primeira vez em laboratório (Frédérich *et al.*, 2002). Apesar do seu longo tempo de utilização o quinino continua eficaz no tratamento de todas as espécies que provocam malária humana e raramente se verificam elevados níveis de resistência *in vivo*. O fármaco é geralmente utilizado como último recurso no tratamento de malária grave embora existam países em que o mesmo é utilizado mais liberalmente por falta de vigilância na utilização de fármacos e na sua aquisição descontrolada.

O seu mecanismo de acção ainda não está totalmente esclarecido. Sendo uma quinoleína assumiu-se que este composto interfere com o mecanismo de digestão da hemoglobina (Geary *et al.*, 1986b). Estudos mais recentes sugerem que o quinino interfere no processo de ingestão da hemoglobina (Famin & Ginsburg, 2002).

O mecanismo de resistência ao quinino ainda não está esclarecido, mas tem sido associado a mutações e/ou alteração na expressão do gene *pfmdr1* (Reed *et al.*, 2000; Ward & Bray, 2000; Ferdig *et al.*, 2004; Sidhu *et al.*, 2005; Duraisingh & Cowman, 2005; Sidhu *et al.*, 2006). Por outro lado, estudos de transfecção genética demonstraram que determinadas mutações no gene *pfcr* aumentam parcialmente a susceptibilidade ao quinino (Sidhu *et al.*, 2002). Recentemente um estudo demonstrou que os cromossomas

5, 7 e 13 contêm genes que potencialmente contribuem para as variações na resposta do *P. falciparum* ao quinino (Ferdig *et al.*, 2004). Na sequência deste estudo, foi implicado um transportador Na⁺/H⁺ (PfNHE) na resistência ao quinino tendo-se verificado que a sua actividade se encontrava aumentada nas estirpes resistentes ao quinino relativamente a estirpes sensíveis (Bennett *et al.*, 2007).

I.4.5.3 – Mefloquina

A mefloquina é um derivado sintético do quinino, desenvolvido nos anos 80 em consequência dum programa de pesquisa de malária estabelecido pelo *Walter Reed Army Institute* que se iniciou nos anos 60 com a finalidade de desenvolver novos compostos para combater as estirpes de *P. falciparum* resistentes à cloroquina (Schmidt *et al.*, 1978).

O seu mecanismo de acção não está totalmente esclarecido. A mefloquina liga-se com elevada afinidade às membranas causando alterações morfológicas no vacúolo digestivo do *Plasmodium* e parece exercer a sua acção interferindo com o transporte substâncias a partir da célula hospedeira para o vacúolo digestivo do parasita (Foley & Tilley, 1998).

A resistência à mefloquina tem vindo a tornar-se progressivamente mais comum, especialmente no Sudeste Asiático e na América do Sul (Cravo *et al.*, 2006).

O mecanismo de resistência à mefloquina não está completamente esclarecido mas tem também sido associado a mutações e/ou alteração na expressão do gene *pfmdr1*. A selecção *in vitro* de um clone resistente à mefloquina, W2mef a partir de parasitas resistentes à cloroquina, resultou numa amplificação de 2 a 4 vezes do gene *pfmdr1* e nos aumentos dos níveis de transcrição do mesmo (Wilson *et al.*, 1989). Dois outros estudos independentes envolvendo a selecção de parasitas resistentes à mefloquina, resultaram também no aumento do número de cópias do gene *pfmdr1* e/ou no aumento da expressão do seu produto, a proteína Pgh1 (Cowman *et al.*, 1994; Peel *et al.*, 1994). Em concordância outros estudos laboratoriais com estirpes resistentes à mefloquina verificaram aumentos nos níveis expressão do gene *pfmdr1* nas estirpes resistentes em relação às estirpes sensíveis à mefloquina (Begum *et al.*, 2002; Nishiyama *et al.*, 2004).

Recentemente, um estudo de disrupção genética (*knock-out*) do nº de cópias de 2 para 1 do gene *pfmdr1* na estirpe resistente à mefloquina FCB, resultou numa diminuição de três vezes do valor do respectivo IC50, providenciando uma demonstração directa de que o número de cópias deste gene é determinante de resistência a este fármaco (Sidhu *et al.*, 2006). No entanto, uma experiência de selecção de resistência à mefloquina na linha FAC8mef não resultou na amplificação do gene *pfmdr1* nem num aumento de expressão da proteína Pgh1 (Lim *et al.*, 1996), o que demonstrou existirem outros mecanismos associados a este fenótipo.

Estudos de associação entre o número de cópias do gene *pfmdr1* e as respostas à mefloquina em populações naturais de *P. falciparum* também têm originado resultados contraditórios. Alguns têm demonstrado uma associação entre a amplificação do gene e a resistência *in vitro* à mefloquina (Wilson *et al.*, 1993; Price *et al.*, 1999; Pickard *et al.*, 2003; Price *et al.*, 2004) enquanto outros parecem não corroborar esta observação (Basco *et al.*, 1995; Chaiyaroj *et al.*, 1999). De facto, existem evidências indicativas que aparte de amplificação genética, também SNPs no gene *pfmdr1* podem modular a susceptibilidade dos parasitas à mefloquina. Estudos em populações parasitárias naturais (Duraisingh *et al.*, 2000a; Lopes *et al.*, 2002b; Pickard *et al.*, 2003; Price *et al.*, 2004; Rason *et al.*, 2007), análises de cruzamentos genéticos (Duraisingh *et al.*, 2000b) e experiências de transfecção genética (Reed *et al.*, 2000; Sidhu *et al.*, 2005) indicam que o aumento da susceptibilidade à mefloquina está associado com mutações neste gene.

Em conclusão todos os estudos acima citados parecem evidenciar o papel do gene *pfmdr1* na modulação da susceptibilidade à mefloquina. No entanto, a discrepância entre algumas observações, demonstra claramente o envolvimento de outros factores neste processo, sendo provável que a resistência surja como resultado da combinação de vários factores ou mecanismos.

I.4.5.4 – Amodiaquina

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).

Devido à semelhança na estrutura química da amodiaquina e da cloroquina e existir resistência cruzada entre estes fármacos é sugerido que exercem a sua acção por um mecanismo similar (Bray *et al.*, 1996).

O mecanismo de resistência à amodiaquina não é conhecido, mas devido à sua semelhança com a cloroquina assumiu-se que os mecanismos de resistência do parasita a estes dois antimaláricos apresentem vários aspectos em comum (Ochong *et al.*, 2003).

Existe evidências da implicação de mutações pontuais nos genes *pfcr1* e *pfmdr1* na resistência *in vivo* a esta quinoleína. Alguns estudos associam a resistência *in vivo* à amodiaquina com a mutação *pfcr1* K76T (Ochong *et al.*, 2003; Dokomajilar *et al.*, 2006; Holmgren *et al.*, 2006b; Ursing *et al.*, 2007), outros associam-na com as mutações *pfmdr1* N86Y e *pfmdr1* D1246Y (Dokomajilar *et al.*, 2006; Holmgren *et al.*, 2006b; Holmgren *et al.*, 2007; Nsohya *et al.*, 2007), e alguns parecem indicar que a resistência *in vivo* à amodiaquina se relaciona com a presença de mutações em ambos genes [*pfcr1* K76T e *pfmdr1* N86Y (Happi *et al.*, 2006)]. Um estudo recente realizado no Quênia indicou que a resistência *in vivo* à amodiaquina não está relacionada com a amplificação do gene *pfmdr1* (Holmgren *et al.*, 2006a).

I.4.5.5 – Sulfadoxina-Pirimetamina

A combinação terapêutica sulfadoxina-pirimetamina (Fansidar®) foi introduzida em 1960 e a resistência foi detectada nesse mesmo ano. Estes dois fármacos actuam 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, 1977). Assim, a sulfadoxina-pirimetamina inibem a síntese de DNA levando à morte dos parasitas. A pirimetamina é um antagonista dos folatos, inibindo a enzima dihidrofolato reductase (DHFR) e causando a depleção de tetrahydrofolato. A sulfadoxina é uma sulfonamida e actua por inibição da dihidropteroato sintetase (DHPS), evitando a formação do dihidropteroato (Frédérich *et al.*, 2002).

INTRODUÇÃO

A resistência à sulfadoxina-pirimetamina é um dos poucos exemplos de um mecanismo bem conhecido, surgindo pela presença de mutações pontuais nas regiões codificantes do centro activo das enzimas DHFR e DHPS.

Existem 4 mutações pontuais no gene da DHFR associadas à resistência à pirimetamina: S108N, N51I, C59R e I164L e pensa-se que estas mutações se acumulam de um modo sequencial, iniciando-se com a S108N (Sirawaraporn *et al.*, 1997). A mutação S108N é a principal mutação associada com a resistência, sendo a única encontrada isoladamente em populações naturais. A adição de mais mutações aumenta a resistência, que atinge o seu máximo na presença das 4 mutações. Mutações pontuais nos códões 436, 437, 540 e 613 do gene *pf dhps* estão associados à resistência à sulfadoxina (Brooks *et al.*, 1994; Triglia & Cowman, 1994).

O conjunto das mutações 108N, 51I, 59R no *pf dhfr* e 437G e 540E no *pf dhps*, designado por quintuplo mutante, é considerado como o marcador molecular para a falência terapêutica observada no tratamento de *P. falciparum* com pirimetamina-sulfadoxina (Nzila *et al.*, 2000; Kublin *et al.*, 2002; Bwijo *et al.*, 2003; Schönfeld *et al.*, 2007). No entanto a utilização destas mutações como marcadores moleculares de resistência à pirimetamina e sulfadoxina, deve ter em conta a idade dos indivíduos em estudo (Staedke *et al.*, 2004).

I.5 – ARTEMISININA E DERIVADOS

A artemisinina (qinghaosu) é o composto activo da planta *Artemisia annua L.*, utilizada na medicina tradicional chinesa como antipirético desde há 1500 anos. A artemisinina foi isolada por cientistas chineses em 1972, tendo sido a sua estrutura determinada em 1979 e a sua síntese total realizada em 1983 (Frédérich *et al.*, 2002).

Este grupo de antimaláricos induz uma resposta clínica e uma redução da parasitémia mais rápida que todos os outros fármacos existentes (Hien & White, 1993). A artemisinina e seus derivados actuam com elevada eficácia nas várias fases sanguíneas do parasita, incluindo a fase de trofozoíto jovem, reduzindo ainda o número de gametócitos no sangue e diminuindo a infectividade dos gametócitos sobreviventes. Resultados de experiências realizadas para avaliar a actividade *in vitro* destes

INTRODUÇÃO

compostos no *P. falciparum*, noutros protozoários e em linhas celulares eucariotas sugerem um mecanismo de acção específico para o *P. falciparum* (Golenser *et al.*, 2006).

Quimicamente, a artemisinina é uma lactona sesquiterpénica caracterizada por uma ponte endoperóxido essencial à sua actividade antimalárica; 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 5): o artesunato que é hidrossolúvel e os derivados lipossolúveis artemeter e arteeter. Todos estes compostos são metabolizados em dihidroartemisinina que é o metabolito biologicamente activo (Figura 5). Outro derivado semi-sintético, artemisona, está em fase de ensaios clínicos, e parece ser o mais potente (Haynes *et al.*, 2006; Vivas *et al.*, 2007). Todos os compostos do grupo das artemisininas são fármacos com tempos de semi-vida curtos (3-5 horas), quando utilizados em monoterapia é necessário tratamentos de mais de 5 dias para se obter eliminação total da parasitémia (Robert *et al.*, 2001).

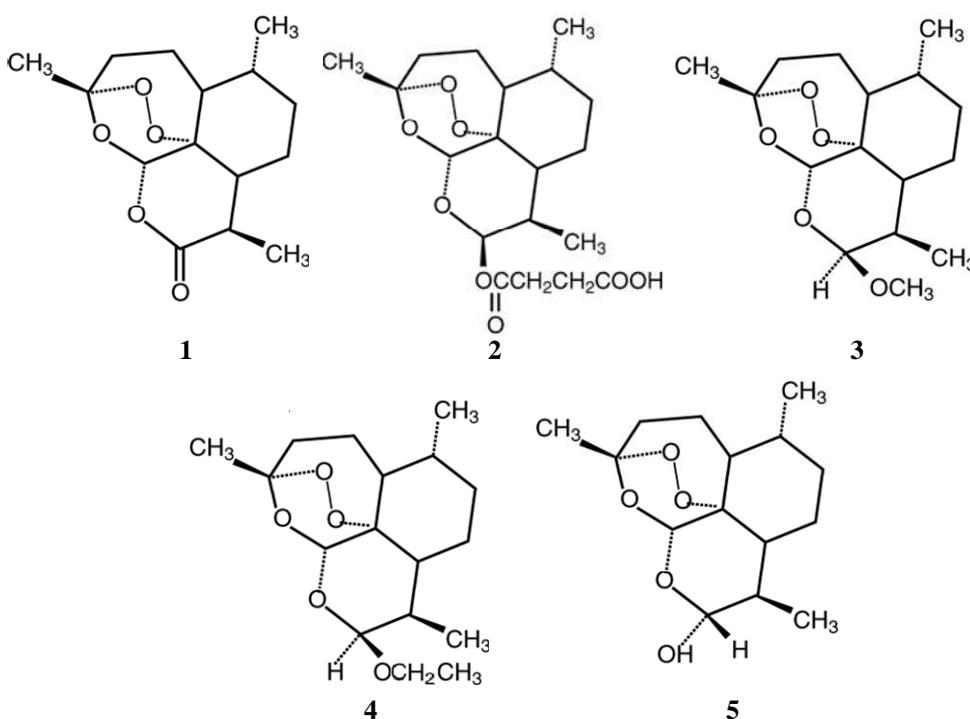


Figura 5 – Estrutura química da artemisinina e seus derivados (1-artemisinina; 2-artesunato; 3-artemeter; 4-arteeter; 5-dihidroartemisinina).

I.5.1 – Mecanismo de acção

O mecanismo de acção da artemisinina e derivados não é completamente conhecido. Um dos potenciais modos de acção tem sido atribuído à sua capacidade de gerar radicais livres devido à ponte endoperóxido presente em todas as moléculas de artemisinina e seus derivados (Robert *et al.*, 2001). Para exercerem a sua actividade é necessário um passo de activação, ou seja a clivagem da ponte endoperóxido. É proposto que essa ponte seja clivada pelo grupo heme intra-parasitário ou Fe^{2+} livre, 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 realizado 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). Foi também verificado que alguma desta proteína se localiza na membrana do vacúolo digestivo do parasita (Bhisutthibhan *et al.*, 1999).

Recentemente foi proposto outro mecanismo de acção, baseado na alteração do armazenamento intracelular de cálcio através da inibição da actividade da enzima ATPaseCa^{2+} do *Plasmodium*, codificada pelo gene *pfATPase6* (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003). A artemisinina possui uma estrutura semelhante à tapsigargina, 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 ATPaseCa^{2+} do tipo SERCA identificada no genoma do *Plasmodium*, 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, indicando a possibilidade de que a inibição de proteínas adicionais também pode desempenhar um papel na morte do parasita (Krishna *et al.*, 2004).

I.5.2 – Mecanismo de resistência

I.5.2.1 – Evidências de estudos em *Plasmodium spp*

O mecanismo de resistência à artemisinina e derivados não é completamente conhecido. No entanto, os genes *pfcr1*, *pfmdr1*, *pftctp*, *pfATPase6* e *pfubp-1* têm sido investigados no contexto da modulação da susceptibilidade à artemisinina e seus derivados.

I.5.2.1.1 – Gene *pfcr1*

O gene *pfcr1* (*Plasmodium falciparum Chloroquine Resistance Transporter gene*) codifica a PfCRT, uma proteína integral da membrana, de 48,6 kDa. Originalmente foi descrita como sendo canais ou transportadores contendo 10 putativos domínios transmembranas (Fidock *et al.*, 2000). Posteriormente, foi referido que a proteína designada de PfCRT pertence à super-família dos transportadores de drogas/metabolitos (Martin *et al.*, 2003; Tran & Saier, 2004; Martin & Kirk, 2004).

Vários estudos demonstraram que este gene desempenha um papel importante na resistência do *P. falciparum* à cloroquina, nomeadamente a mutação *pfcr1* K76T (Fidock *et al.*, 2000; Wellemes & Plowe, 2001; Sidhu *et al.*, 2002). A mutação chave (K76T) responsável pela resistência à cloroquina encontra-se localizada no primeiro domínio transmembranar predito, região da proteína implicada na selectividade para o substrato (Sidhu *et al.*, 2002; Martin & Kirk, 2004).

No contexto da modulação da susceptibilidade à artemisinina e seus derivados estudos de transfecção genética demonstraram que determinadas mutações no gene *pfcr1* aumentam a susceptibilidade a esta classe de antimaláricos, especificamente à artemisinina e dihidroartemisinina (Sidhu *et al.*, 2002). No entanto, a sua importância em populações naturais da *P. falciparum* não foi confirmada (Jambou *et al.*, 2005).

I.5.2.1.2 – Gene *pfmdr1*

O gene *pfmdr1*, *Plasmodium falciparum Multidrug Resistance gene*, localizado no cromossoma 5, codifica uma proteína transportadora, com 162 kDa, dependente de ATP, pertencente à super-família ABC (*ATP – Binding Cassette*). Esta proteína, a Pgh1

(*P-glicoprotein homologue 1*), está localizada na membrana do vacúolo digestivo do parasita (Cowman *et al.*, 1991).

Este gene tem sido relacionado com a resistência a vários antimaláricos, como cloroquina, amodiaquina, mefloquina e artemisinina e seus derivados. Podendo modular a susceptibilidade aos diversos antimaláricos por dois mecanismos: amplificação génica e/ou mutações na sequência do gene (Duraisingh & Cowman, 2005).

No caso específico da artemisinina e seus derivados, parece existir uma forte associação entre amplificação do gene *pfmdr1*, a forma selvagem do gene e a diminuição da susceptibilidade aos derivados da artemisinina em populações naturais de *P. falciparum*, suportado por estudos genéticos (Duraisingh & Cowman, 2005). Estudos realizados em populações naturais de *P. falciparum* verificaram uma correlação entre a diminuição da susceptibilidade *in vitro* à artemisinina e artesunato e o aumento no número de cópias do gene *pfmdr1* (Price *et al.*, 1999; Pickard *et al.*, 2003; Price *et al.*, 2004). Um estudo recente revelou que a disrupção genética (*knock-out*) do nº de cópias de 2 para 1 do gene *pfmdr1* na estirpe resistente à mefloquina FCB resultou num aumento da susceptibilidade à artemisinina *in vitro*, reforçando a ideia que o número de cópias deste gene possui capacidade de modular este fenótipo (Sidhu *et al.*, 2006). Adicionalmente, mutações pontuais no gene *pfmdr1* têm sido associadas a mudanças de susceptibilidade dos parasitas de malária à artemisinina (Duraisingh *et al.*, 2000a; Duraisingh *et al.*, 2000b; Pickard *et al.*, 2003; Sidhu *et al.*, 2005).

I.5.2.1.3 – Gene *pftctp*

O gene *pftctp* codifica uma proteína homóloga da TCTP (*translationally controlled tumor protein*) em *P. falciparum*. Foi referida como potencial alvo da artemisinina (Bhisutthibhan *et al.*, 1998).

O envolvimento deste gene na resistência à artemisinina e seus derivados foi pressuposto após a realização dum estudo com estirpes de *P. yoelli* resistentes à artemisinina seleccionadas a partir de progenitores sensíveis, em que estas apresentaram uma quantidade significativamente maior de proteína TCTP relativamente às estirpes parentais sensíveis (Walker *et al.*, 2000). Contudo o fenótipo de resistência demonstrou

ser instável, o que não permitiu estabelecer uma relação inequívoca entre o gene *pftctp* e o fenómeno de resistência.

I.5.2.1.4 – Gene *pfATPase6*

O gene *pfATPase6* codifica uma ATPaseCa²⁺ tipo SERCA do *Plasmodium* que foi recentemente proposto como um principal alvo terapêutico dos derivados da artemisinina (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003).

A teoria mais consistente sobre o mecanismo que pode modular a susceptibilidade da artemisinina sugere que a resistência depende de alterações na ATPaseCa²⁺ do tipo SERCA do *Plasmodium falciparum* (Uhlemann *et al.*, 2005; Jambou *et al.*, 2005).

Uhlemann *et al.* demonstraram que alterações em aminoácidos da proteína PfATPase6 modulam a susceptibilidade *in vitro* à artemisinina num sistema heterólogo, tendo verificado que a acção inibitória da artemisinina na actividade da PfATPase6 em oocistos de *Xenopus laevis* é influenciada por mutagénese dirigida (L263E) (Uhlemann *et al.*, 2005). Recentemente, foi identificada uma mutação, S769N, no gene *pfATPase6* em 6 de 7 isolados da Guiana Francesa, com reduzida susceptibilidade *in vitro* ao artemeter: esses isolados apresentavam uma média de valores de IC50 20 vezes superior ao valor máximo apresentado pelos outros isolados estudados. Foi sugerido que esta mutação evita que os derivados da 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.

I.5.2.1.5 – Gene *pfubp-1*

O gene *pfubp-1* codifica uma protease ubiquitina-específica, em *P. falciparum* (UBP-1).

Um estudo realizado em estirpes de *Plasmodium chabaudi chabaudi* com resistência à artemisinina geneticamente estável, anteriormente seleccionadas por Afonso *et al.* sugeriu este gene como potencial modulador da susceptibilidade às artemisininas. Tendo sido identificada no 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 *Plasmodium 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).

I.5.2.2 – Evidências de estudos em outros sistemas biológicos

Os genes codificantes de proteínas envolvidas nos mecanismos de defesa do *stress* oxidativo estão implicados na resistência aos derivados da artemisinina noutros sistemas biológicos.

Alguns estudos realizados em linhas celulares tumorais verificaram que a expressão de genes antioxidantes afecta a resposta ao artesunato (Efferth *et al.*, 2003a; Efferth *et al.*, 2003b). Num estudo de comparação da expressão basal de mRNA de genes antioxidantes em 55 linhas celulares tumorais com diferentes valores de IC50 para o artesunato, foi observado que a expressão da tioredoxina redutase possuía uma correlação positiva significativa com os IC50s do artesunato e a expressão da catalase estava inversamente correlacionada ($P < 0,05$) (Efferth *et al.*, 2003b). Outro estudo demonstrou que a expressão de mRNA da γ -glutamyl-cisteinil sintetase (γ -GCS) e da glutathione S-transferase (GST) tinham uma correlação significativa ($P < 0,05$) com a resposta ao artesunato nas linhas de células tumorais estudadas (Efferth *et al.*, 2003a). Efferth & Volm, verificaram que a resistência ao artesunato na linha celular MSV-HL13 foi completamente revertida quando se utilizou um inibidor da γ -GCS, o que provoca a depleção do conteúdo celular de GSH e foi parcialmente revertida quando se utilizou um inibidor da GST (Efferth & Volm, 2005). Com base nestes estudos foi concluído que o *stress* oxidativo e os genes antioxidantes desempenham um papel importante na actividade do artesunato contra as células tumorais (Efferth, 2005).

Em *Schistosoma japonicum*, a concentração parasitária de GSH e as enzimas envolvidas no mecanismo de defesa do *stress* oxidativo estão implicadas na acção/inibição dos derivados da artemisinina. Xiao *et al.* verificaram que o artemeter inibe a actividade da GST e da SOD (Xiao *et al.*, 2002). Noutro estudo foi observado que a Glutathione (GSH) inibe a actividade anti-schistosoma do artemeter (Zhai *et al.*, 2002).

I.5.3 – Resistência à artemisinina em laboratório

A resistência à artemisinina tem sido induzida experimentalmente por vários grupos de investigadores, utilizando quer o *P. falciparum* quer modelos murinos de malária.

A primeira tentativa de seleccionar estirpes de *P. falciparum* resistentes à artemisinina foi realizada em 1985 por Inselburg, recorrendo a um agente mutagénico denominado MNNG (Inselburg, 1985). Posteriormente, resistência à artemisinina e artesunato foi induzida em estirpes de *P. berghei* sensíveis à cloroquina, e em estirpes de *P. yoelii* resistentes à cloroquina, através de pressão de droga, mas verificou-se que o fenótipo era revertido quando se retirava a pressão da droga (Peters & Robinson, 1999; Xiao *et al.*, 2004). Recentemente Afonso *et al.* seleccionaram estirpes de *Plasmodium chabaudi chabaudi* com resistência à artemisinina e artesunato geneticamente estável. O parasita foi submetido ao crescimento na presença concentrações crescentes de artemisinina e artesunato, tendo-se obtido uma resistência 15 vezes maior no caso da artemisinina e 6 vezes maior no caso do artesunato. Subsequentemente estes parasitas foram transmitidos por mosquitos do género *Anopheles* e após várias passagens sem droga permaneceram resistentes (Afonso *et al.*, 2006).

Neste momento o grande desafio é seleccionar estirpes de *P. falciparum* resistentes à artemisinina, com resistência estável, de modo a estudar e aprofundar os conhecimentos sobre mecanismos de resistência.

I.5.4 – Resistência à artemisinina em populações naturais de *P. falciparum*

A resistência *in vivo* à artemisinina e seus derivados ainda não existe. Contudo há evidências de que o risco do seu aparecimento é real. Na China, onde os derivados da artemisinina são utilizados há mais de uma década em larga escala em monoterapia, a susceptibilidade *in vitro* do *P. falciparum* ao artesunato diminuiu significativamente entre 1988 e 1999, de onde o IC50 triplicou e a MIC (concentração mínima inibitória) duplicou (Yang *et al.*, 2003). No Vietname, onde também se utilizou a artemisinina em monoterapia, o IC50 da artemisinina manteve-se estável entre 1998 e 2001, mas o IC90 e IC99 duplicou e quadruplicou, respectivamente (Huong *et al.*, 2001).

INTRODUÇÃO

Foram descritos casos de suspeita de falha terapêutica após tratamento com derivados de artemisinina: dois na Tailândia, dois na Índia e quatro na Serra Leoa (Luxemburger *et al.*, 1998; Gogtay *et al.*, 2000; Sahr *et al.*, 2001; Singh, 2002).

Recentemente, num estudo realizado por Jambou *et al.* na Guiana Francesa, foram encontrados isolados de *P. falciparum* com reduzida susceptibilidade *in vitro* ao artemeter que apresentavam uma média de valores de IC50 20 vezes superior ao valor máximo apresentado pelos outros isolados estudados, e em 6 de 7 isolados foi encontrada uma mutação (S769N) no gene *pfATPase6* (Jambou *et al.*, 2005), tal como referido anteriormente.

Falha terapêutica ou valores de IC50 *in vitro* elevados não são suficientes para declarar a existência de resistência *in vivo*. No entanto, o primeiro alerta de possível aparecimento de resistência *in vivo* pode ser a diminuição da susceptibilidade *in vitro*. Deste modo, os estudos de susceptibilidade *in vitro* são de extrema importância para se efectuar uma vigilância adequada da eficácia dos antimaláricos em uso nas áreas endémicas e evitar a disseminação rápida da resistência. Assim, e tendo em conta a importância dos derivados da artemisinina, integrantes das novas políticas terapêuticas dos países com malária, durante este trabalho foram efectuados estudos de susceptibilidade *in vitro* com derivados da artemisinina em populações naturais de *P. falciparum* provenientes de três zonas endémicas: Ruanda, Arquipélago da República Democrática de São Tomé e Príncipe e Estado do Pára, situado no norte do Brasil. Um sumário das características epidemiológicas de cada uma destas áreas é descrito nas secções seguintes.

I.5.4.1 – Ruanda

O Ruanda localiza-se na África sub-Sahariana. É um pequeno país montanhoso, situado entre o Uganda, a Tanzânia, o Burundi e a República Democrática do Congo (Figura 6). A sua capital é Kigali, tem 26340 km² de superfície e aproximadamente 8 milhões de habitantes.

É uma zona endêmica de malária, sendo esta a maior causa de morbidade e mortalidade, responsável por 43% de todas as mortes e 40% das consultas nos centros de saúde. Em 2005 foram tratados nos centros de saúde públicos, 1,5 milhões de infectados com malária não complicada, sendo que este número não representa o total de infectados, visto que só 32% da população utilizaram os serviços de saúde (Ross, 2005).

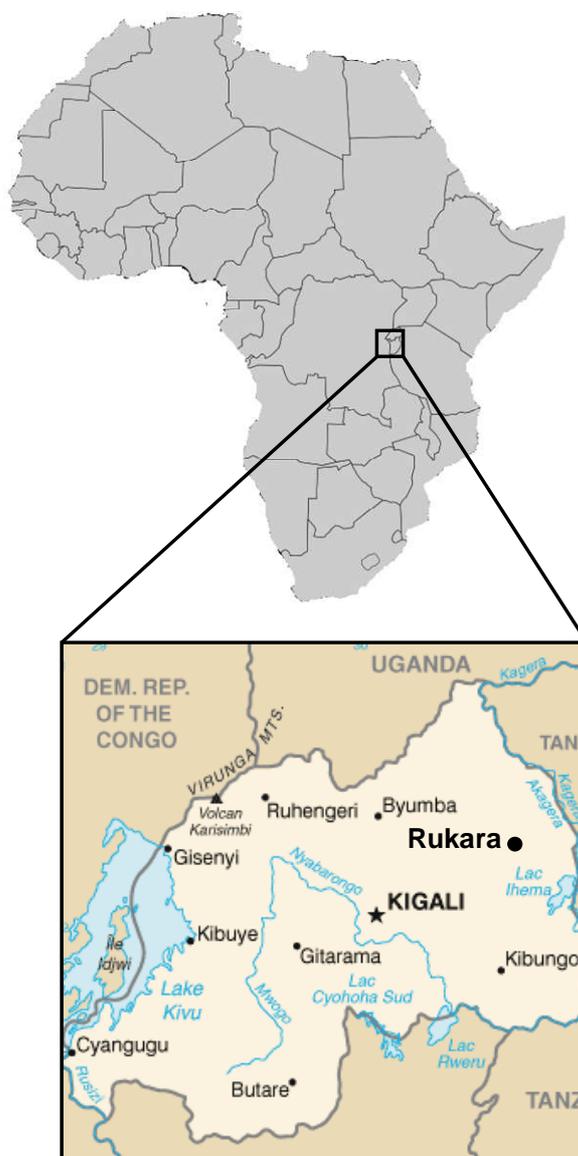


Figura 6 – Mapa do Ruanda

O *Plasmodium falciparum* é a principal espécie responsável pela infecção, sendo os principais vectores o *Anopheles Funestus* e o *Anopheles Gambiae*.

A transmissão de malária ocorre entre o mês de Fevereiro e o mês de Novembro, nas partes oriental e sudoeste do país. Essa transmissão não é uniforme, sendo estável nos vales com alguns picos sazonais. Nas montanhas a transmissão é instável com alguns distritos em elevado risco de epidemias (Ministère de la Santé, 2004).

INTRODUÇÃO

A incidência de malária tem aumentado nos últimos anos devido a várias razões tais como alterações ambientais, aumento da densidade populacional, aumento das movimentações da população devido a guerra, aumento da temperatura média anual e aumento da resistência à cloroquina (Rwagacondo *et al.*, 2003).

Até ao ano 2000, a cloroquina e a sulfadoxina-pirimetamina (SP) eram utilizados como fármacos de primeira e segunda linha no tratamento de malária não complicada, respectivamente. No entanto, testes *in vivo* realizados entre 1999-2000 revelaram falha terapêutica com estes fármacos que foi em algumas regiões superior a 50%, o que levou em 2001 à alteração da política terapêutica. Actualmente, os antimaláricos utilizados como primeira linha no tratamento da malária não complicada consistem na combinação terapêutica amodiaquina+SP, sendo a combinação amodiaquina+artesunato utilizada como alternativa e o quinino utilizado na malária grave (Tinto *et al.*, 2006).

Em 2003 Tinto *et al.* realizaram um estudo de susceptibilidade *in vitro* à cloroquina, monodesetil-amodiaquina (metabolito activo da amodiaquina), quinino e dihidroartemisinina em isolados provenientes do Ruanda. A escolha destes fármacos, foi devido a estes integrarem os protocolos de tratamento da malária actualmente implementados e, no caso da cloroquina, para determinar a sua resistência cruzada com os outros fármacos. Verificaram que 45% da população parasitária estudada era resistente à cloroquina, sendo a média dos IC50s relativos à dihidroartemisinina, quinino e monodesetil-amodiaquina significativamente maior para os isolados resistentes à cloroquina do que para os isolados sensíveis à cloroquina ($P < 0,05$), tendo-se também verificado uma correlação positiva entre as respostas aos antimaláricos testados ($P < 0,005$), o que evidencia uma resistência cruzada *in vitro* entre os antimaláricos (Tinto *et al.*, 2006).

I.5.4.2 – República Democrática de São Tomé e Príncipe

O arquipélago da República Democrática de São Tomé e Príncipe localiza-se no Golfo da Guiné, a cerca de 300 km da costa do Gabão (Figura 7). É composto por duas ilhas principais, São Tomé e Príncipe, distando de 140 km, e várias ilhotas, abrangendo um total de 964 km². Do total da população, cerca de 131.000 vivem em São Tomé e 6.000 no Príncipe. A maioria da população vive na zona costeira, com cerca de 60% concentrada num raio de 10 km da capital, São Tomé.

O clima é tropical, quente e muito húmido, com uma temperatura média anual de 25°C e humidade relativa de 80%. A época das chuvas estende-se desde Setembro a Maio e a pluviosidade anual varia entre 1000 e 7000 mm.

A malária em São Tomé é endémica, continua sendo um dos maiores problemas de saúde pública, responsável por 68% das hospitalizações e 48% do total das mortes (Teklehaimanot, 2003).

Nestas ilhas existem as 4 espécies de *Plasmodium*, sendo 90% das infecções devido ao *P. falciparum*. O mosquito *Anopheles gambiae* s.s. é o responsável pela transmissão (Pinto *et al.*, 2000).

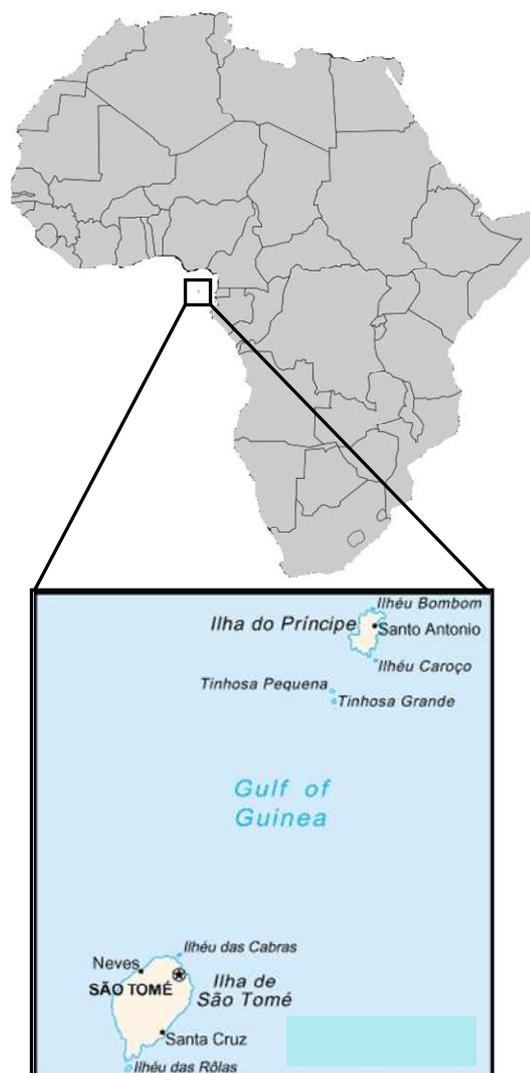


Figura 7 – Mapa da RDSTP

INTRODUÇÃO

As dificuldades sócio-económicas associadas ao uso inadequado dos antimaláricos contribuíram para a rápida disseminação da resistência do *P. falciparum* aos antimaláricos, levando a uma maior dificuldade no controlo da doença.

Até ao ano 2004 o antimalárico utilizado como primeira linha no tratamento de malária não complicada era a cloroquina, e como segunda linha a sulfadoxina-pirimetamina.

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram uma elevada prevalência da resistência à cloroquina e à sulfadoxina-pirimetamina (Lopes *et al.*, 2002a; Cravo *et al.*, 2004).

Actualmente estão a ser introduzidas as combinações terapêuticas com derivados da artemisinina, mais especificamente a combinação amodiaquina-artesunato.

1.5.4.3 – Brasil, Estado do Pará

O Estado do Pará é uma das 27 unidades federativas do Brasil. É o segundo maior estado do país com uma extensão de 1.253.164,5 km² e está situado no centro da região norte tendo como limites o Suriname e o Amapá a norte, o oceano Atlântico a nordeste, o Maranhão a leste, Tocantins a sudeste, Mato Grosso a sul, o Amazonas a oeste e Roraima e a Guiana a noroeste (Figura 8). Pertence à Amazônia legal e a sua capital é Belém.

O Pará possui um clima tipicamente tropical, com uma temperatura média anual de 24°C e humidade relativa de 85%. A época de chuva estende-se de Dezembro a Maio e a época seca de Junho a Novembro. A média anual de pluviosidade é aproximadamente 2500 mm.

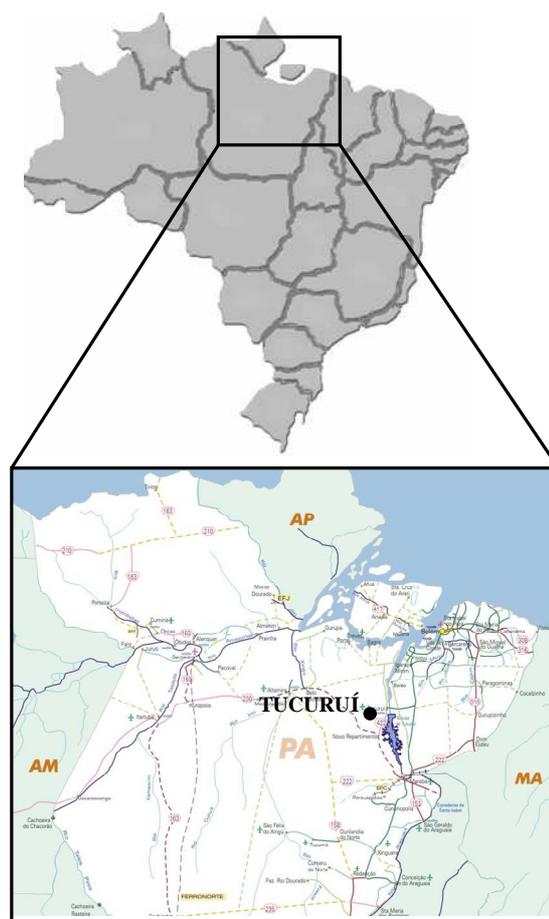


Figura 8 – Mapa do Estado do Pará, Brasil

INTRODUÇÃO

A malária é endêmica no Brasil, actualmente a transmissão está basicamente restrita à Amazônia legal (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins). Nos Estados fora da região Amazônica, o risco de transmissão local é pequeno ou não existente e a quase totalidade dos casos de malária registrada é importada da Amazônia legal ou de outros países, principalmente de África.

No Estado do Pará, em 2005 foram registados 122.442 casos de malária, sendo o segundo Estado mais afectado por malária, só ultrapassado pelo Estado do Amazonas (Ministério da Saúde, 2006). A infecção por *P. vivax* é prevalente em aproximadamente 80% dos casos, mas o *P. falciparum* está presente em toda a área onde existe transmissão de malária (Vasconcelos *et al.*, 2000).

A incidência de malária na região Amazônica tem aumentado nos últimos anos, sendo as movimentações populacionais, relacionadas com projectos agro-pecuários, construção de rodovias e hidroeléctricas e com actividades de garimpo e mineração desenvolvidos nessa região, o principal responsável pelo aumento (Vasconcelos *et al.*, 2006). Este movimento migratório desordenado dificulta o controlo da malária, permitindo um enorme afluxo de pessoas não-imunes para áreas de elevada transmissão. Além disto, permite o refluxo de indivíduos com a infecção para regiões onde a transmissão da malária fora interrompida possibilitando, eventualmente, sua re-introdução (Alecrim *et al.*, 2006).

Até 2005 a terapêutica utilizada como primeira linha no tratamento de malária não complicada por *P. falciparum* no Brasil era quinino e doxiciclina durante três dias, seguido de dois dias só com doxiciclina e primaquina no sexto dia. Como segunda linha era utilizada mefloquina em dose única e primaquina no segundo dia. Actualmente numa tentativa de impedir o aumento da resistência, dado que na região Amazônica já foi descrita resistência do *P. falciparum* à cloroquina (Vieira *et al.*, 2004), à mefloquina (Calvosa *et al.*, 2001), ao quinino (Zalis *et al.*, 1998), à sulfadoxina-pirimetamina (Cortese *et al.*, 2002) e à combinação terapêutica quinino+doxiciclina (Leal *et al.*, 2003), a terapêutica para *P. falciparum* está a ser alterada para o uso de combinações terapêuticas com derivados da artemisinina. Um estudo recentemente realizado mostrou que a combinação terapêutica artemeter+lumefantrina tem uma eficácia total, além de ser um tratamento seguro e bem tolerado (Alecrim *et al.*, 2006).

I.5.5 – Identificação de mecanismos de resistência à artemisinina: importância e estratégias

Identificar e compreender os mecanismos responsáveis pelo aparecimento de resistência é de extrema importância visto que esta tem surgido mais rapidamente do que o desenvolvimento de novos antimaláricos, o que dificulta cada vez mais o combate à malária. Conhecer as bases moleculares da resistência traz vantagens evidentes tais como a monitorização da resistência aos antimaláricos recorrendo a técnicas moleculares que circunda o uso de técnicas mais morosas e dispendiosas. Por outro lado conhecer o alvo mutado que confere resistência, ajuda ao desenho racional de potenciais derivados desse fármaco que contornem essa mutação e sejam eficazes.

Resistência *in vivo* de *P. falciparum* à artemisinina e seus derivados ainda não existe, mas nenhum fármaco ficou livre de resistência por muito tempo e existe o perigo real do uso inadequado e sem controlo poderem facilitar o seu surgimento. Recentemente foram fornecidas evidências que suportam a possibilidade de que surja resistência aos derivados da artemisinina, nomeadamente a selecção de resistência estável em *P. chabaudi* (Afonso *et al.*, 2006) e a observação de resistência *in vitro* ao artemeter em *P. falciparum* da Guiana Francesa (Jambou *et al.*, 2005).

De modo a salvaguardar a eficácia da artemisinina e seus derivados, é necessário que várias propriedades desses fármacos sejam compreendidas, principalmente as relacionadas com a aquisição e desenvolvimento de resistência nos parasitas.

Uma das estratégias usadas para investigar mecanismos de resistência a antimaláricos, consiste em gerar mutantes fármaco-resistentes seleccionados a partir de clones fármaco-sensíveis (Carlton *et al.*, 2001). Assim, os clones fármaco-resistentes resultantes e os clones fármaco-sensíveis são geneticamente idênticos (isogénicos), excepto para os factores que determinam a resistência ao fármaco. Deste modo, é possível identificar genes responsáveis pela resistência através de estratégias moleculares.

Em *P. falciparum*, a obtenção de parasitas resistentes de fenótipo estável por pressão de artemisinina não tem tido sucesso. Foi postulado que esta observação se deve essencialmente ao facto do número de parasitas existente numa cultura *in vitro* ser

INTRODUÇÃO

insuficiente para que se possa encontrar um mutante que possua o alelo (s) que permita o seu desenvolvimento numa concentração de fármaco maior. Para aumentar a probabilidade de seleccionar mutantes resistentes pode aumentar-se a taxa de mutação, por exemplo através da exposição dos parasitas a um agente mutagénico, antes da selecção por pressão de fármaco. O agente mutagénico, N` metil-N`-nitro-N`-nitrosoguanidina, já foi utilizado com sucesso na selecção de mutantes de *P. falciparum* resistentes a fármacos *in vitro* (Thaithong *et al.*, 1992). Por outro lado a utilização de clones de *P. falciparum* já resistentes a outros antimaláricos como material biológico inicial poderá facilitar o sucesso da selecção porque devido ao fenótipo ARMD (*Accelerated Resistance to Multiple Drugs*) os parasitas poderão ser mais receptivos ao desenvolvimento de resistência (Cravo *et al.*, 2003).

A identificação e o estudo de genes responsáveis pela resistência podem basear-se em aproximações distintas, tais como: i) procura de SNPs recorrendo a PCR-RFLP ou sequenciação directa de DNA (Ferreira *et al.*, 2007); ii) observação de alterações na expressão ou no nº de cópias de genes utilizando PCR em tempo real (Ferreira *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2006); iii) *DNA microarrays* (Bozdech *et al.*, 2003); iv) observação de alterações na expressão de proteínas através de estudos de proteómica (Cooper & Carucci, 2004). Recentemente foi desenvolvida uma técnica denominada *Linkage Group Selection* que permite detectar mutações num ou vários genes em parasitas fármaco-resistentes sem uma ideia pré-concebida sobre os genes envolvidos (Culleton *et al.*, 2005).

Numa tentativa de identificar potenciais mecanismos de resistência à artemisinina e seus derivados, no decorrer deste trabalho foram estudados vários genes, que incluíram candidatos previamente apontados como potenciais moduladores de susceptibilidade à artemisinina e derivados (*pfprt*, *pfmdr1*, *pfctcp*, *pfATPase6* e *pfubp-1*) bem como genes que codificam proteínas envolvidas nos mecanismos de defesa ao *stress* oxidativo, propostos no âmbito deste estudo (*pfsod1*, *pfgst*, *pfygc*, *pfgr*, *pfgpx*, *pftrx1*, *pftrx2* e *pfprx*).

I.6 – OBJECTIVOS

Inserido no contexto da problemática da resistência aos antimaláricos e dum possível surgimento de resistência à artemisinina e seus derivados, este trabalho teve como finalidade investigar diversos aspectos do fenótipo e genótipo de resistência à artemisinina e seus derivados em *Plasmodium falciparum*. Para tal, foram contemplados os seguintes objectivos científicos específicos:

- Seleccionar *in vitro* parasitas de *Plasmodium falciparum* resistentes à artemisinina.
- Realizar um estudo multicêntrico de avaliação da susceptibilidade *in vitro* aos derivados da artemisinina em populações naturais de *Plasmodium falciparum* de África e América do Sul.
- Realizar uma análise genética *multilocus* para identificação de potenciais mecanismos de resistência à artemisinina e seus derivados, na estripe seleccionada e nas populações naturais de *Plasmodium falciparum*.

II – MATERIAL E MÉTODOS

No intuito de facilitar a apresentação deste capítulo, este será dividido em 5 secções:

II.1 – Definições

II.2 – Material biológico e antimaláricos

II.3 – Análise genética

II.4 – Estudos de avaliação da susceptibilidade *in vitro* aos derivados da artemisinina e amodiaquina em populações naturais de *P. falciparum*

II.5 – Selecção *in vitro* de parasitas de *P. falciparum* resistentes à artemisinina

II.1 – DEFINIÇÕES

Alelo: Forma alternativa de um gene que determina a expressão de uma característica particular, pode referir-se à forma selvagem ou a uma forma mutante.

Allele-specific PCR: PCR modificado que permite a amplificação específica dum determinado alelo que difere por exemplo num só par de bases.

Aminoácido: Unidade fundamental das proteínas. As proteínas são constituídas por cadeias de centenas ou milhares de aminoácidos (Tabela 4).

Amplificação: Sequência amplificada no processo de PCR.

Background: Fluorescência não específica da reacção, devido por exemplo à presença de elevada quantidade de DNA de cadeia dupla que interage com o *SYBR Green I*.

Baseline: Ciclos iniciais do PCR em tempo real durante os quais não se verifica alteração significativa no sinal de fluorescência (normalmente vai do ciclo 3 ao 15).

Bioinformática: Uso de matemática aplicada, informática, estatística e ciência da computação para estudar sistemas biológicos. As principais áreas de pesquisa incluem alinhamento de sequências, descoberta de genes, montagem de genomas, alinhamento e previsão da estrutura proteica, previsão da expressão génica e interacções proteína-proteína.

MATERIAL E MÉTODOS

Calibrador: Amostra de referência utilizada na quantificação relativa, com a qual são comparadas todas as amostras em análise. Por exemplo, o calibrador na estimativa do nº de cópias tem de possuir uma única cópia de cada gene.

Clonagem: Produção de um grupo de células ou organismos geneticamente idênticos descendentes de um mesmo indivíduo por reprodução assexual; produção de clones.

Clone: Conjunto de parasitas de *Plasmodium falciparum* derivados de único indivíduo por reprodução assexual; representa uma população de parasitas geneticamente idênticos.

Cromossomas: Estrutura genética auto-replicante que contém o DNA celular.

Ct (*Threshold Cycle*): Ciclo em que a curva de amplificação cruza a linha *Threshold*. A linha *Threshold* representa o ponto em que a reacção atinge uma intensidade de fluorescência superior à do *background*, localiza-se na fase exponencial de amplificação.

Curva de amplificação: Curva que representa a variação da quantidade de ácido nucleico durante a fase exponencial do PCR em tempo real, desenhada a partir do gráfico de amplificação: número do ciclo vs sinal de fluorescência.

Curva de dissociação: Curva obtida no final do PCR em tempo real quando o aparelho aumenta progressivamente a temperatura resultando na dissociação das cadeias de DNA e diminuição da fluorescência. A diminuição de fluorescência e Temperatura de dissociação da cadeia dupla de DNA é registada e desenhada a respectiva curva de dissociação. Quando se utiliza *SYBR Green I*, assim que o fragmento é aquecido, uma súbita diminuição na fluorescência é detectada quando a *T_m* é atingida (devido á dissociação das cadeias de DNA e libertação do *SYBR Green I*). Este ponto é o pico de dissociação ou pico de *melting*.

Cultura *in vitro*: As culturas têm por finalidade manter as células vivas e assegurar a sua proliferação ou desenvolvimento *in vitro*, em condições controladas.

MATERIAL E MÉTODOS

ΔC_t : Diferença entre o valor do C_t do gene alvo e o valor do C_t do gene normalizador (*housekeeping gene*); $\Delta C_t = C_t$ gene alvo – C_t gene normalizador.

$\Delta\Delta C_t$: Diferença entre o valor da média do ΔC_t da amostra em análise e o valor da média do ΔC_t do calibrador; $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ amostra em análise – ΔC_t calibrador.

Dímeros de primers: Dois primers que se ligam formando uma região de cadeia dupla devido à complementaridade das suas sequências. Esta ligação diminui a eficiência da reacção de PCR.

Eficiência (E): A eficiência de amplificação da reacção de PCR em tempo real é calculada pela equação $E = 10^{(-1/\text{declive})} - 1 \times 100$. A reacção deve ter uma eficiência entre 90-100%.

Eficiência relativa: Comparação das eficiências das reacções de amplificação do gene alvo e do gene normalizador. É verificada pelo cálculo do valor absoluto do declive da recta ($|m|$), sendo que a eficiência relativa é óptima quando $|m| < 0,1$.

Enzima de restrição: São enzimas que actuam como uma espécie de “bisturi” genético, reconhecendo uma sequência específica de bases numa molécula de DNA, e clivando a molécula naquela sequência ou próximo dela. A sequência de reconhecimento é chamada de local de restrição.

Fenótipo: Conjunto das propriedades visíveis ou quantificáveis de um organismo ou célula, em função do seu genótipo. O fenótipo de um organismo manifesta-se como resultado de factores genéticos e ambientais. Assim, organismos que possuem o mesmo genótipo podem apresentar diferentes fenótipos devidos a factores ambientais. Da mesma forma, organismos com o mesmo fenótipo podem ter genótipos diferentes.

Hematócrito: Volume ocupado pelas hemáceas num determinado volume de sangue, em percentagem.

Haplótipo: Conjunto de marcas genéticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Gene: Unidade de informação hereditária que corresponde a uma sequência de ácido nucleico contendo informação relativa a uma determinada cadeia polipeptídica ou a um RNA estável, como rRNA ou tRNA.

Gene normalizador (*housekeeping gene*): Gene em que o seu nº de cópias e/ou a sua expressão é constante em todas as amostras a analisar; o que permite a normalização quantitativa dos dados do PCR em tempo real.

Genes ortólogos: Genes equivalentes em espécies diferentes que evoluíram dum ancestral comum por especiação.

Genoma: Conjunto de material genético de uma célula, isto é conjunto de todos os genes que um dado organismo contém nos seus cromossomas e nas mitocôndrias.

Genótipo: Conjunto dos factores genéticos responsáveis pelo aparecimento das características específicas do fenótipo, corresponde à sequência dos nucleótidos no genoma de um organismo.

Isolado: Conjunto de parasitas de *Plasmodium falciparum* colhidos a partir de um indivíduo infectado. Um isolado pode conter mais do que uma população parasitária.

Mismatch primers: São utilizados na análise de polimorfismos que não permitem locais de restrição naturais. É introduzida uma base mutada próxima de 3' que vai criar um local de restrição artificial ou permitir a amplificação específica dum determinado alelo.

Mutação: Alteração permanente e transmissível hereditariamente na sequência do ácido nucleico constituinte de um genoma.

Mutações pontuais: Mutações que afectam uma posição única da sequência de nucleótidos de um determinado gene.

População: Conjunto de indivíduos da mesma espécie que vivem numa área e num momento determinado, mantendo entre si uma certa independência.

MATERIAL E MÉTODOS

Primer: Cadeia curta de oligonucleótidos complementar a uma sequência específica do DNA alvo, à qual novos nucleótidos podem ser adicionados pela ação da enzima DNA polimerase.

Proteínas homólogas: Proteínas que evoluíram a partir de um ancestral comum, a sua relação evolucionária é evidente pelas semelhanças nas sequências, estrutura e/ou função.

Sequenciamento: Determinação da ordem dos nucleótidos num ácido nucleico.

Rn: Sinal de fluorescência normalizado. A normalização é obtida dividindo a intensidade de fluorescência emitida pelo *SYBR Green I* pela intensidade de fluorescência emitida pelo fluoróforo de referência passivo.

Temperatura de dissociação ou Temperatura de *melting* (T_m): Temperatura à qual 50% do DNA de cadeia dupla se torna em DNA de cadeia simples. Cada molécula de DNA de cadeia dupla tem a sua T_m específica, que depende do comprimento da cadeia e do seu conteúdo em G e C.

Tabela 4 – 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

II.2 – MATERIAL BIOLÓGICO E ANTIMALÁRICOS

II.2.1 – Clones de referência de *Plasmodium falciparum*

Neste trabalho foi utilizado como modelo experimental o parasita *P. falciparum* mantido em cultura *in vitro* e crioconservado no Laboratório da UEI Malária/ Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais L.A. Os clones de referência utilizados, previamente caracterizados fenotipicamente relativamente à sua susceptibilidade a diversos fármacos foram os seguintes: HB3, 3D7 e Dd2 (Tabela 5).

Tabela 5 – Clones de referência de *P. falciparum*

Clone	Origem	Fenótipo	
		Sensível	Resistente
HB3	Honduras	cloroquina mefloquina quinino	-
3D7	Origem desconhecida	cloroquina mefloquina quinino	-
Dd2	Indochina	-	cloroquina mefloquina quinino

II.2.2 – Isolados de *Plasmodium falciparum*

Os isolados de *P. falciparum*, utilizados neste trabalho, foram colhidos em diferentes zonas endémicas de malária: Ruanda, República Democrática de São Tomé e Príncipe e Brasil.

II.2.3 – Antimaláricos

Os antimaláricos utilizados neste trabalho foram a artemisinina, o artesunato, o artemeter e a amodiaquina.

A artemisinina e o artesunato foram doados pela Dafra Pharma (Eeerse, Belgium) e o artemeter foi doado pela Novartis. A amodiaquina foi adquirida à Sigma-Aldrich.

II.3 – ANÁLISE GENÉTICA

II.3.1 – Genes analisados

Os genes analisados no âmbito do presente estudo estão representados na Tabela 6, onde para cada caso se descreve a respectiva localização cromossômica e o resumo da análise efectuada: pesquisa de polimorfismos por sequenciação e/ou PCR-RFLP (SNPs); estimativa do nº de cópias do gene por PCR em tempo real (Nº cópias); avaliação dos níveis de expressão do gene por PCR em tempo real (Expressão); pesquisa de polimorfismo de tamanho por PCR ou sequenciação (Tamanho).

Tabela 6 – Genes analisados

Gene	Abreviatura	Cromossoma	Pesquisa
actin (housekeeping)	<i>β-actin1</i>	12	-
multidrug resistance protein	<i>mdr1</i>	5	SNPs Nº cópias Expressão
calcium-transporting ATPase (SERCA)	<i>ATPase6</i>	1	SNPs Nº cópias
histamine-releasing factor, putative	<i>tctp</i>	5	SNPs Nº cópias
glutathione peroxidase	<i>gpx</i>	12	Nº cópias
glutathione reductase	<i>gr</i>	14	Nº cópias
glutathione S-transferase	<i>gst</i>	14	SNPs Nº cópias
gamma-glutamylcysteine synthetase	<i>gcs</i>	9	Tamanho
fe-superoxide dismutase	<i>sod1</i>	8	SNPs Nº cópias
trx peroxidase (2-Cys peroxiredoxin)	<i>trx1</i>	14	SNPs Nº cópias
thioredoxin peroxidase	<i>trx2</i>	12	SNPs Nº cópias
peroxiredoxin	<i>prx</i>	7	Nº cópias
chloroquine resistance transporter	<i>crt</i>	7	SNPs
ubiquitin-specific protease	<i>ubp-1</i>	1	SNPs Tamanho

II.3.2 – Extracção de DNA

A extracção de DNA a partir do sangue em papel de filtro dos isolados e dos clones de referência de *P. falciparum* foi realizada utilizando um método de extracção com Chelex (Plowe *et al.*, 1995). Sumariamente, foi colocado um pedaço de papel de filtro contendo a amostra de sangue num tubo de estéril de 1,5 ml, devidamente identificado, ao qual se adicionou 1ml saponina 0,5% em PBS (Sigma™) com incubação a 4°C durante aproximadamente 12 horas. Efectuou-se uma lavagem com PBS e nova incubação a 4°C, durante 15 a 30 minutos após a qual se adicionou 50 µl de uma solução de Chelex a 20% (Biorad™). As amostras foram posteriormente incubadas a 100°C durante 10 minutos seguindo-se duas centrifugações (10 000 x g/ 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.

II.3.3 – Extracção de RNA total

O RNA foi extraído a partir de culturas *in vitro* não sincronizadas com uma parasitémia de aproximadamente 10%. As amostras foram colhidas dos frascos de cultura (Nunc™) com pipetas esterilizadas, colocadas em tubos de 15 ml (Sarsted™) e posteriormente armazenadas a -70°C.

A extracção de RNA foi realizada utilizando o *kit* de extracção de RNA, AquaPure RNA isolation *kit* da BioRad™, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. As soluções utilizadas foram preparadas com água bidestilada tratada com DEPC, um inibidor da actividade das RNases (enzimas degradantes de RNA). Todo o material utilizado para manipulação das amostras, assim como as bancadas de trabalho, foram submetidos a um tratamento prévio com RNase OUT™ (Gibco™).

II.3.3.1 – Verificação da integridade do RNA

A verificação da integridade do RNA antes da síntese de cDNA foi realizada pela sua visualização em gel de agarose a 1,5%. O gel de agarose a 1,5% foi preparado juntando

MATERIAL E MÉTODOS

agarose (Gibco™) a TBE 1X e dissolvendo por aquecimento. Após dissolução, adicionou-se o brometo de etídio (Sigma™) a uma concentração final de 0,1 µg/ml. De seguida prepararam-se as amostras adicionando-se 3 µl de *RNA loading buffer* (2X) (Fermentas™) a 3 µl de cada amostra de RNA e aquecendo-se a 70°C durante 10 minutos. As amostras foram arrefecidas em gelo e aplicadas no gel preparado previamente. A electroforese ocorreu a 120 V/cm durante aproximadamente 1 hora e o gel foi visualizado num transiluminador *Eagle Eye II* (Stratagene™).

II.3.4 – Síntese de cDNA

II.3.4.1 – Tratamento do RNA total com *DNaseI*

Com o objectivo de eliminar o DNA contaminante de modo a evitar a sua interferência nas reacções de PCR feitas a partir do cDNA sintetizado, as amostras de RNA foram tratadas com 1U de *DNaseI* (Fermentas™) e incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente. A reacção foi interrompida pela adição de 1 µl de EDTA 25 mM (Fermentas™) e incubação a 65°C durante 5 minutos.

II.3.4.2 – Transcrição reversa

A transcrição reversa (RT-PCR) do RNA para cDNA foi realizada num volume de reacção de 20 µl: a 10 µl de RNA tratado com *DNaseI* foram adicionados 2 µl de OligoDT₁₅ (Roche™) ao qual se seguiu um período de incubação de 5 minutos a 70°C. As amostras foram arrefecidas em gelo e adicionou-se 4 µl de tampão M-MuLV-RT (5x) (Fermentas™), 1 µl *RiboLock*™ (40U/µl) (Fermentas™) e 2 µl dNTPs (10mM) (Fermentas™), seguido de nova incubação de 5 minutos a 37°C. Subsequentemente, adicionou-se 1 µl de enzima M-MuLV-RT (200U /µl) (Fermentas™) e procedeu-se a uma incubação a 42°C durante 60 minutos. Por fim, a reacção foi interrompida pela inactivação da enzima através de incubação a 70°C durante 10 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C.

A avaliação da quantidade e qualidade do cDNA sintetizado e o controlo da eficiência do tratamento com *DNaseI* foi realizado por uma reacção de PCR, para a qual se utilizou como molde o cDNA e o RNA tratado com *DNaseI*.

II.3.5 – Desenho de *primers*

Para este trabalho foram desenhados *primers* para todas as reacções de sequenciação de DNA, PCR em tempo real, ou PCR-RFLP. Para todos os casos foi seguido o mesmo procedimento base, descrito seguidamente. A base de dados do genoma do *Plasmodium falciparum*, disponível em *Plasmodium falciparum* GeneDB (<http://www.genedb.org/genedb/malaria/blast.jsp>), foi utilizada para se acessar e retirar as sequências de interesse que serviram como molde para o desenho de todos os *primers* utilizados neste trabalho. Os *primers* foram desenhados manualmente para cada gene e as propriedades principais relativas à sua sequência foram avaliadas recorrendo a uma interface informática disponível *on-line*: *Oligonucleotide Properties Calculator* (<http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligo.html>). Deste modo, os seguintes critérios fundamentais foram tomados em consideração:

- Minimização da probabilidade de ocorrência de complementaridade na sequência: a formação de hetero-dímeros ou homo-dímeros estáveis entre os *primers*, bem como a existência de auto complementaridade podem diminuir o rendimento e a especificidade da reacção de PCR;
- Tamanho da sequência do *primer*: oligonucleótidos com 18 a 24 pb têm tendência a ser bastante específicos mantendo custo-efectividade;
- Temperatura de *melting* (*T_m*): temperatura de dissociação do par *primer*/ sequência alvo e é um factor muito importante na especificidade da reacção de PCR;
- Conteúdo em Guanina/ Citosina (G/C): idealmente a composição de um *primer* deve apresentar um conteúdo de G/C entre 45 e 50%, se bem que devido à predominância de A e T no genoma, nem sempre é atingível.

A inclusão de um ou dois resíduos G ou C na extremidade 3' permite reduzir a possibilidade de hibridações inespecíficas e diminuição da eficiência, uma vez que as ligações estabelecidas entre resíduos G/C são mais fortes do que entre A/T.

No caso do PCR em tempo real, foi também critério para o desenho dos *primers* o tamanho dos amplicões resultantes que deverá conter idealmente entre 50 e 250 pbs.

Todos os *primers* foram sintetizados por encomenda à empresa MWG-Biotech AG.

II.3.6 – Sequenciação de DNA

No intuito de pesquisar polimorfismos genéticos *de novo*, foi utilizada uma estratégia de sequenciação de DNA onde se combinou uma aproximação bioinformática e laboratorial à semelhança daquela descrita na secção anterior. Deste modo, as sequências dos genes alvo foram extraídas das bases de dados e foram utilizadas como alvo para o desenho de *primers* que flanqueassem o gene completo ou áreas de interesse. Estes *primers* foram utilizados em amplificações por PCR, utilizando inicialmente como molde, DNA dos clones de referência de *P. falciparum* Dd2 e 3D7 de modo a verificar o sucesso da metodologia. Após amplificação por PCR, a qualidade e concentração dos produtos de PCR de cada gene ou fragmento foram avaliados por electroforese em gel de agarose e posteriormente purificados utilizando um *kit* comercial [*QIAquick PCR Purification kit* (QiagenTM)], seguindo o protocolo do fabricante. Os productos de PCR assim purificados serviram de molde em reacções de sequenciação levadas a cabo pela empresa MACROGEN[®] ou STABVIDA[®].

Para cada gene ou fragmento foram obtidas sequências de DNA de ambos os *primers forward* e *reverse* as quais foram alinhadas para verificar a existência de polimorfismos.

A análise das sequências obtidas foi realizada recorrendo a um programa de alinhamento de múltiplas sequências disponível na *Internet* (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) (Corpet, 1988). A resolução de possíveis ambiguidades na sequência foi efectuada através da inspecção do cromatograma respectivo.

II.3.7 – PCR – *Polymerase Chain Reaction*

Os PCRs para amplificação da sequência total ou fragmentos dos genes em estudo foram desenvolvidos e/ou optimizados no âmbito deste trabalho. Nas reacções de amplificação, utilizou-se a seguinte mistura de reacção: 0,5µM de cada *primer*, 1X tampão de PCR (FermentasTM), 2,5mM MgCl₂ (FermentasTM), 0,2mM dNTP's

(Fermentas™) e 0,05U/μl de *Taq DNA polymerase* (Fermentas™), adicionando-se 1 μl de DNA molde. As condições das reacções de PCR utilizadas na amplificação e as sequências dos respectivos *primers* estão descritas nos Anexos 7 e 8.

II.3.8 – Identificação dos polimorfismos genéticos por RFLP

Alguns polimorfismos genéticos foram identificados através da utilização de enzimas de restrição, que reconhecem especificamente um local de restrição originado ou abolido por determinado polimorfismo (Tabela 7).

Nos casos em que os polimorfismos em análise não causavam locais de restrição naturais recorreu-se a um método denominado PIRA-PCR (*Primer Introduced Restriction Analysis-PCR*). Sumariamente, esta técnica baseia-se na introdução de um local de restrição artificial num produto de PCR pelo uso de um *primer* com um *mismatch* de uma das bases próxima de 3' (Ke *et al.*, 2001).

As digestões enzimáticas foram realizadas de acordo com os protocolos dos fornecedores dos reagentes. As incubações das misturas de reacção foram efectuadas à temperatura recomendada para cada enzima, durante 4 a 16 horas, dependendo da eficiência de corte de cada enzima. A inactivação da reacção foi realizada por actividade da temperatura a 4°C.

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 7 – Informações acerca dos PCR-RFLP para detecção dos SNPs

Gene	SNP	Mutação	Enzima de restrição	**Alelo reconhecido	Tamanho do fragmento esperado após restrição (pb)	
<i>pfmdr1</i>	N86Y	N => Y	ApoI	86N	N 246	Y 321
		<u>A</u> AT => <u>T</u> AT	(New England BioLabs™)		75	
	N1042D	N => D	AseI	1042N	N 116	D 162
		<u>A</u> AT => <u>G</u> AT	(New England BioLabs™)		46*	26*
					26*	
	D1246Y	D => Y	Eco321	1246Y	D 508	Y 268
		<u>G</u> AT => <u>T</u> AT	(Fermentas™)			240
<i>pfcr1</i>	K76T	K => T	ApoI	76K	K 137	T 261
		<u>A</u> AA => <u>A</u> CA	(New England BioLabs™)		124	10*
					10*	
<i>pf sod1</i>	D84G	D => G	MvaI	84G	D 544	G 308
		<u>G</u> AT => <u>G</u> GT	(Fermentas™)			236
<i>pfATPase6</i>	R37K	R => K	MboII	37R	R 103	K 143
		<u>A</u> GA => <u>A</u> AA	(Fermentas™)		94	94
					92	92
					40*	
	G639D	G => D	PagI	639D	G 166	D 144
		<u>G</u> GC => <u>G</u> AC	(Fermentas™)			22*
	S769N	S => N	BspTI	769S	S 250	N 272
		<u>A</u> GT => <u>A</u> AT	(Fermentas™)		22*	
	T2694A#	T => A	TasI	2694T	T 142	A 181
		<u>A</u> TT => <u>A</u> TA	(Fermentas™)		39*	1*
				1*		

Legenda: # - polimorfismo referente a um nucleótido, não ao número dum aminoácido, representando uma mutação sinónima; ** - Alelo que representa o palindroma reconhecido pela enzima de restrição; * - banda não visível no gel de agarose, devido ao seu pequeno tamanho.

II.3.9 – Electroforese em gel de agarose

A electroforese em gel de agarose foi utilizada neste trabalho para visualizar e quantificar os produtos amplificados por PCR e para visualizar os produtos resultantes das digestões com as enzimas de restrição. A um determinado volume de DNA amplificado ou restringido adicionou-se tampão de aplicação, 6X *Mass Ruler Loading Dye Solution* (Fermentas™) e aplicou-se esta mistura em cada “poço” do gel de agarose. Foram utilizados géis de agarose a 2% para os produtos amplificados por PCR e a 3% para os produtos restringidos, no intuito de obter melhor resolução na separação de bandas. Os géis foram preparados dissolvendo a agarose (Gibco™) em TBE 1X e adicionando brometo de etídio (Sigma™) a uma concentração final de 0,1 µg/ml, que permitiu a visualização do DNA sob luz ultravioleta. Foi utilizado o marcador de peso molecular *MassRuler™ DNA Ladder, Low Range* (Fermentas™).

Todas as electroforeses foram realizadas em tina horizontal contendo TBE 1X (Anexo1) durante aproximadamente 90 minutos, a 140 V/cm. Os géis foram observados e fotografados num transiluminador *Eagle Eye II* (Stratagene™).

II.3.10 – Análise estatística

Com o objectivo de avaliar uma possível correlação entre os diferentes polimorfismos estudados e a susceptibilidade dos isolados aos antimaláricos testados, tendo em consideração o número de variáveis e a dimensão da amostra, o teste estatístico seleccionado para o tratamento das amostras foi o teste de *Fisher*. Este teste permite calcular o valor da probabilidade exacta para a determinação da associação entre duas variáveis, sendo estas a susceptibilidade (R/S) aos antimaláricos e os diferentes polimorfismos analisados.

Os dados foram agrupados numa tabela de contingência de duas entradas e foi analisada a significância estatística pelo teste de *Fisher*, recorrendo a um programa disponível *on-line* (<http://faculty.vassar.edu/lowry/fisher.html>), as associações foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $P \leq 0,05$.

II.3.11 – Predição da topologia membranar da proteína PfATPase6 e dos seus domínios funcionais

A predição da topologia membranar da proteína PfATPase6 foi realizada utilizando o programa informático *TMHMM Server* v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>), através do qual se obteve as posições das hélices transmembranares preditas da proteína, bem como os seus domínios extra-membranares.

A disposição dos domínios funcionais da proteína PfATPase6 foi obtida recorrendo a um programa informático (Finn *et al.*, 2006), disponível *on-line* (<http://pfam.sanger.ac.uk/search?tab=searchSequenceBlock>).

II.3.12 – PCR em tempo real

A metodologia de PCR em tempo real com detecção com *SYBR Green I* foi utilizada neste trabalho para efectuar a estimativa do número de cópias e a avaliação dos níveis de expressão de determinados genes em estudo.

II.3.12.1 – Condições do PCR em tempo real

As reacções de PCR em tempo real foram efectuadas no aparelho GenAmp 5700 SDS[®] (Applied BiosystemsTM), utilizando o programa de termociclador predefinido: 10 minutos de incubação inicial a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. As reacções individuais foram realizadas num volume de 20 µl em placas de 96 poços (Applied BiosystemsTM), contendo: 1x tampão (10x), 3,5mM de MgCl₂, 200µM dNTPs, 0,025U/µl enzima e 1:66000 *SYBR Green I*, adicionando-se 2 µl de cada amostra. A concentração dos *primers* foi variada nas fases iniciais de cada experiência, no intuito de se obterem reacções de eficiência otimizada. Em todas as reacções de amplificação foi utilizado um *kit* específico para PCR em tempo real: *qPCRTM Core Kit for SYBR Green I[®]* (EurogentecTM).

No final de cada reacção, foi definido manualmente o *Ct* de acordo com os valores que apresentavam os melhores parâmetros cinéticos do PCR e foram analisadas as curvas de dissociação, de modo a que se obtivesse informação sobre a especificidade.

II.3.12.2 – *Primers*

Os critérios fundamentais levados em consideração para desenho dos *primers* para o PCR em tempo real foram referidos na secção II.3.5. Neste caso, no entanto, foi necessário otimizar as concentrações de cada par de *primers* de modo a ser obtida a máxima eficiência nas reacções de amplificação. Para tal, foram efectuados ensaios com concentrações diferentes dos *primers forward* e *reverse* (300/300, 300/600, 600/300) e calculou-se a eficiência de cada reacção individual. Assim, identificaram-se as concentrações com as quais a reacção era mais eficiente, passando a operar-se em ensaios subsequentes com essas concentrações.

Para controlar a especificidade, foram analisadas os picos de dissociação dos ensaios de PCR, numa reacção específica obtém-se um único pico de dissociação que deverá corresponder à temperatura de dissociação do amplicão gerado. Nos casos em que se obtém mais do que um pico a reacção é inespecífica, ou por originar mais do que um amplicão ou por formação de dímeros de *primers*. Nestes casos, as reacções sofriam reacções de optimização adicionais ou os *primers* eram descartados, procedendo-se ao desenho de *primers* substitutos.

As sequências dos *primers* e as suas concentrações de trabalho optimizadas são apresentados no Anexo 9.

II.3.12.3 – Método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Com o objectivo de efectuar a estimativa do nº de cópias em determinados genes e quantificar relativamente os seus níveis de expressão, foi utilizado um método de quantificação denominado $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Este método foi inicialmente desenvolvido para quantificação relativa da expressão génica, tendo sido adaptado e optimizado também para o cálculo do nº de cópias no decorrer deste trabalho (Ferreira *et al.*, 2006).

Os requisitos fundamentais para a aplicação do método são a existência dum calibrador e um gene normalizador. Foi utilizado como calibrador, DNA extraído do clone de *P. falciparum* 3D7 dado que através da base de dados do genoma foi possível determinar que este clone possui uma única cópia de cada gene. O gene *pfbactinal* foi escolhido como gene normalizador (*housekeeping gene*), por ser, em princípio, constante o seu nº de cópias e a sua expressão em todas as amostras, o que permite a normalização quantitativa dos dados.

Foram realizadas um mínimo de três experiências independentes para cada gene e cada amostra. Em cada experiência foram feitos triplicados de cada amostra, e o resultado obtido foi a média dos *Ct* desses triplicados. Este valor foi aceite quando o desvio padrão dessa média era inferior a 0,38. O resultado final para cada amostra foi representado como o nº de cópias ou nível de expressão do gene alvo relativamente ao clone 3D7, pelo cálculo da média das três experiências independentes. As experiências foram repetidas quando as curvas de amplificação não eram exponenciais ou quando os valores do nº de cópias eram menores que 0,7 ou maiores que 1,3. Nos casos em que o nº de cópias se encontrava entre esses valores ($0,7 < N < 1,3$), assumiu-se que a amostra em análise possuía uma cópia única do gene alvo.

II.3.12.3.1 – Validação do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

A utilização do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ como método de quantificação requer que sejam cumpridos dois princípios fundamentais:

- i) As reacções de amplificação dos genes alvo e gene normalizador deverão ser eficientes, isto é, apresentarem uma eficiência aproximada a 100%;
- ii) A eficiência da reacção de amplificação do gene alvo deve ser aproximadamente igual à eficiência da reacção de amplificação do gene normalizador.

II.3.12.3.1.1 – Cálculo das eficiências das reacções de amplificação

O cálculo da eficiência das reacções de amplificação relativas a cada gene foi feita pela observação da variação dos *Ct* com diluições seriadas de DNA. Para tal, o DNA do clone 3D7 foi diluído em série de 1:10 ($1, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$ e 10^{-4}) e foi medido o *Ct* de cada diluição. A partir dos valores obtidos desenhou-se um gráfico reproduzindo o

logaritmo das diluições do DNA vs Ct , e calculou-se a equação da recta ($y=mx + b$). As eficiências das reacções de PCR (E) foram calculadas com recurso aos declives da recta (m) obtidos em cada gráfico, utilizando a equação $E=10^{(-1/\text{declive})} - 1 \times 100$, onde E = 100 corresponde a uma eficiência de 100%.

II.3.12.3.1.2 – Comparação das eficiências das reacções de amplificação do gene alvo e do gene normalizador (eficiência relativa)

No intuito de verificar se as eficiências de reacção do gene alvo e do gene normalizador (*pfβactinal*) eram aproximadamente iguais, observou-se a variação do ΔCt (Ct gene alvo – Ct *pfβactinal*) ao longo das diluições seriadas do DNA. Para tal foram efectuadas reacções de amplificação com *primers* do gene alvo e do gene *pfβactinal* nas mesmas amostras (diluições seriadas do DNA do clone 3D7). Seguidamente foi calculada a média dos Ct a cada diluição e determinou-se o ΔCt . Com esses valores desenhou-se um gráfico: logaritmo das diluições do DNA vs ΔCt , a partir do qual se obteve a equação da recta e o respectivo declive (m). As eficiências das reacções foram consideradas aproximadamente iguais, ou seja eficiência relativa óptima, quando o valor absoluto do declive da recta correspondia a um valor menor que 0,1 ($|m| < 0,1$).

III.3.12.4 – Validação dos ensaios de avaliação do n° de cópias

No intuito de maximizar a confiança sobre a interpretação e validade dos resultados obtidos, efectuou-se a cada ensaio uma estimativa em paralelo do n° de cópias do gene *pfmdr1* no clone de *P. falciparum* Dd2, relativamente ao clone de *P. falciparum* 3D7.

Tal como mencionado anteriormente, clone 3D7 possui uma única cópia do gene *pfmdr1* enquanto o clone de Dd2 é conhecido por possuir 4 cópias (Cowman *et al.*, 1994). Assim, a cada ensaio, um valor observado correspondente ao resultado esperado permitiu interpretar e aceitar os resultados com confiança adicional.

II.4 – ESTUDOS DE AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* AOS DERIVADOS DA ARTEMISININA E AMODIAQUINA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *P. falciparum*

II.4.1 – Descrição dos locais de colheita

II.4.1.1 – Ruanda

O estudo foi realizado em Rukara, uma região rural localizada na fronteira oriental do Ruanda. Os isolados de *Plasmodium falciparum* foram colhidos entre Novembro e Dezembro de 2003, no Centro de Saúde de Rukara, em indivíduos infectados com malária antes de receberem o tratamento (amodiaquina + sulfadoxina-pirimetamina).

A selecção e colheita dos isolados, realização dos testes de avaliação da susceptibilidade *in vitro* aos antimaláricos em estudo, havia sido realizada previamente a este trabalho pelos colegas do Institut de Recherche en Sciences de la Santé, Bobo Dioulasso, Burkina Faso e Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, Antwerpen, Belgium.

As amostras em papel de filtro, bem como os dados fenotípicos relativos aos antimaláricos em estudo foram gentilmente cedidos para realização deste trabalho.

II.4.1.2 – República Democrática de São Tomé e Príncipe

Este estudo foi realizado em parceria com o Ministério da Saúde da República Democrática de São Tomé e Príncipe, na cidade de São Tomé.

A selecção e colheita de amostras de sangue de indivíduos infectados com malária foram efectuadas no Centro de Saúde de Água Grande da cidade de São Tomé, durante o período compreendido entre os dias 15 e 30 de Abril de 2004. A realização dos testes de avaliação de susceptibilidade *in vitro* aos antimaláricos foi levada a cabo no Centro Nacional de Endemias de São Tomé e Príncipe.

II.4.1.3 – Brasil, Estado do Pará

O estudo foi realizado em parceria com o Instituto Evandro Chagas de Belém, na cidade de Tucuruí, Brasil.

A selecção e colheita de isolados de *P. falciparum* foram efectuadas no Posto de Liler Leão em Tucuruí PA, de 19 de Setembro e 6 de Outubro de 2005 e os testes de avaliação de susceptibilidade *in vitro* aos antimaláricos foram materializados num laboratório situado no Hospital Regional de Tucuruí.

II.4.2 – Selecção dos isolados

O processo de selecção dos isolados foi realizado nos locais onde se pesquisava infecção por *Plasmodium spp* em indivíduos com sintomas de malária. Estes eram inicialmente observados pelas equipas médicas locais sendo a pesquisa de parasitas efectuada por microscopia óptica através da observação de esfregaços sanguíneos fixados com metanol (Merck™) e corados com Giemsa a 20% (Merck™). Esta amostra de sangue era colhida por punção digital, efectuada com lancetas.

Após confirmação de mono-infecção por *P. falciparum*, foi efectuado um inquérito a cada indivíduo (Anexos 4, 6) baseado nos critérios de inclusão predefinidos pela O.M.S. relativos a testes de avaliação susceptibilidade *in vitro*: i) infecção por *P. falciparum*; ii) parasitémia entre 1 000 – 80 000 parasitas / μ l de sangue; iii) não possuir sinais clínicos de outras infecções; iv) respeitar os períodos de toma dos antimaláricos (Tabela 8).

Aos indivíduos passíveis de inclusão no estudo, foram explicados os objectivos do trabalho e obtido consentimento informado (Anexos 3, 5). Este estudo não incluiu crianças com idades inferiores a dois anos e a aprovação para inclusão no estudo de menores de dezoito anos foi dada pelos pais.

Para este trabalho foram obtidas autorizações éticas das instituições envolvidas, bem como de todos os participantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 8 – Período decorrido desde a última toma de antimalárico

Antimalárico	Período (dias)
quinino, artemisinina e derivados	7
4 - aminoquinoleínas	14
pirimetamina e/ou sulfaminas	28
mefloquina	56

II.4.3 – Colheita dos isolados

A colheita das amostras de sangue dos indivíduos seleccionados para os estudos foi realizada por técnicos de saúde credenciados das instituições envolvidas no trabalho. Foram colhidos cerca de 5 ml de sangue venoso de cada indivíduo em *Monovettes* de 9 ml com EDTA (Sarstedt™). Todos os indivíduos seleccionados foram tratados de acordo com as normas de saúde locais imediatamente após a colheita de sangue venoso. Do volume total de sangue venoso colhido aproximadamente 500 µl foram colocados em papel de filtro *Whatman* nº 4, devidamente identificados e secos à temperatura ambiente que foram posteriormente acondicionados individualmente em embalagens plásticas e armazenados à temperatura ambiente em contentores com sílica gel. O sangue restante foi usado para os testes de avaliação da susceptibilidade *in vitro* aos antimaláricos em estudo.

II.4.4 – Preparação das soluções de trabalho dos antimaláricos

A preparação das soluções de trabalho dos antimaláricos foi realizada da seguinte forma: inicialmente procedeu-se à dissolução do artesunato em etanol a 70% (Merck™), do artemeter em metanol (Merck™), e da amodiaquina em metanol a 50% e esterilizaram-se estas soluções por filtração (filtros 0,2 µm, Millipore™). Posteriormente, por diluições sucessivas em meio de cultura (Anexo 1), foram obtidas as concentrações finais (Tabela 9).

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 9 – Concentrações de antimalárico utilizadas nos testes de avaliação da susceptibilidade *in vitro* a antimaláricos

Antimalárico	Concentrações (nM)							
amodiaquina	0	1,25	3,75	11,26	33,8	101,3	304	912
artemeter	0	0,2	0,6	1,8	5,4	16,2	48,6	146
artesunato	0	0,05	0,15	0,45	1,35	4,0	12,2	36,5

II.4.5 – Método do microteste da O.M.S. (W.H.O., 1997)

Os testes *in vitro* foram realizados segundo a metodologia de MARK III, O.M.S. (W.H.O., 1997).

O procedimento para preparação da amostra a ser utilizada nos testes de avaliação da susceptibilidade *in vitro* foi o seguinte: o sangue infectado foi sujeito a duas “lavagens” com meio de cultura para retirar o plasma e os glóbulos brancos, após as quais lhe foi adicionado meio de cultura na proporção de 1:1. Quando necessário, o sangue foi diluído com eritrócitos não parasitados de modo a que a parasitemia inicial se aproximasse de 0,5% (0,3% - 0,8%).

Para realização dos testes foram utilizadas placas de cultura de 96 poços de fundo raso (Sarstedt™). Em cada poço foram colocados 90 µl de cada fármaco à concentração desejada, no sentido vertical por ordem crescente de concentração. Seguidamente foi colocado em cada poço 10 µl de sangue infectado de cada isolado. Foram efectuados duplicados de cada fármaco para cada uma das amostras (Figura 9). Após a preparação das placas, estas foram colocadas no excicador onde se criou uma atmosfera rica em CO₂ (através da combustão de velas no seu interior fechado) e incubou-se o excicador contendo as amostras numa estufa a 37°C (±0,5°C) durante 24-30 horas. Esta variação de tempo está relacionada com o grau de desenvolvimento dos trofozoítos no início do ensaio, do qual depende a sua maturação até ao estágio de esquizonte. Decorrida a incubação, aspirou-se e rejeitou-se o sobrenadante de cada poço e efectuaram-se gotas espessas em lâminas usando o *pellet* correspondente (Figura 9). As lâminas foram deixadas a secar durante 24 horas, fixadas com acetona e coradas com Giemsa 1% (Merck™) durante 1 hora.

MATERIAL E MÉTODOS

A leitura dos microtestes foi efectuada pela contagem do número de esquizontes viáveis, com 3 ou mais núcleos, num total de 200 eritrócitos parasitados. Procedeu-se à contagem do microteste quando a cultura controlo (sem fármaco), apresentava um número de esquizontes viáveis superior a 10%, confirmando o crescimento do parasita nas condições de cultura em que decorreram os ensaios. Os testes contaminados com bactérias ou fungos ou sem crescimento visível dos parasitas nos controlos (sem fármaco) foram eliminados do estudo. O resultado da leitura dos microtestes foi representado em valores de IC₅₀ nM ou seja a concentração de fármaco que inibe o crescimento de 50% dos parasitas, tendo estes valores sido determinados por análise log-probit ou regressão linear (Excel; Microsoft Redmond, WA, USA).

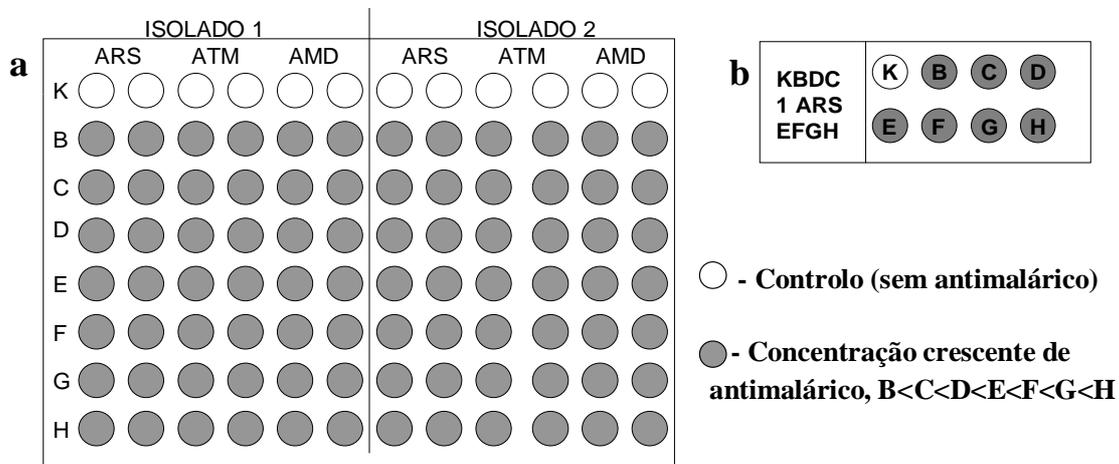


Figura 9 – a) Esquema exemplificando uma placa de microtestes de dois isolados (1 e 2) para três antimaláricos em estudo; b) Lâmina correspondente ao microteste relativo ao artesunato, do isolado 1. ARS – artesunato; ATM – artemeter; AMD – amodiaquina.

II.4.6 – Análise estatística

No intuito de averiguar se existia alguma correlação entre as respostas dos isolados aos fármacos estudados nas populações naturais de *P. falciparum*, todas as amostras testadas foram organizadas por ordem crescente dos valores dos IC₅₀ para cada fármaco e posteriormente emparelhadas entre as combinações dos diferentes fármacos. Os dados assim organizados foram então submetidos a um teste de avaliação de correlação, *Spearman Rank Order Correlation testing* (Wessa, 2007). Considerou-se existir uma correlação significativa entre as susceptibilidades de dois fármacos quando o valor de $P \leq 0,05$.

II.5 – SELECÇÃO *IN VITRO* DE PARASITAS DE *P. falciparum* RESISTENTES À ARTEMISININA

II.5.1 – Manutenção de clones de *P. falciparum* em cultura *in vitro*

Os parasitas foram mantidos no laboratório em cultura *in vitro* seguindo o método de cultivo descrito por Trager & Jensen (1976), com algumas adaptações. O princípio deste método consiste na manutenção de eritrócitos, com um inóculo de parasitas, numa camada estacionária superficial coberta por uma fina camada de meio, com uma baixa tensão de oxigénio, num hematócrito de 5% pela adição de eritrócitos não parasitados.

As culturas foram mantidas a 37°C, numa estufa com CO₂, procedendo-se diariamente à mudança de meio de cultura; foram adicionados eritrócitos não parasitados em intervalos regulares de três a quatro dias, dependendo da parasitémia da cultura, de forma a manter o hematócrito estável a 5%.

A parasitémia e a fase de desenvolvimento dos parasitas foram avaliadas pela observação por microscopia óptica de esfregaços sanguíneos, efectuados diariamente e corados com Giemsa 20% (Merck™). Os protocolos da preparação do meio de cultura e dos eritrócitos não parasitados para manutenção das culturas estão descritos em pormenor no Anexo 2.

Todos os procedimentos inerentes à manipulação e manutenção das culturas foram realizados em condições de esterilidade e o material utilizado foi esterilizado por calor húmido (autoclave) ou calor seco (estufa), tendo os reagentes sido esterilizados por filtração (filtros 0,2 µm, Millipore™).

II.5.2 – Cálculo da parasitémia

A avaliação da parasitémia foi efectuada pela observação por microscopia óptica de esfregaços sanguíneos, corados com Gimesa a 20% (Merck™).

O seu cálculo foi efectuado pela contagem do número de eritrócitos infectados existentes no número total de eritrócitos presentes em 20 campos microscópicos e apresentada sob a forma de percentagem:

% Parasitémia = (nº de eritrócitos infectados / nº total de eritrócitos contados) X 100.

II.5.3 – Crioconservação de clones de *P. falciparum* em azoto líquido

Os parasitas resultantes das várias experiências realizadas ao longo do trabalho foram crioconservados em azoto líquido. Procedeu-se à crioconservação após verificação por microscopia óptica que a cultura possuía uma parasitémia de trofozoítos jovens (anéis) superior a 2%. Nestes casos, a cultura foi centrifugada a 2000 r.p.m. durante 5 minutos, foi-lhe retirado todo o meio de cultura por aspiração, e adicionado ao *pellet* de eritrócitos igual volume de uma solução de crioconservação (Anexo 1), gota a gota e com agitação permanente para homogeneização. Esta mistura foi transferida para uma ampola de crioconservação (Nunc™) devidamente identificada e o seu registo foi mantido na base de dados de amostras crioconservadas do CMDT/IHMT.

II.5.4 – Descongelamento de clones de *P. falciparum* crioconservados

Para realização deste trabalho foi necessário proceder-se à descongelamento de clones crioconservados, seguindo-se um processo de reconstituição de isotonia por fases (Diggs *et al.*, 1975). As ampolas de crioconservação contendo os clones foram retiradas do azoto líquido e colocadas numa estufa a 37°C até completa descongelamento. Transferiu-se o conteúdo das ampolas para tubos de centrifuga de 15 ml (Sarstedt™), e adicionou-se, lentamente e com homogeneização constante, uma solução de NaCl 12% (p/v), deixando repousar durante 3 minutos. Posteriormente, foi adicionado NaCl 1,6% (p/v) e procedeu-se a uma centrifugação a 2000 r.p.m. durante 5 minutos. Rejeitou-se o sobrenadante e adicionou-se ao *pellet* de eritrócitos uma solução de 0,2% p/v de Glucose (Merck™) e 0,9% p/v NaCl (Merck™). Foi efectuada uma nova centrifugação e rejeitou-se de novo o sobrenadante. O *pellet* de eritrócitos resultante foi ressuscitado em meio de cultura e processado como referido anteriormente (Secção II.5.1).

II.5.5 – Sincronização de culturas *in vitro* de *P. falciparum* com sorbitol

Numa cultura *in vitro* de *P. falciparum* observa-se a presença em simultâneo de todas as fases eritrocitárias do parasita (trofozoítos e esquizontes). Por esta razão foi necessário proceder-se à sincronização da cultura para a realização de algumas experiências deste trabalho.

A sincronização das culturas foi realizada pelo método de adição de sorbitol, com algumas alterações ao protocolo original (Lambros & Vanderberg, 1979). Este método baseia-se no facto dos eritrócitos parasitados com esquizontes apresentarem uma maior fragilidade osmótica, sendo mais sensíveis à acção do sorbitol, o que provoca uma destruição selectiva dos mesmos. O procedimento foi o seguinte: após verificação por microscopia óptica de que a cultura tinha uma percentagem reduzida de esquizontes e uma elevada percentagem de trofozoítos jovens, esta foi centrifugada a 2000 r.p.m. durante 5 minutos, e ao *pellet* resultante foi adicionado 10 ml de sorbitol a 5% (Sigma™), previamente esterilizado por filtração (0,2 µm, Millipore™). Após ressuspensão, a cultura foi incubada 10 minutos a 37°C, centrifugada e lavada com RPMIinc (2 vezes) de forma a eliminar a solução de sorbitol. Os eritrócitos recuperados após a última centrifugação foram cultivados como descrito anteriormente (Secção II.5.1).

II.5.6 – Protocolo de mutagenização

Este protocolo foi desenvolvido e otimizado no decorrer deste trabalho. Partiu-se inicialmente duma cultura de *P. falciparum* Dd2 (com hematócrito de 5% e uma parasitémia de 5%) que foi sincronizada em trofozoítos jovens (anéis) e incubada durante aproximadamente 12 horas, até ter atingido o estadio de esquizonte jovem. Após a incubação adicionou-se o agente mutagénico MNNG (N-metil-N`-nitro-N-nitrosoguanidina) à cultura a uma concentração final de 1µg/ml. Esta solução foi preparada por dissolução do MNNG (Sigma™) em etanol a 95% e esterilização por filtração (0,2 µm, Millipore™). Incubou-se 12 horas a 37°C e após esta incubação aspirou-se e rejeitou-se o sobrenadante, adicionando-se novo meio de cultura e MNNG

preparado de fresco, de forma a garantir a actividade do mutagénio. Procedeu-se então a um novo período de incubação de 12 horas a 37°C. Após completar as 24 horas sob efeito do mutagénio procedeu-se a uma centrifugação da cultura a 2000 r.p.m. durante 5 minutos, rejeitou-se o sobrenadante, lavou-se 2x com RPMIinc e transferiu-se para frasco de cultura novo com meio de cultura, ou seja foi colocada de novo em cultura.

II.5.7 – Tratamento da cultura com artemisinina

O procedimento consistiu em adicionar à cultura artemisinina a uma determinada concentração durante 3 dias, mudando o meio com fármaco preparado de fresco e monitorizando a parasitémia diariamente. Esta solução foi preparada dissolvendo a artemisinina em DMSO (Merck™), esterilizando-a por filtração (0,2 µm, Millipore™), e finalmente diluindo-a em série com meio de cultura até se obter a concentração final desejada. Decorridas 72 horas sob efeito da artemisinina, a cultura foi transferida para um tubo de centrífuga (Sarstedt™) e centrifugada a 2000 r.p.m. durante 5 minutos. Seguidamente, foi rejeitado o sobrenadante e a cultura foi “lavada” com RPMIinc. (2 vezes) no intuito de remover os vestígios de fármaco. Posteriormente, a cultura foi transferida para um frasco novo contendo meio, iniciando-se um novo processo experimental, que foi repetido ciclicamente com aumentos progressivos da concentração do fármaco.

II.5.8 – Clonagem por diluição limite

A metodologia utilizada na clonagem por diluição limite (Rosário, 1981) compreendeu as seguintes fases: foi calculada inicialmente a parasitémia da cultura (P) por microscopia óptica e o nº hemácias / volume (RBC/µl) a partir do *pellet* da cultura por hemocitometria. Através destes valores foi calculada a densidade parasitária (nº parasitas / volume) utilizando a fórmula: $RBC/\mu l \times P/100 = n^\circ \text{ parasitas} / \mu l$.

Posteriormente, foi preparada uma diluição inicial da cultura contendo 1×10^6 parasitas, a partir da qual se efectuaram diluições seriadas em meio de cultura de forma a obter 10000 parasitas/100µl; 1000 parasitas/100µl; 100 parasitas/100µl; 10 parasitas/100µl; 1 parasita/100µl e 0,5 parasita/100µl. O hematócrito foi corrigido para 2%, juntando hemáceas sãs. A clonagem foi levada a cabo numa placa de cultura de 96 poços

MATERIAL E MÉTODOS

(Sarstedt™) na qual foram colocados 100 µl por poço da diluição contendo um determinado nº de parasitas tal como descrito (Figura 10).

A placa foi colocada na estufa com CO₂ a 37°C e procedeu-se às microculturas efectuando a troca do meio de cultura de 48 em 48 horas e juntando-se hemáceas sãs todos os quatro dias no intuito de manter o hematócrito constante. A monitorização do crescimento dos parasitas em cultura foi feita através de observação por microscopia óptica das lâminas feitas a partir dos poços com 10000, 1000, 100 e 10 parasitas ao longo do cultivo e aos 21 dias nos poços contendo 1 e 0,5 parasitas. Por fim, os clones obtidos foram transferidos para frascos de cultura e criocongelados posteriormente.

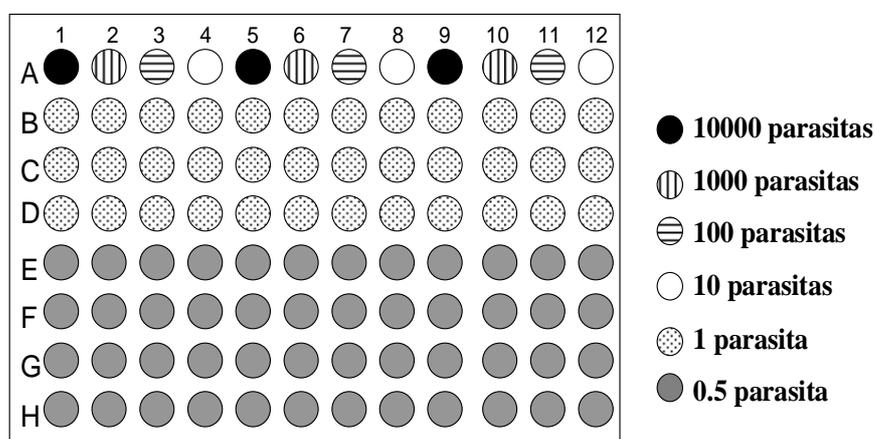


Figura 10 – Esquema exemplificativo de uma placa de clonagem indicando o número de parasitas inoculados por poço

III – RESULTADOS

No intuito de facilitar a interpretação dos dados apresentados, o presente capítulo será organizado em três sub-capítulos, relativamente a cada um dos quais serão expostos os respectivos resultados. Deste modo, os sub-capítulos aqui contidos são os seguintes:

III.1 – Desenvolvimento, optimização e validação dos métodos de análise genética.

III.2 – Estudo multicêntrico de avaliação da susceptibilidade *in vitro* aos derivados da artemisinina e estudo genético *multilocus* em populações naturais de *Plasmodium falciparum* de África e América do Sul.

III.3 – Selecção *in vitro* de parasitas de *P. falciparum* resistentes à artemisinina e sua análise genotípica.

III.1 – DESENVOLVIMENTO, OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE ANÁLISE GENÉTICA

A determinação do perfil genotípico das amostras incluídas neste trabalho baseou-se na procura de polimorfismos genéticos e/ou na estimativa do número de cópias dos genes em estudo. A pesquisa de polimorfismos genéticos foi realizada por duas abordagens diferentes: sequenciação directa de DNA e/ou por PCR-RFLP, tendo a estimativa do número de cópias dos genes em análise sido realizada recorrendo ao PCR em tempo real. Para tal foi necessário desenvolver, otimizar e validar as técnicas experimentais, sendo esses procedimentos descritos neste sub-capítulo, que se divide em duas secções onde se abordará inicialmente a pesquisa de polimorfismos genéticos e subsequentemente, o PCR em tempo real.

III.1.1 – Pesquisa de polimorfismos genéticos: resultados gerais sobre optimização das técnicas de RFLP e procura de polimorfismos genéticos *de novo*

Notas introdutórias:

1. A pesquisa de polimorfismos genéticos *de novo* relativa aos genes em estudo foi efectuada recorrendo a sequenciação directa de DNA. Para tal foram desenhados *primers* específicos, tendo-se desenvolvido e optimizado os PCRs para amplificação

RESULTADOS

desses genes. As condições específicas de cada reacção de PCR e os *primers* utilizados na amplificação dos genes sequenciados são apresentados no Anexo 7.

2. Nas secções subsequentes são apresentados os resultados relativos ao desenvolvimento, optimização e validação das técnicas de PCR-RFLP, sendo estes organizados de acordo com o gene em estudo. Os respectivos *primers* e condições de PCR utilizados na amplificação dos genes são apresentados no Anexo 8. Salienta-se que os resultados serão, nesta fase abordados numa perspectiva meramente técnica, não se pretendendo apresentar dados relacionados com factores tais como a distribuição geográfica das mutações inspeccionadas ou sua potencial correlação com a actividade dos fármacos em estudo.

3. Faz-se notar que os polimorfismos genéticos aqui referidos serão designados de acordo com o aminoácido particular codificado e não pelo nucleótido (ou triplete) que o determina (salvo indicação em contrário). Exemplo: *pfcr* K76T em detrimento de *pfcr* A228C.

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

III.1.1.1-Gene *pfmdr1*

O gene *pfmdr1* (Figura 11) foi sequenciado com sucesso do nucleótido 480 ao 710 em algumas das amostras em estudo, com o intuito de pesquisar o polimorfismo F184Y, para o qual não existe um PCR-RFLP descrito.

A pesquisa dos polimorfismos N86Y, N1042D e D1246Y foi realizada por PCR-RFLP, previamente descritos (Lopes *et al.*, 2002b), tendo-se optimizado a técnica para as amostras em estudo. Após amplificação por PCR as amostras foram incubadas com a respectiva enzima de restrição e os produtos resultantes foram visualizados em gel de agarose a 3%. Verificou-se que todos os ensaios produziram os resultados esperados

RESULTADOS

após ligeiras optimizações (Figura 12) demonstrando que a metodologia poderia ser aplicada posteriormente.



Figura 11 – Esquema representativo do gene *pfmdr1* e das sequências polimórficas inspeccionadas (▨ - Porção de 230 nucleótidos obtida através de sequenciação de DNA, que inclui o SNP relativo ao resíduo 184; | - SNPs pesquisados através de PCR-RFLP; aa – aminoácido).

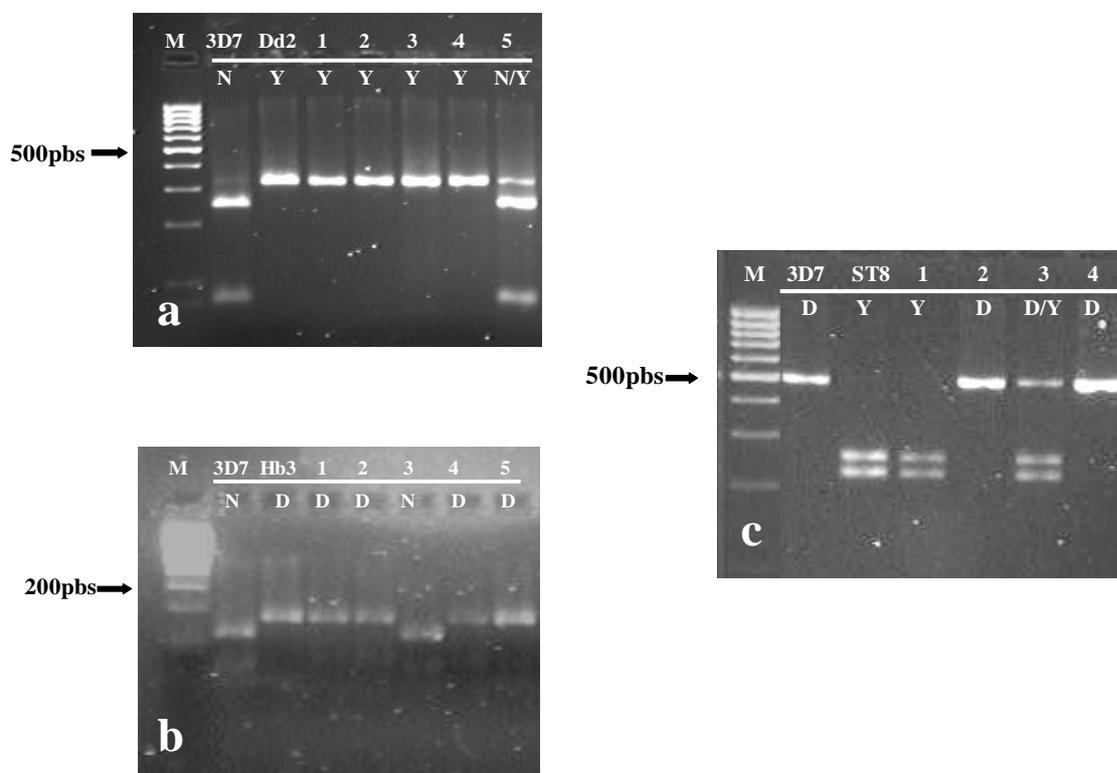


Figura 12 – Géis de agarose (3%) com resultados típicos de PCR-RFLP para identificação de polimorfismos no gene *pfmdr1* (M - marcador de peso molecular: *MassRuler™ DNA Ladder, Low Range* (Fermentes™); 3D7, Dd2, Hb3, ST8 - Controlos de genótipo conhecido; 1, 2, 3, 4, 5 - Isolados de *P. falciparum*).

a - Identificação do polimorfismo N86Y. Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 86N – 246+75; alelo mutado 86Y – 321.

b - Identificação do polimorfismo N1042D. Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 1042N – 116+46*+26*; alelo mutado 1042D – 162+26*; * - Banda não visível no gel de agarose.

c - Identificação do polimorfismo D1246Y. Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 1246D – 508; alelo mutado 1246Y – 268+240.

III.1.1.2 – Gene *pfcr1*

No caso do gene *pfcr1* (Figura 13), foi obtida com sucesso a região codificante através de sequenciação partindo de cDNA como molécula alvo num número reduzido de casos, no intuito de pesquisar polimorfismos ainda não descritos. Adicionalmente, foi ainda realizada uma pesquisa especificamente direccionada a polimorfismos já conhecidos na posição 75 e 76 na larga maioria das amostras em estudo. Na posição 76, tendo-se recorrido a um PCR-RFLP já descrito (Lopes *et al.*, 2002b), procedeu-se às optimizações para as amostras incluídas no âmbito deste estudo (Figura 14b).

Para a detecção do polimorfismo *pfcr1*N75E foi desenvolvida uma técnica de *mutation-specific PCR* no contexto deste trabalho. Na posição 75 nenhum dos alelos cria um local de hidrólise enzimática. Neste resíduo pode estar contido a asparagina (N) ou o ácido glutâmico (E), codificado por AAT ou GAA respectivamente. Este polimorfismo dinucleotídico foi explorado para desenvolver um *mutation-specific PCR* que permitiu a análise desse SNP em todas as amostras. Para tal foram construídos *primers* cujas extremidades 3' continham os tripletos complementares a cada um dos alelos alvo. Estes *primers* permitiram originar um amplicão sempre que o *primer* específico dum determinado alelo emparelhasse com esse alelo, mas não com o alelo alternativo perante condições de PCR similares. Os *primers* foram desenhados na direcção *antisense* de forma a evitar outros polimorfismos que estão frequentemente presentes a montante do codão 75, mais especificamente nas posições 72, 73 e 74, e assumindo a presença do alelo mutante ACA no codão 76. As condições deste PCR foram optimizadas para assegurar o máximo de especificidade, tendo sido utilizado 1,25mM MgCl₂ (Fermentas™). Cada amostra é sujeita a duas amplificações por PCR: uma para detectar especificamente o alelo 75N e a outra para o alelo 75E. Infecções clonais geram um só produto amplificado numa das duas reacções, enquanto que infecções mistas irão gerar amplificações em ambos os PCRs. Esta técnica foi primeiramente validada com os clones de *P. falciparum* Hb3 e Dd2 que possuem nessa posição uma asparagina (N) e um ácido glutâmico (E), respectivamente, tendo revelado especificidade óptima, e tendo sido utilizados depois como controlos nas reacções de análise dos isolados (Figura 14a.1 e 14a.2).

RESULTADOS

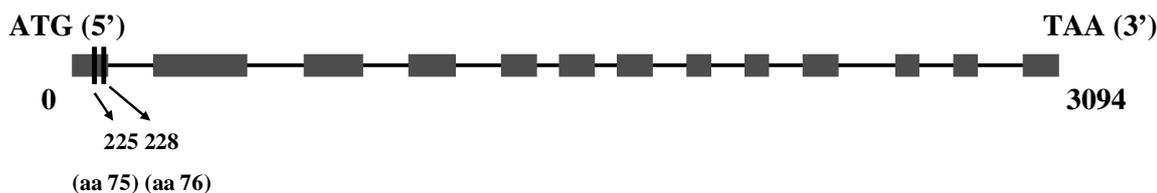


Figura 13 – Esquema representativo do gene *pfert* e das seqüências polimórficas inspeccionadas (■ - Porção codificante seqüenciada obtida a partir de cDNA; — - intrões do gene; | – SNPs pesquisados; aa – aminoácido).

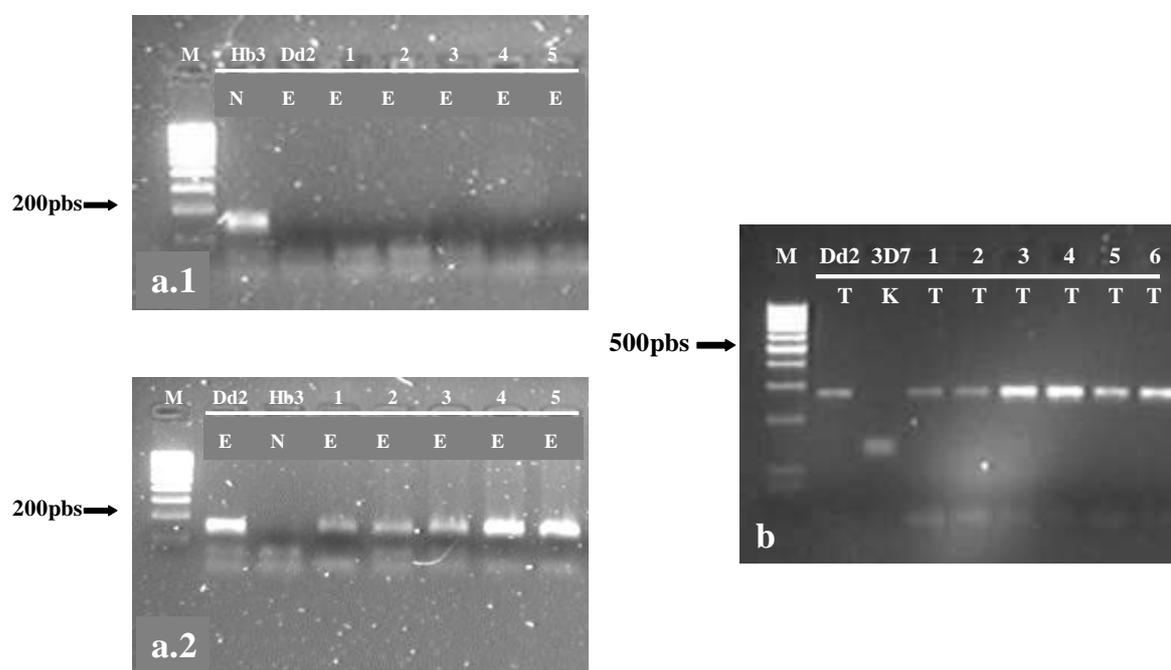


Figura 14 – Géis de agarose (3%) com resultados típicos para identificação de polimorfismos no gene *pfert* (M -marcador de peso molecular: *MassRuler™ DNA Ladder, Low Range* (Fermentes™); Dd2, 3D7, Hb3 – Controlos de genótipo conhecido; 1, 2, 3, 4, 5, 6 – Isolados de *P. falciparum*).

a.1 – Resultado típico de *mutation-specific PCR* para identificação do polimorfismo N75E, com *primers* específicos para amplificação do alelo N.

a.2 – Resultado típico de *mutation-specific PCR* para identificação do polimorfismo N75E, com *primers* específicos para amplificação do alelo E.

b - Resultado típico de PCR-RFLP para identificação do polimorfismo K76T.

Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 76K – 137+124+10*; alelo mutado 76T – 261+10*; * - banda não visível no gel de agarose.

III.1.1.3 – Gene *pfATPase6*

O gene *pfATPase6* (Figura 15) foi sequenciado com sucesso do nucleótido 28 ao 3078 em algumas amostras em estudo, com a finalidade de pesquisar a existência de eventuais polimorfismos já conhecidos bem como outros ainda não descritos.

A análise das sequências obtidas revelou a existência de várias mutações. De forma a alargar a pesquisa destas mutações a todas as amostras em estudo foram subsequentemente projectados ensaios de PCR-RFLP para quatro casos, tendo estes sido:

1. Uma mutação sinónima $T \Rightarrow A$ no nucleótido 2694. Este polimorfismo tem como tripletos alternativos ATT ou ATA, ambos codificantes de isoleucina no resíduo 898: I898I.
2. Uma mutação no nucleótido 110 no qual ocorre uma transição $G \Rightarrow A$, onde uma arginina é substituída por uma lisina no resíduo 37, codificados pelos tripletos AGA e AAA, respectivamente: R37K.
3. Uma mutação no nucleótido 1916, também transição $G \Rightarrow A$, que no resíduo 639 provoca a substituição de uma glicina por um ácido aspártico codificado por GGC e GAC, respectivamente: G639D.
4. Uma mutação $G \Rightarrow A$ no nucleótido 2306, em que uma serina no resíduo 769, codificada por AGT, é substituída por uma asparagina codificada por AAT: S769N.

No caso das mutações no resíduo 37 e no nucleótido 2694 verificou-se que estes polimorfismos genéticos criavam um local de restrição para as enzimas de restrição *MboII* e *TasI*, respectivamente, o que permitiu desenvolver ensaios de PCR-RFLP para se analisarem as restantes amostras (Figuras 16a e 16b).

O polimorfismo genético no resíduo 639 não cria um local de hidrólise por enzima de restrição. Deste modo, recorreu-se a um método de PIRA-PCR (Ke *et al.*, 2001) que permitiu introduzir mutações artificialmente através da utilização de *primers* contendo *mismatches*, possibilitando a criação de um local de restrição para um dos dois alelos alternativos. Os ensaios produziram os resultados esperados após breves ciclos de optimização (Figura 16c). Esta abordagem foi também utilizada para a pesquisa do polimorfismo descrito previamente na Guiana Francesa, na posição 769 (Figura 16d).

Os detalhes de cada reacção encontram-se descritos na secção II.3.8.

RESULTADOS

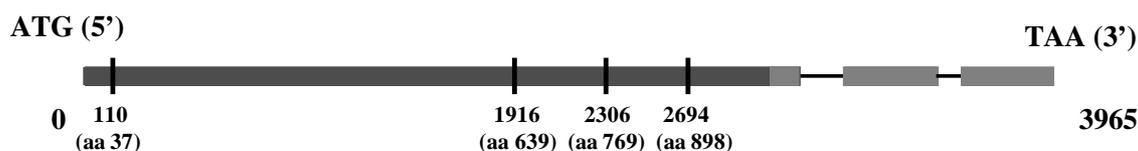


Figura 15 – Esquema representativo do gene *pfATPase6* e das sequências polimórficas inspeccionadas (■ - Porção de 3050 nucleótidos obtida através de sequenciação de DNA; — - intrões do gene; | - SNPs pesquisados através de PCR-RFLP; aa – aminoácido).

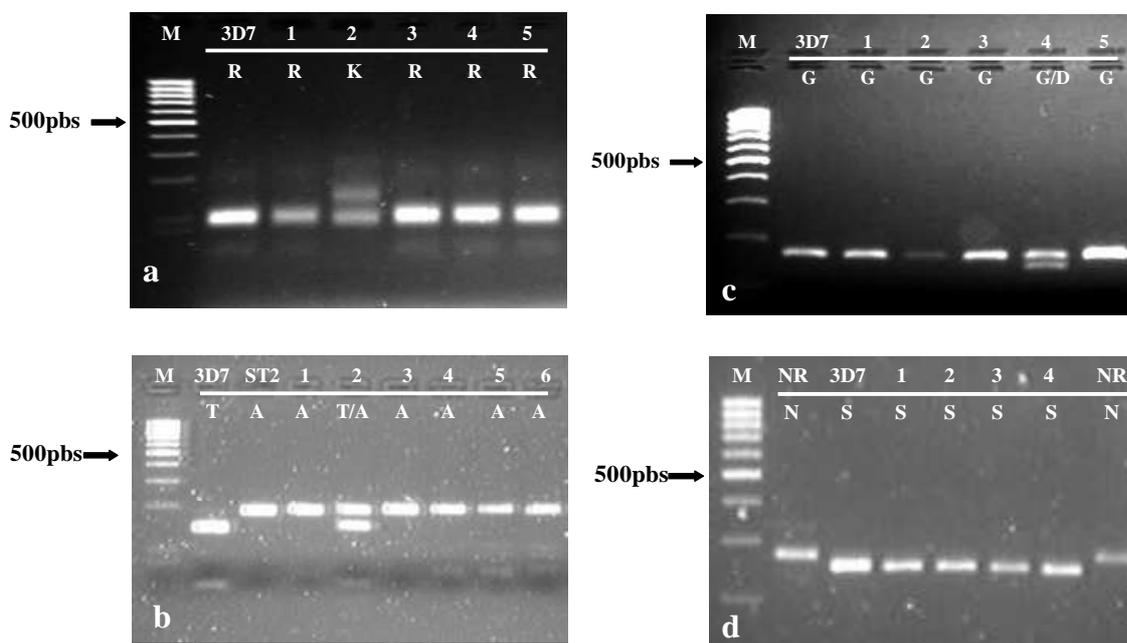


Figura 16 – Géis de agarose (3%) com resultados típicos de PCR-RFLP para identificação de polimorfismos no gene *pfATPase6* (M - marcador de peso molecular: *MassRuler™ DNA Ladder, Low Range* (Fermentes™); 3D7, ST2 - Controlos de genótipo conhecido; 1, 2, 3, 4, 5, 6 - Isolados de *P. falciparum*; NR – Produto de PCR não restringido).

a - Identificação do polimorfismo R37K. Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 37R – 103 + 94 + 92 + 40*; alelo mutado 37K – 143 + 94 + 92; * - Banda não visível no gel de agarose).

b - Identificação do polimorfismo T2694A (polimorfismo referente a um nucleótido); Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 2694T – 142+39*+1*; alelo mutado 2694A – 181+1*; * - Banda não visível no gel de agarose.

c - Identificação do polimorfismo G639D. Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 639G – 166; alelo mutado 639D – 144 + 22*; * - Banda não visível no gel de agarose.

d - Identificação do polimorfismo S769N. Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 769S – 250+22*; alelo mutado 769N – 272; * - Banda não visível no gel de agarose.

III.1.1.4 – Gene *pfubp-1*

O gene *pfubp-1* (Figura 17) foi sequenciado com sucesso do nucleótido 295 ao 3343, para pesquisa de polimorfismos em algumas das amostras.



Figura 17 – Esquema representativo do gene *pfubp-1* (■ - Porção de 3048 nucleótidos obtida através de sequenciação de DNA; — - intrões do gene).

III.1.1.5 – Gene *pf sod1*

O gene *pf sod1* (Figura 18) foi sequenciado com sucesso do nucleótido 10 ao 554 em algumas amostras seleccionadas. Após análise das sequências foi encontrado um polimorfismo no resíduo 84, onde um ácido aspártico é substituído por uma glicina, codificados por GAT e GGT respectivamente. Verificou-se que este polimorfismo genético criava um local de restrição para a enzima de restrição *MvaI*, o que permitiu desenvolver um PCR-RFLP para se analisarem as restantes amostras (Figura 19).



Figura 18 – Esquema representativo do gene *pf sod1* e da sequência polimórfica inspeccionada (■ - Porção de 544 nucleótidos obtida através de sequenciação de DNA; | - SNP pesquisado através de PCR-RFLP; aa – aminoácido).

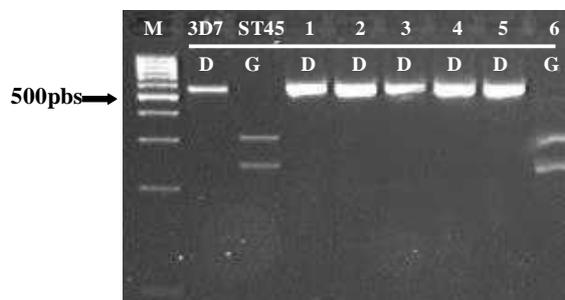


Figura 19 – Gel de agarose (3%) com resultado típico de PCR-RFLP para identificação do polimorfismo D84G (M -marcador de peso molecular: *MassRuler*TM *DNA Ladder, Low Range* (FermentesTM); 3D7, ST45 - Controlos de genótipo conhecido; 1, 2, 3, 4, 5, 6 - Isolados de *P. falciparum*; Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 84D – 544; alelo mutado 84G – 308+236).

III.1.1.6 – Gene *pfygc*s

No gene *pfygc*s (Figura 20) foi realizada a pesquisa de um determinado polimorfismo de tamanho. Esta análise foi incluída neste estudo após se ter verificado num ensaio de PCR em tempo real a existência de curvas de dissociação diferentes para este gene nos isolados em análise, facto que sugeriu a existência de amplicões de tamanhos diferentes, o que foi confirmado após visualização dos produtos amplificados em gel de agarose. Posteriormente, o gene foi sequenciado do nucleótido 750 ao 882 com sucesso em algumas amostras em estudo, e foi desenvolvido um PCR para a análise dessa inserção/delecção nas restantes amostras (Figura 21).



Figura 20 – Esquema representativo do gene *pfygc*s (■ - Porção de nucleótidos obtida através de sequenciação de DNA).

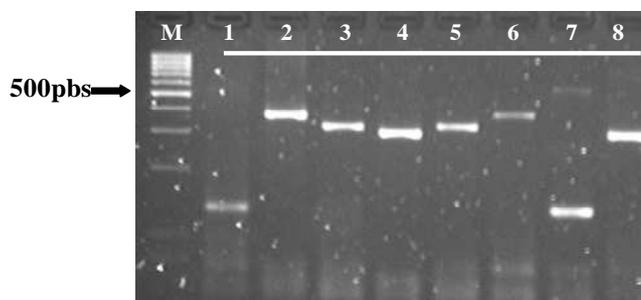


Figura 21 – Gel de agarose (3%) exemplificando um resultado da pesquisa do polimorfismo de tamanho do gene *pfygc*s (M -marcador de peso molecular: *MassRuler*TM *DNA Ladder, Low Range* (FermentesTM); 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 - Isolados de *P. falciparum* com alelos de diferentes tamanhos; o isolado 7 representa uma mistura de dois alelos de diferente tamanho).

III.1.1.7 – Genes *pftctp*, *pfgst*, *pftrx1*, *pftrx2* e *pfprx*

Nos genes *pftctp*, *pfgst*, *pftrx1* e *pftrx2* foi obtida com sucesso uma porção significativa da sequência codificante em algumas das amostras em estudo. No caso do gene *pfprx* não foi possível a sua amplificação por PCR o que não permitiu a sequenciação e posterior análise deste gene.

III.1.2 – PCR em tempo real

A metodologia de PCR em tempo real com detecção por *SYBR Green I*, recorrendo ao método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para quantificação (Livak & Schmittgen, 2001), foi utilizada neste trabalho para efectuar uma estimativa do nº de cópias dos genes em análise nos isolados de *P. falciparum* provenientes das áreas endémicas em estudo e nas estirpes seleccionadas, bem como para quantificação relativa da expressão do gene *pfmdr1* (ver secção III.3.5.3).

Inicialmente procedeu-se à optimização da concentração dos *primers*, dos reagentes e do protocolo de PCR e ao cálculo das eficiências das reacções de amplificação e eficiências relativas, no intuito de se proceder à validação do método. Após validação, a metodologia foi aplicada a cada situação específica que se pretendia endereçar.

Nesta secção são apresentados os resultados relativos à fase de optimização e validação dos protocolos experimentais.

III.1.2.1 – *Primers*

Os *primers* utilizados no PCR em tempo real foram desenhados especificamente para este trabalho. As concentrações de cada par de *primers* foram variadas de modo a que se obtivesse a máxima eficiência nas reacções de amplificação, seguindo a metodologia referida na secção II.3.12.2. Deste modo, após variados ciclos de optimização obtiveram-se as condições óptimas para cada reacção, que viriam a ser aplicadas posteriormente. As sequências dos *primers*, a concentração em que a eficiência da reacção é máxima, assim como o tamanho do amplicão gerado em cada reacção, são apresentados no Anexo 9.

III.1.2.2 – Resultados da validação do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Para que se pudesse fazer uso do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ com fidelidade na interpretação dos resultados de quantificação foi necessário proceder inicialmente à sua validação. Assim, foi calculada a eficiência das reacções de amplificação dos genes em análise e do gene normalizador (*housekeeping*), individualmente, e realizou-se a comparação das eficiências dos genes em análise e do gene normalizador (eficiência relativa).

III.1.2.2.1 – Eficiências das reacções de amplificação

A metodologia seguida para o cálculo da eficiência das reacções de amplificação encontra-se descrita em pormenor na secção II.3.12.3.1.1. A Figura 22 exemplifica um ensaio a partir do qual foi calculada a eficiência da reacção de um determinado gene alvo (*pfmdr1*), onde se observa a variação dos *Ct*s a cada diluição seriada de DNA do clone 3D7. Partindo dos valores obtidos relativamente a este gráfico de amplificação, o cálculo da eficiência da reacção de amplificação é exemplificado na Figura 23. Deste modo, foi inicialmente registado o *Ct* relativo às reacções de amplificação de cada diluição (a) e a partir dos valores obtidos elaborou-se um gráfico do logaritmo de cada diluição de DNA vs *Ct* (b). Seguidamente, calculou-se a equação da recta ($y = mx + b$) deste gráfico (c) o que permitiu obter a eficiência (E) da reacção, que neste exemplo foi de 97%. Esse valor foi calculado recorrendo à equação $E = 10^{(-1/\text{declive})} - 1 \times 100$ (d).

Os resultados das eficiências de reacção de todos os genes analisados são apresentados na Tabela 10, os quais indicaram que todas as reacções apresentavam eficiência óptima, podendo assim ser aplicadas posteriormente com confiança adicional.

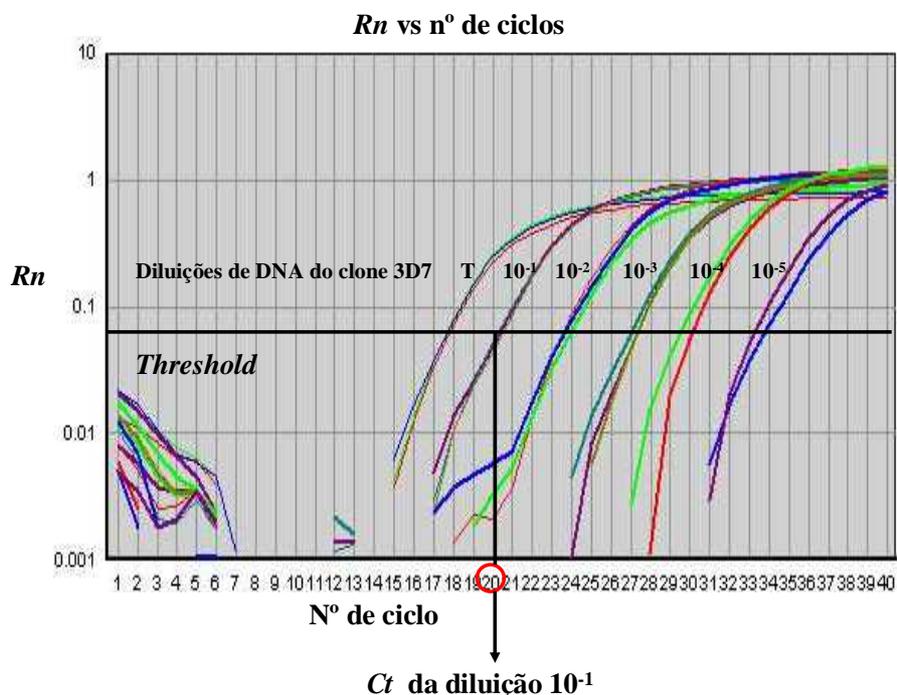


Figura 22 – Exemplo do cálculo dos *Ct*s para as várias diluições seriadas de DNA (*Ct* – Cycle Threshold; *Rn* – Sinal de fluorescência normalizado; *Rn* = intensidade de fluorescência emitida pelo *SYBR Green I* / intensidade de fluorescência emitida pelo fluoróforo de referência passivo).

RESULTADOS

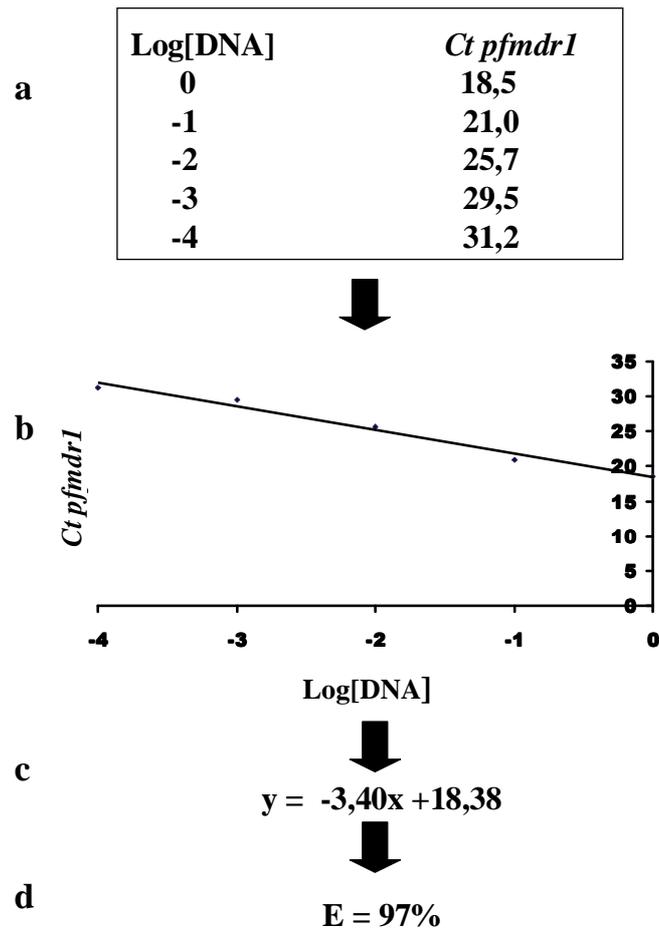


Figura 23 – Cálculo da eficiência (E) da reacção do gene *pfmdr1*

Tabela 10 – Eficiências de reacção para os genes em estudo

Gene	Valor do declive (m)	Eficiência da reacção (%)
<i>pfbactinaI</i>	-3,32	100
<i>pfmdr1</i>	-3,4	97
<i>pfATPase6</i>	-3,41	96
<i>pftctp</i>	-3,34	99
<i>pfgpx</i>	-3,33	99
<i>pfgr</i>	-3,41	96
<i>pfgst</i>	-3,5	93
<i>pfsod1</i>	-3,4	96
<i>pftrx1</i>	-3,33	99
<i>pftrx2</i>	-3,37	98
<i>pfprx</i>	-3,46	95

RESULTADOS

III.1.2.2.2 – Eficiências relativas

Na Figura 24 é apresentado um exemplo relativo à comparação das eficiências de reacção de um gene alvo (*pfmdr1*) e do gene normalizador (*pfβactinaI*). Deste modo foi levada em consideração a variação do ΔCt (Ct gene alvo – Ct *pfβactinaI*) das reacções de amplificação ao longo das diluições seriadas do DNA. Originariamente foi calculada a média dos Ct a cada diluição para cada um dos genes (*pfmdr1* e *pfβactinaI*) e determinou-se o ΔCt correspondente (Ct *pfmdr1* – Ct *pfβactinaI*) (a). Elaborou-se então um gráfico representativo do logaritmo da diluições do DNA vs ΔCt (b) a partir do qual se obteve a equação da recta (c) e o respectivo declive (d). Neste caso exemplificativo, o valor absoluto do declive da recta foi 0,063 ($|m| < 0,1$) indicando que as eficiências das reacções dos dois genes são aproximadamente iguais, ou seja, a eficiência relativa é óptima.

À semelhança do exemplo apresentado, foram efectuados ensaios similares para todos os genes em análise tendo-se atingido eficiências relativas óptimas após optimização em todos os casos (Tabela 11).

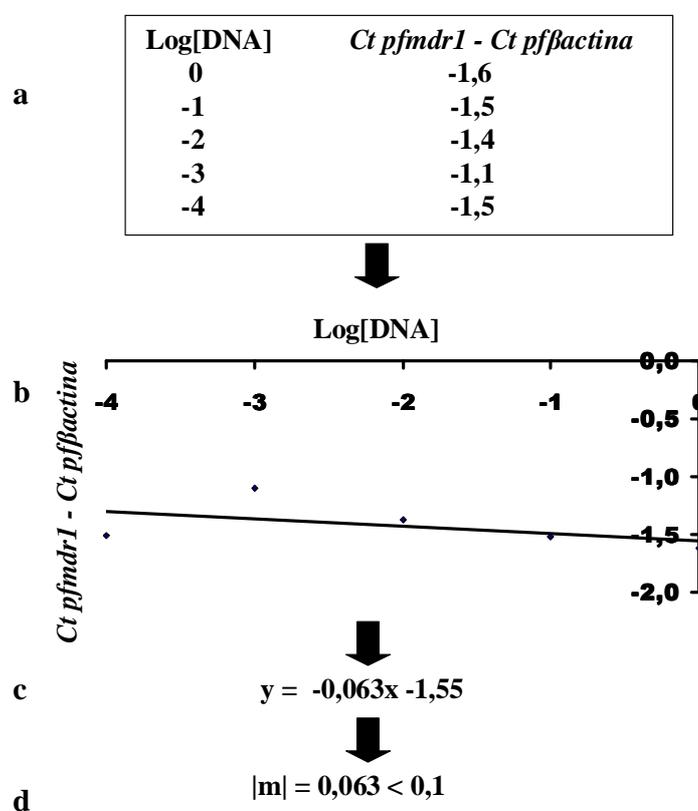


Figura 24 – Comparação das eficiências de reacção de amplificação do gene *pfmdr1* e do gene *pfβactinaI* (gene normalizador) ($|m|$ - valor absoluto do declive da recta).

RESULTADOS

Tabela 11 – Valores de $|m|$ para os genes em estudo

Gene	Valor absoluto do declive da recta $ m $
<i>pfmdr1</i>	0,0633
<i>pfATPase6</i>	0,0883
<i>pftctp</i>	0,0832
<i>pfgpx</i>	0,0635
<i>pfgr</i>	0,0286
<i>pfgst</i>	0,0877
<i>pfsod1</i>	0,057
<i>pftrx1</i>	0,012
<i>pftrx2</i>	0,035
<i>pfprx</i>	0,067

III.1.2.3 – Estimativa do número de cópias do gene *pfmdr1* como controlo auxiliar de validação

A validação de todos os ensaios de PCR em tempo real foi reforçada recorrendo à utilização do gene *pfmdr1* como controlo. Neste contexto, fez-se uso de informação anteriormente publicada onde havia sido previamente demonstrado que o clone *P. falciparum* Dd2 possui 4 cópias deste gene (Cowman *et al.*, 1994). Deste modo, independentemente do gene alvo em estudo, incluíram-se em todas as experiências reacções de PCR de quantificação do gene *pfmdr1* no clone Dd2 relativamente ao clone 3D7, detentor de cópia única do mesmo gene. Na Tabela 12 estão designadas as observações resultantes de 20 experiências independentes, de onde é possível constatar que os resultados observados estão de acordo com os resultados esperados, o que proporcionou confiança adicional relativamente à robustez de ensaio.

Na Figura 25 está representado um exemplo de um ensaio de quantificação do número de cópias do gene *pfmdr1* no clone Dd2 em relação ao clone 3D7.

Tabela 12 – Resultados da avaliação da robustez do método de validação (20 experiências independentes; * - Cowman *et al.*, 1994).

Nº cópias <i>pfmdr1</i>	Publicado*	Observado neste trabalho			
		Média	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
4		3,7	3,2	4,5	0,68

RESULTADOS

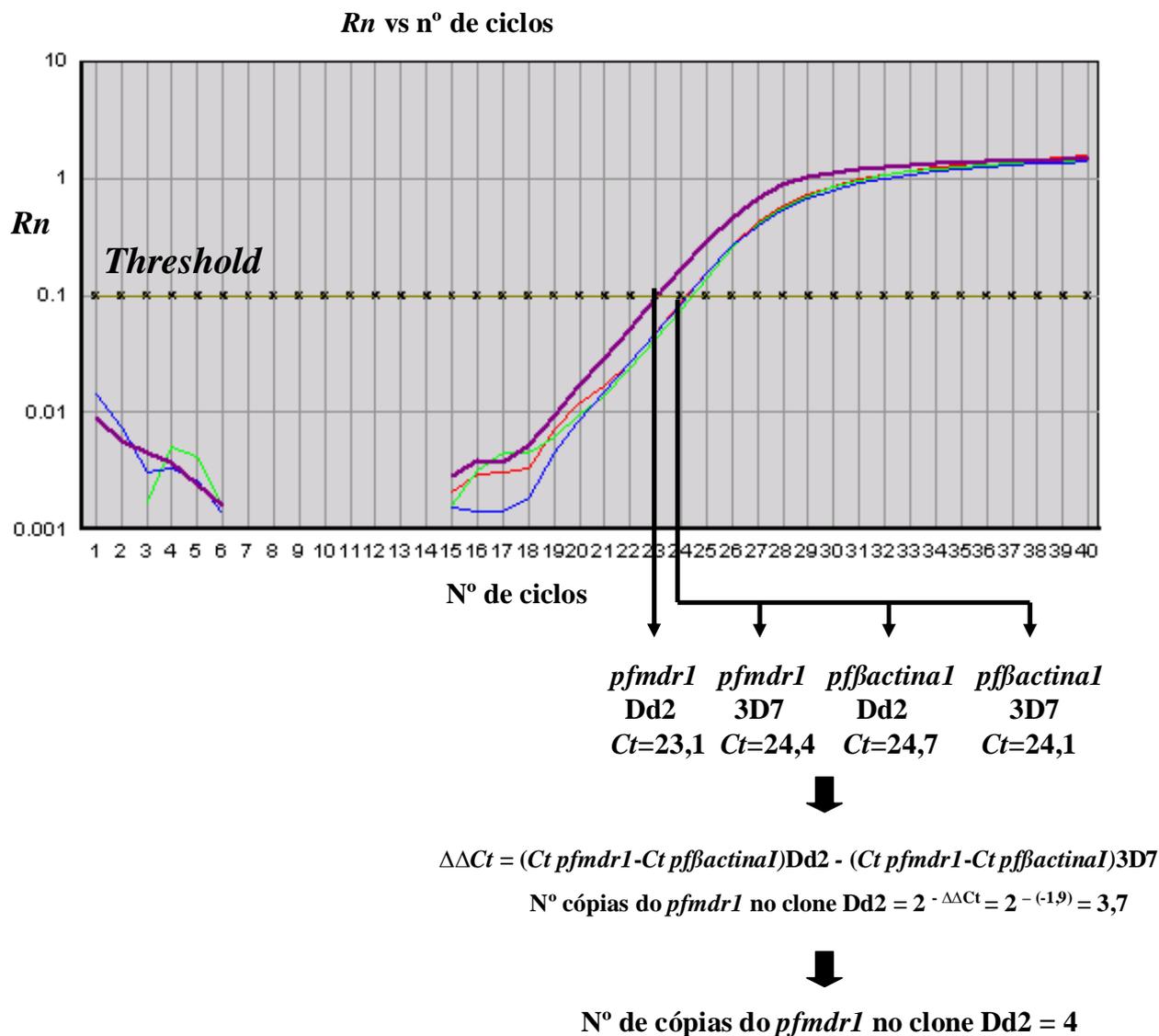


Figura 25 – Resultado típico da estimativa do n° de cópias do gene *pfmdr1* no clone Dd2 relativamente ao clone 3D7 (*Ct* – Cycle Threshold; *Rn* – Sinal de fluorescência normalizado; *Rn* = intensidade de fluorescência emitida pelo SYBR Green I / intensidade de fluorescência emitida pelo fluoróforo de referência passivo).

III.2 – ESTUDO MULTICÊNTRICO DE AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* AOS DERIVADOS DA ARTEMISININA E ESTUDO GENÉTICO *MULTILOCUS* EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *P. falciparum* DE ÁFRICA E AMÉRICA DO SUL

Esta componente do trabalho aqui apresentado contemplou a avaliação da actividade *in vitro* dos derivados da artemisinina e/ou amodiaquina em populações naturais de *P. falciparum* provenientes de três áreas endémicas para malária: República Democrática de São Tomé e Príncipe (RDSTP), Brasil e Ruanda, e a análise genética *multilocus* das mesmas. Sumariamente, efectuou-se a pesquisa de polimorfismos genéticos e a avaliação do número de cópias em genes potencialmente moduladores de actividade antimalárica, avaliou-se a sua prevalência na população parasitária em estudo e investigou-se uma possível correlação com diferenças de susceptibilidade aos fármacos em estudo.

Salienta-se que este estudo foi tornado possível devido à existência prévia de protocolos de cooperação científica estabelecidos entre o CMDT/IHMT e o Centro Nacional de Endemias da República Democrática de São Tomé e Príncipe (RDSTP), o Instituto Evandro Chagas de Belém do Pará, Brasil, o Institut de Recherche en Sciences de la Santé, Bobo Dioulasso, Burkina Faso e o Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, Antwerpen, Belgium.

III.2.1 – Selecção e colheita dos isolados: dados gerais

Os dados referentes ao número de isolados seleccionados, colhidos e inspeccionados relativamente à sua fármaco-susceptibilidade *in vitro* para cada uma das áreas endémicas estudadas são apresentados na Tabela 13.

No Ruanda, dos 93 isolados colhidos, 80% foram fenotipados relativamente à sua susceptibilidade à dihidroartemisinina e amodiaquina com sucesso.

Na RDSTP dum total de 80 pacientes infectados com malária seleccionados não foi possível efectuar a colheita em 10 devido a dificuldades logísticas inerentes à própria colheita. Dos 70 isolados colhidos, cultivados e fenotipados, foram obtidos resultados interpretáveis relativamente aos testes *in vitro* em 73%, 61% e 76% das amostras para o artemeter, artesunato e amodiaquina, respectivamente.

RESULTADOS

No Brasil, de entre 68 amostras seleccionadas, foram colhidas 66 tendo-se perdido duas por complicações no processamento após a colheita. De entre as amostras colhidas, foram obtidos resultados validos em 85% dos casos relativamente a ambos os fármacos artesunato e artemeter.

O insucesso na realização e interpretação dos testes *in vitro* malogrados na RDSTP e no Brasil deveu-se fundamentalmente à ausência de crescimento *in vitro* dos parasitas ou contaminações indesejadas por bactérias ou fungos.

Tabela 13 – Número de isolados seleccionados, colhidos e fenotipados por área endémica

Área endémica	Nº isolados seleccionados	Nº isolados colhidos	Nº isolados fenotipados	Antimalárico
Ruanda	107	93	74 74	amodiaquina dihidroartemisinina
RDSTP	80	70	53 43 51	amodiaquina artesunato artemeter
Brasil	68	66	56 56	artesunato artemeter

III.2.2 – Avaliação da susceptibilidade *in vitro* e análise genética *multilocus*

Esta secção será estruturada em partes distintas de modo a facilitar a apresentação dos resultados. Sequencialmente, serão apresentados os resultados da actividade farmacológica *in vitro* dos antimaláricos testados expressos em valores de IC50s, a correlação entre essas actividades antimaláricas, prevalência dos polimorfismos analisados nas populações parasitárias naturais e sua correlação com as susceptibilidades aos antimaláricos avaliados e, por fim, a estimativa do nº de cópias dos genes analisados.

III.2.2.1 – Actividade *in vitro* dos antimaláricos testados

A distribuição de cada uma das amostras de *P. falciparum* por concentração dos respectivos IC50s (nM) relativos aos fármacos em estudo nas três áreas endémicas está representada na Figura 26. De referir que a avaliação da fármaco-susceptibilidade *in vitro* nas populações parasitárias estudadas foi realizada recorrendo ao método do microteste da O.M.S. (W.H.O., 1997), como anteriormente descrito na secção II.4.5.

Os dados dos IC50s relativos aos antimaláricos testados nas três áreas endémicas estudadas estão contidos na Tabela 14 onde são apresentados os valores das médias geométricas e intervalo de confiança (IC 95%), valores máximo e mínimo de IC50s, amplitude de variação dos IC50s e número de isolados resistentes à amodiaquina e amodiaquina. Os valores para cada isolado individualmente são apresentados nos Anexos 10, 11 e 12.

Relativamente aos derivados da artemisinina os testes de susceptibilidade mostraram uma grande variação nas respostas dos isolados aos fármacos em estudo, o que pode ser confirmado pela observação dos valores mínimos e máximos de IC50s apresentados (Tabela 14).

No caso da amodiaquina, em tendência similar às respostas aos derivados da artemisinina observou-se também uma variação expressiva no grau de susceptibilidade de entre as amostras inspeccionadas. Verificou-se, adicionalmente, que uma proporção relativamente elevada de isolados apresentava uma diminuição significativa da susceptibilidade a este fármaco. De especial relevância destaca-se a observação de que 9,4% dos parasitas testados na RDSTP e 7% no Ruanda apresentaram valores de IC50s superiores a 60 nM, considerado como o limite a partir do qual se categorizam os parasitas como resistentes a este fármaco. Refere-se ainda o facto de este antimalárico ter revelado ser meno potente que os derivados da artemisinina, tendo em conta os valores das médias geométricas de IC50 (Tabela 14).

RESULTADOS

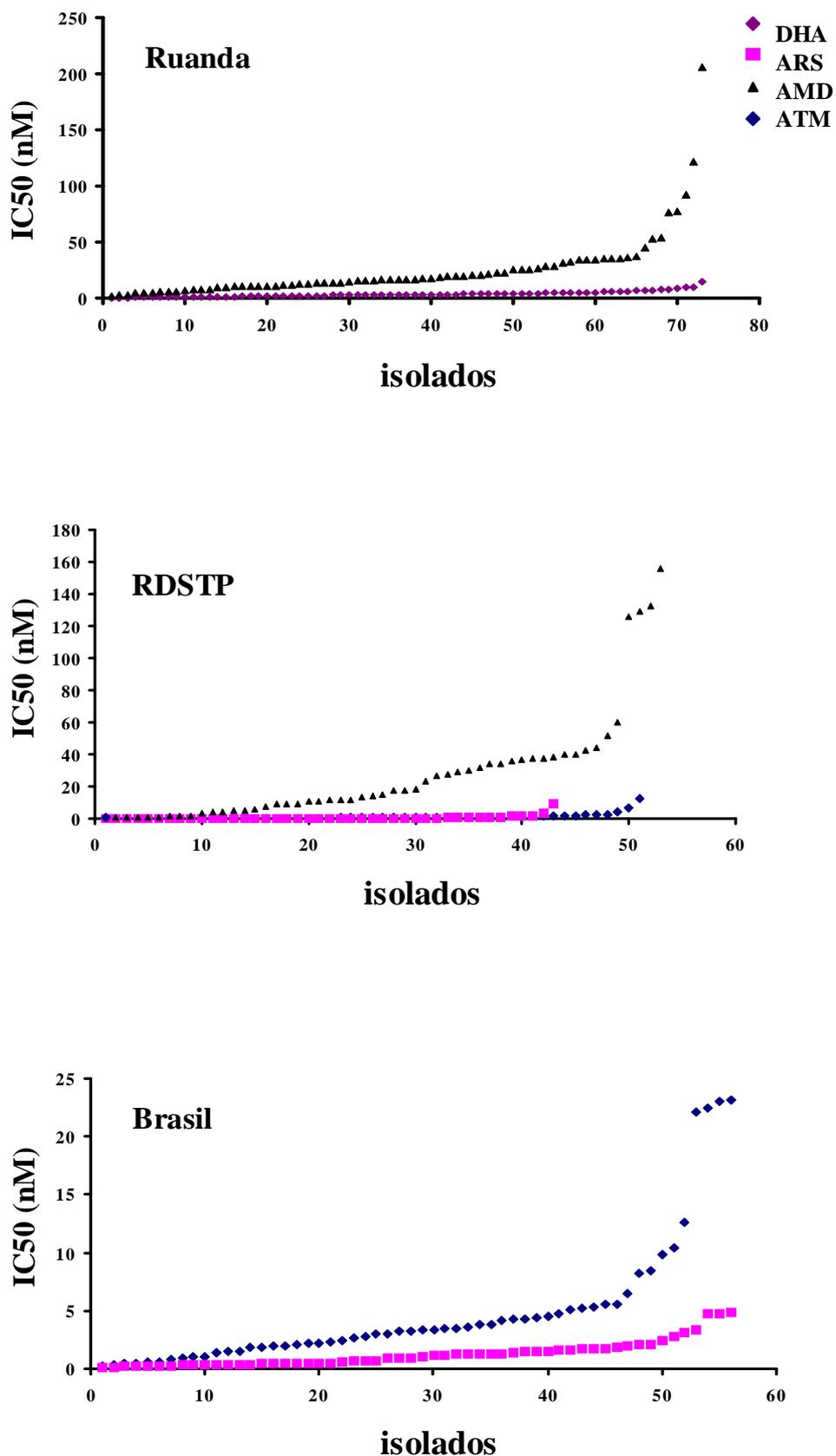


Figura 26 – Distribuição dos IC50s (nM) relativos aos fármacos em estudo (DHA – dihidroartemisinina, ATM – artemeter, ARS – artesunato, AMD – amodiaquina).

RESULTADOS

Tabela 14 – Actividade *in vitro* dos isolados das áreas endêmicas estudadas
(Limiar de resistência: amodiaquina - 60 nM; derivados da artemisinina - não definido;
IC 95% - intervalo de confiança a 95%)

Área endêmica	Antimalárico	Média geométrica (nM) IC 95%	Valores extremos (nM)		Variação nos IC50s	Isolados resistentes (%)
			mínimo	máximo		
Ruanda	amodiaquina	17,3 10,6-24,0	2,1	205,6	98	5 (7)
	dihidroartemisinina	2,6 2,0-3,2	0,3	14,3	20	-
RDSTP	amodiaquina	12,9 3,5-22,3	1,0	156	156	5 (9,4)
	artesunato	0,13 0,31-0,57	0,05	9,0	180	-
	artemeter	0,59 0,05-1,13	0,2	12,5	63	-
Brasil	artesunato	0,85 0,55-1,15	0,1	4,9	49	-
	artemeter	3,0 1,5-4,5	0,2	23,2	116	-

III.2.2.2 – Correlação entre os perfis de susceptibilidade *in vitro* dos antimaláricos

No intuito de se verificar se existia alguma correlação entre as respostas dos isolados aos antimaláricos estudados em cada uma das áreas endêmicas, todas as amostras testadas foram organizadas por ordem crescente dos valores dos IC50s para cada fármaco. Subsequentemente, estes valores foram emparelhadas entre os diferentes fármacos, calculou-se o coeficiente de correlação (r) e verificou-se a significância estatística desta correlação através do teste *Spearman Rank Order Correlation testing* (Wessa, 2007). Considerou-se existir uma correlação significativa entre as susceptibilidades de dois fármacos quando o valor de $P \leq 0,05$. Assim, verificou-se uma tendência de correlação directamente proporcional (estatisticamente confirmada) entre as respostas aos antimaláricos testados nas três áreas endêmicas, em todas as combinações (Tabela 15; Figura 27). As correlações mais significativas entre a resposta *in vitro* de quaisquer dois fármacos verificaram-se entre os derivados da artemisinina (Tabela 15).

Chama-se a atenção para a observação de que na RDSTP um isolado particular possuía os valores de IC50s mais elevados para os três fármacos: 12,5 nM, 9,0 nM e 156,0 nM, para o artemeter, artesunato e amodiaquina, respectivamente.

RESULTADOS

Tabela 15 – Correlação entre as respostas *in vitro* dos antimaláricos testados nas áreas em estudo (r - Spearman's rank-order correlation coefficient, P – Valor da significância estatística).

Área endêmica	Antimaláricos	r	P	Figura
Ruanda	dihidroartemisinina vs amodiaquina	0,5	<0,001	27 a
RDSTP	amodiaquina vs artesunato	0,6	<0,001	27 b
	amodiaquina vs artemeter	0,4	0,004	27 c
	artemeter vs artesunato	0,6	<0,001	27 d
Brasil	artesunato vs artemeter	0,9	<0,001	27 e

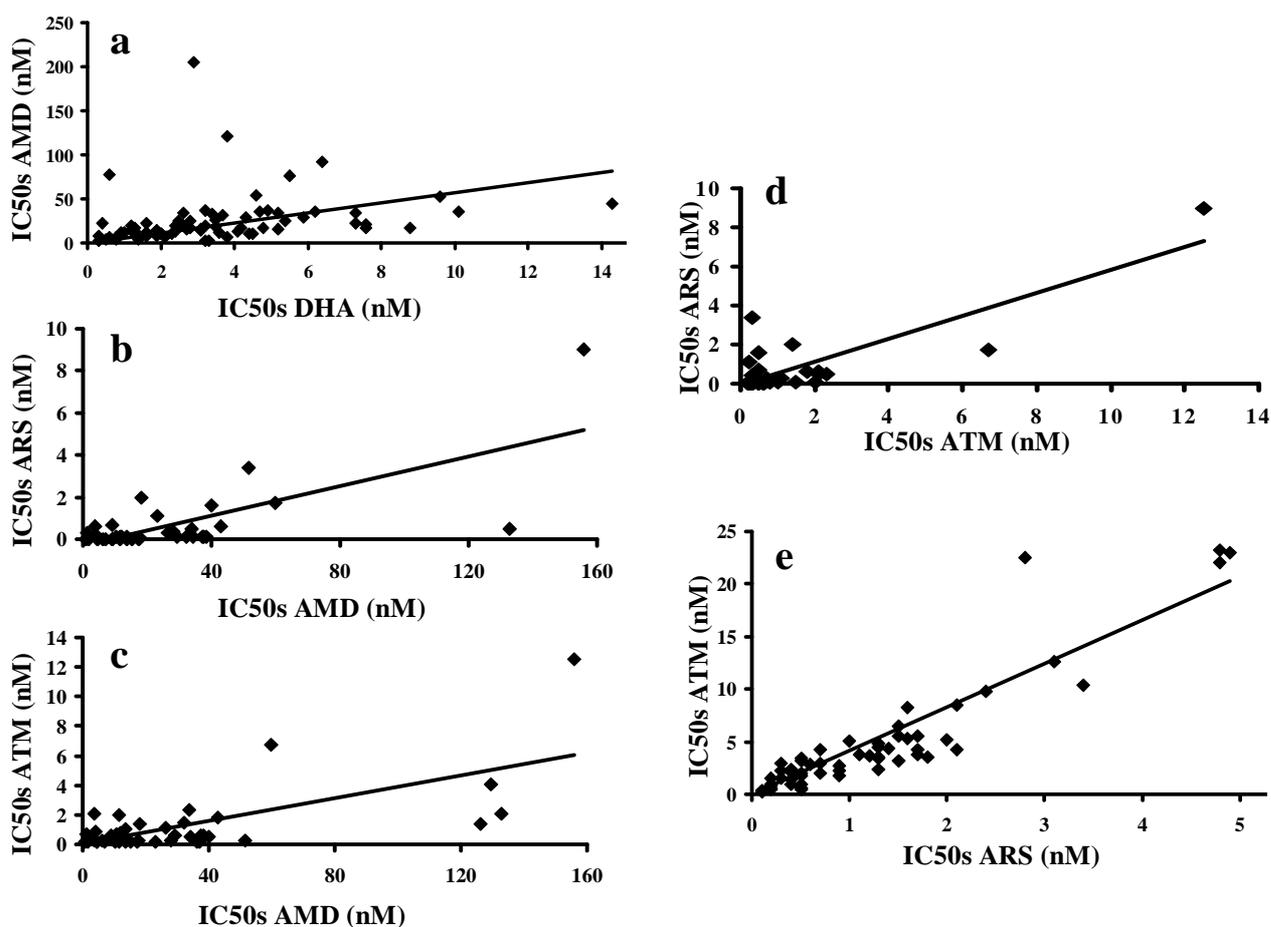


Figura 27 – Gráficos de correlação entre as respostas *in vitro* dos antimaláricos testados nas áreas em estudo (a – Ruanda; b, c, d – RDSTP; e – Brasil; DHA – dihidroartemisinina; ATM – artemeter; ARS – artesunato; AMD – amodiaquina).

RESULTADOS

III.2.2.3 – Pesquisa de polimorfismos genéticos e sua prevalência

A determinação do perfil genotípico das amostras em estudo seguiu duas abordagens diferentes, tal como anteriormente referido. Deste modo, a pesquisa de polimorfismos *de novo* foi realizada recorrendo a sequenciação directa de DNA numa sub-amostra dos isolados de *P. falciparum*, seleccionada de acordo com os valores dos IC50s da dihidroartemisinina para os isolados do Ruanda, do artesunato para os isolados do Brasil e do artemeter para os isolados da RDPST. Deste modo, foram seleccionados 4 isolados com elevado IC50s (baixa sensibilidade) e 4 isolados com baixo IC50s (elevada sensibilidade) de cada região.

A pesquisa por PCR-RFLP foi realizada em todas as amostras em que foi extraído DNA com sucesso (Tabela 16).

A prevalência alélica nas três áreas endémicas estudadas será organizada de acordo com o gene em estudo. O perfil genotípico de cada um dos isolados analisados é apresentado nos Anexos 10, 11 e 12.

Tabela 16 – Número de amostras analisadas por área endémica

Área endémica	Nº amostras em papel de filtro	Nº amostras DNA extraído
Ruanda	99	98
RDSTP	70	69
Brasil	66	66

III.2.2.3.1 – Gene *pfmdr1*

Para análise do gene *pfmdr1* recorreu-se a sequenciação de DNA para a pesquisa do polimorfismo F184Y em 8 amostras do Ruanda e 8 da RDSTP previamente seleccionadas, tendo a pesquisa dos polimorfismos N86Y, N1042D e D1246Y sido realizada com sucesso por PCR-RFLP em 98 amostras do Ruanda, 69 da RDSTP e 66 do Brasil.

No Ruanda a análise dos diversos SNPs revelou uma predominância dos alelos mutantes 86Y e 184Y, tendo-se no entanto verificado a existência de alelos selvagens em circulação. No caso do resíduo 1042, verificou-se uma ausência do alelo mutado, circulando na população analisada exclusivamente o alelo selvagem 1042N. Em contraste, no caso do resíduo 1246 verificou-se uma distribuição equilibrada dos dois alelos alternativos 1246D e 1246Y (Figura 28).

Na RDSTP e em tendência similar às observações no Ruanda, verificou-se uma predominância dos alelos 86Y e 1042N. No entanto, nos resíduos 184 e 1246 os alelos selvagens, 184F e 1246D, demonstraram ser mais predominantes (Figura 28).

No Brasil, os resultados revelaram a predominância do haplótipo característico da América do Sul, 86N, 1042D e 1246Y, à excepção do resíduo 1042, em que predomina o alelo mutado 1042D. Os alelos 86N e 1246Y parecem ter atingido fixação na população parasitária local (Figura 28).

RESULTADOS

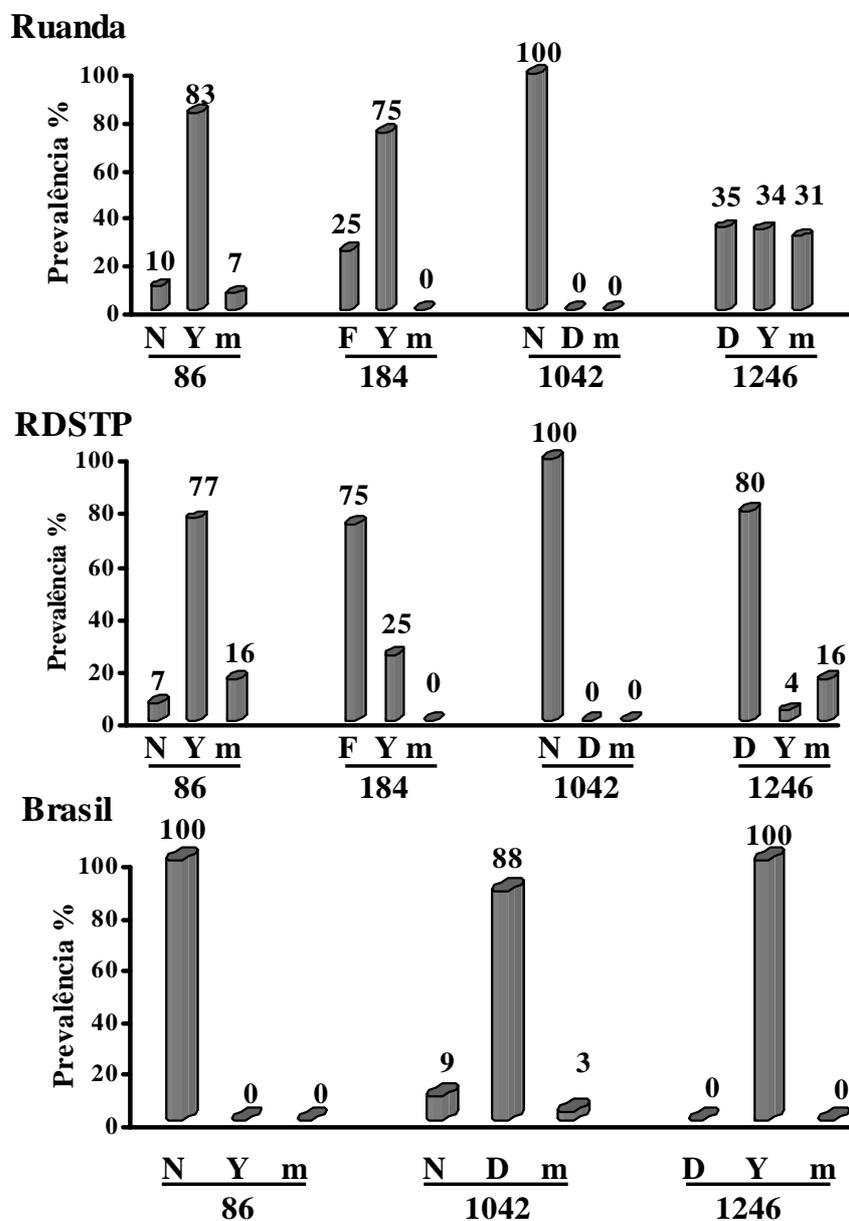


Figura 28 – Prevalência dos SNPs analisados no gene *pfmdr1* (m – mistura de alelos; alelos selvagens – 86N, 184F, 1042N e 1246D; alelos mutados – 86Y, 184Y, 1042D e 1246Y; polimorfismo *pfmdr* F184Y foi pesquisado por sequenciação em 8 amostras do Ruanda e 8 da RDSTP).

III.2.2.3.2 – Gene *pfcr*

No gene *pfcr* foram pesquisadas as mutações N75E e K76T recorrendo à técnica de PCR-RFLP com sucesso em 98, 69 e 66 amostras, do Ruanda, da RDSTP e do Brasil respectivamente.

De um modo geral observou-se uma predominância elevada do alelo mutante 76T, associado à resistência à cloroquina em todas as áreas estudadas (Figura 29).

No Ruanda observou-se uma predominância extremamente elevada dos alelos 75E e 76T, tendo-se no entanto verificado ainda a existência de parasitas portadores de alelos selvagens na população parasitária analisada. Em contraste, verificou-se uma completa ausência de parasitas portadores de genótipos selvagens na RDSTP, demonstrando que as mutações N75E e K76T se encontram fixas na população parasitária local (Figura 29).

No Brasil a análise revelou a presença do haplótipo característico da América do Sul, 76T e 75N em todas as amostras analisadas, evidenciando assim a fixação do mesmo nesta região (Figura 29).

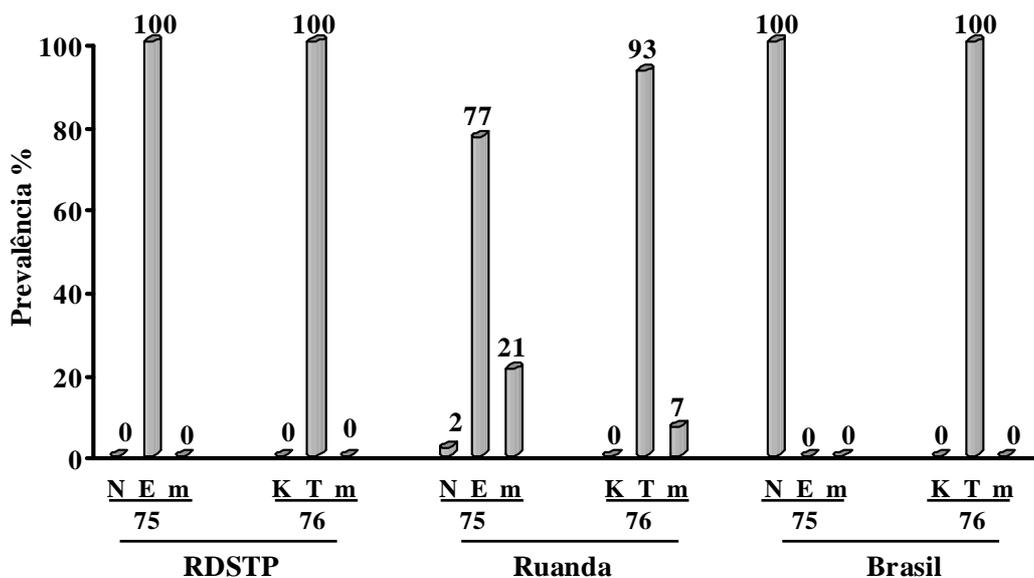


Figura 29 – Prevalência dos SNPs analisados no gene *pfcr* (m – mistura de alelos; alelos selvagens – 76K e 75N; alelos mutados – 76T e 75E).

III.2.2.3.3 – Gene *pfATPase6*

A pesquisa de polimorfismos *de novo* no gene *pfATPase6* por sequenciação foi realizada num total de 29 amostras com diferentes susceptibilidades aos derivados da artemisinina, provenientes das três regiões em estudo. Da análise das sequências de 13 amostras do Brasil, 7 do Ruanda e uma da RDSTP foram reveladas oito mutações ainda não descritas previamente a este estudo, de entre as quais duas demonstraram ser sinónimas (A345G e T2694A) e seis não-sinónimas (G110A, T1204G, G1291A, T1707A, G1888T e G1916A). De notar que a mutação previamente associada com o aumento da tolerância ao artemeter na Guiana Francesa, S769N, não foi identificada em nenhuma das amostras.

Foi verificado que a grande maioria das mutações apresentam uma distribuição regional, tendo os polimorfismos G110A, G1888T e G1916A sido identificados somente nas amostras do Brasil, enquanto que as mutações A345G, T1204G, G1291A e T1707A, sido encontradas nas amostras do Ruanda e na RDSTP. A única mutação comum às três regiões foi a mutação sinónima T2694A (Tabela 17).

A diversidade dos polimorfismos por região também demonstrou ser variável, tendo-se observado que as amostras provenientes de África apresentam o maior número de polimorfismos. Assim, nos parasitas Africanos incluídos na análise detectaram-se um total de 5 polimorfismos genéticos, que permitem codificar 4 proteínas de sequências distintas. De entre o leque de parasitas inspeccionados provenientes do Brasil, foram detectados um total de 4 polimorfismos e identificados 3 tipos de proteínas putativas. Adicionalmente, a análise destes polimorfismos na população parasitária do Brasil realçou o facto de esta poder ser dividida em dois haplótipos principais (Tabela 17), com a mutação G1888T a formar um grupo diferente constituído por um só isolado, de entre um total de 13 amostras sequenciadas.

Recorrendo à técnica de PCR-RFLP, foi pesquisado com sucesso o polimorfismo sinónimo T2694A e o polimorfismo S769N na RDSTP e no Ruanda em 69 e 98 amostra, respectivamente, tendo-se verificado a inexistência da mutação S769N e a predominância do alelo 2694A (Figura 30).

RESULTADOS

No Brasil foi também pesquisado por esta técnica com sucesso o polimorfismo T2694A em 66 amostras bem como os polimorfismos, R37K, G639D, S769N em 59, 60 e 66 amostras, respectivamente. A prevalência destes SNPs está representada na Figura 30. Foi verificada a presença de duas possíveis combinações entre os diferentes SNPs, contendo os nucleótidos GGA ou ATA nas posições 110, 1916 e 2694. A prevalência destes haplótipos alternativos foi de 88% para o GGA (selvagem) e 12% para o ATA (mutante).

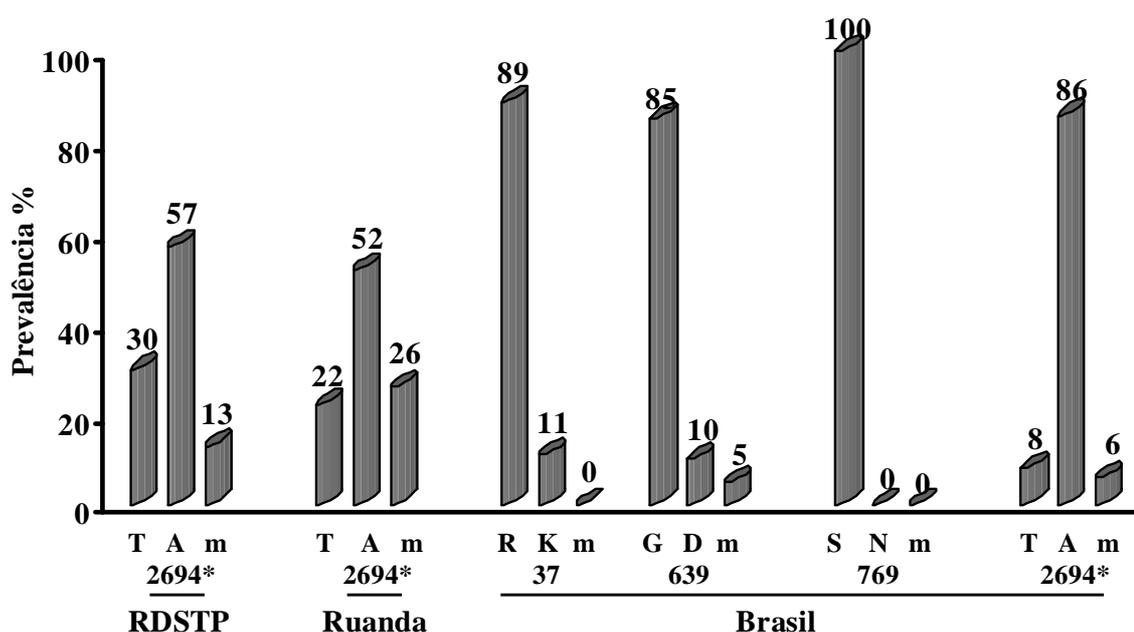


Figura 30 – Prevalência dos SNPs analisados por PCR-RFLP no gene *pfATPase6*
(* Referente a um nucleótido, não ao número dum aminoácido; m – mistura de dois alelos; alelos selvagens – 2694T*, 37R, 639G, 769S; alelos mutados – 2694A*, 37K, 639D, 769N).

III.2.2.3.3.1 – Localização das mutações descritas em termos de topologia membranar predita da proteína PfATPase6 e seus domínios funcionais

No intuito de avaliar a relevância de alguns dos polimorfismos encontrados e analisados no gene *pfATPase6* foi pesquisada a sua localização na estrutura da proteína em termos de topologia transmembranar (Figura 31), assim como no tipo de domínio funcional da proteína onde se inserem (Figura 32). Para tal foram utilizados os recursos bioinformáticos *TMHMM Server v. 2.0* e *Pfam: clans, web tools and services*, respectivamente.

RESULTADOS

Os resultados obtidos confirmam que o gene *pfATPase6* codifica uma proteína transmembranar transportadora de Cálcio, uma ATPaseCa^{2+} do tipo SERCA. Esta proteína encontra-se envolvida nos processos biológicos de transporte do ião cálcio e outros catiões e participa em processos metabólicos.

As enzimas ATPases são complexos de enzimas / transportadores de iões ligadas à membrana, combinam a síntese e/ou hidrólise de ATP com o transporte de protões através da membrana. Existem diferentes tipos de ATPases, que podem variar na função, estrutura e no tipo de iões que transportam. Neste caso, trata-se duma P-ATPase transportadora de ião Ca^{2+} , através da membrana utilizando como energia a hidrólise do ATP.

A proteína demonstrou possuir oito hélices transmembranares com domínios extramembranares de tamanhos variados (Figura 31).

Os resíduos polimórficos analisados encontram-se localizados em dois domínios funcionais proteicos diferentes (Figura 32). O resíduo 37 encontra-se na porção terminal N, uma região conservada da proteína que se estende do resíduo 3 ao 81 e que tem como função o transporte transmembranar de catiões (http://pfam.sanger.ac.uk/family?id=Cation_ATPase_N). Os resíduos 639 e 769 localizam-se no domínio funcional hidrolase que se estende do resíduo 352 ao 935. Este domínio possui actividade catalítica, actuando nos ácidos anidridos, catalizando movimento transmembranar de substâncias (<http://pfam.sanger.ac.uk/family?id=Hydrolase>).

RESULTADOS

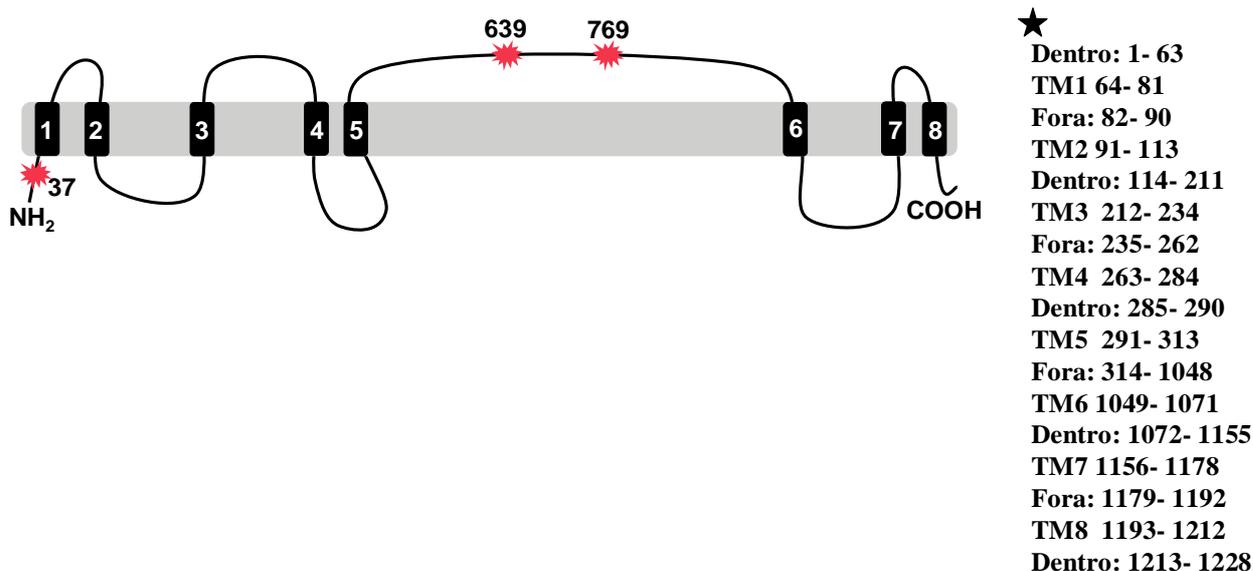


Figura 31 – Topologia membranar predita da proteína PfATPase6

(1 a 8 – Hélices transmembranares preditas utilizando: *TMHMM Server v. 2.0*, disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>; ★ -coordenadas dos aminoácidos; TM – Hélices transmembranares; * - Localização dos resíduos polimórficos analisados).



	Domínio	Resíduo Inicial	Resíduo Final
	Transportador de Catiões/ATPase_N	3	81
	E1-E2_ATPase	99	348
	Hidrolase	352	935
	Transportador de Catiões/ATPase_C	1031	1215

Figura 32 – Disposição dos domínios funcionais da proteína PfATPase6

(* - Localização dos resíduos polimórficos analisados; adaptado de <http://pfam.sanger.ac.uk/search?tab=searchSequenceBlock>).

III.2.2.3.4 – Gene *pfubp-1*

O gene *pfubp-1* apresenta um polimorfismo de tamanho na sua sequência, reflectindo-se na estrutura da proteína, a qual pode apresentar uma variação no número de repetições da sequência RMNHANRVS, que se inicia a nível do resíduo 701. No decorrer deste trabalho, os resultados de sequenciação deste gene demonstraram que o clone *P. falciparum* 3D7 apresenta 4 repetições da sequência referida enquanto que o clone *P. falciparum* Dd2 apresenta apenas duas. A nível do DNA, no clone Dd2 verifica-se que este polimorfismo se reflecte numa deleção de 54 nucleótidos comparativamente ao clone 3D7.

No intuito de aprofundar o conhecimento da estrutura populacional nas amostras provenientes de África e do Brasil, foi pesquisado em algumas amostras esse polimorfismo de tamanho encontrado no gene *pfubp-1*. Os resultados demonstraram que para além da deleção de 54 pares de bases (pbs) verificada anteriormente no clone padrão Dd2, algumas amostras apresentavam um único bloco de deleção equivalente a apenas 27 pbs, correspondendo à ausência da sequência RMNHANRVS na proteína traduzida.

Verificou-se ainda que a população parasitária proveniente do Ruanda apresenta uma maior diversidade, assim como combinações diversas entre o polimorfismo de tamanho neste gene e o genótipo do gene *pfATPase6*, enquanto que nas amostras do Brasil parece existir uma associação mais evidente entre o tamanho do polimorfismo e o genótipo do gene *pfATPase6*, dando origem a haplótipos característicos onde se inserem várias amostras diferentes (Tabela 17).

RESULTADOS

Tabela 17 – SNPs do gene *pfATPase6* analisados por sequenciação e polimorfismo de tamanho do gene *pfubp-1* (polimorfismos referentes a nucleótidos).

	IC50 (nM)	<i>pfATPase6</i>								<i>pfubp-1</i>
		110	345	1204	1291	1707	1888	1916	2694	T
3D7	ARS									
	0,7	G	A	T	G	T	G	G	T	0
Brasil	ATM									
	23,0	G	A	T	G	T	G	G	A	0
	22,5	G	A	T	G	T	G	G	A	0
	22,1	G	A	T	G	T	G	G	A	0
	12,6	G	A	T	G	T	G	G	A	1 0
	0,5	G	A	T	G	T	G	G	A	0
	0,5	G	A	T	G	T	G	G	A	0
	0,3	G	A	T	G	T	G	G	A	0
	0,2	G	A	T	G	T	G	G	A	0
	23,2	A	A	T	G	T	G	A	T	-27
	10,4	A	A	T	G	T	G	A	T	2 -27
	4,3	A	A	T	G	T	G	A	T	-27
	0,9	A	A	T	G	T	G	A	T	-27
	2,1	G	A	T	G	T	T	G	A	3 0
Ruanda	DHA									
	0,3	G	A	T	G	T	G	G	T	0
	14,3	G	A	T	G	T	G	G	A	-27
	8,8	G	G	T	G	A	G	G	A	-27
	4,7	G	A	T	A	T	G	G	A	-27
	0,5	G	A	G	G	T	G	G	A	-27
	9,6	-	A	T	G	T	G	G	T	-54
	0,3	G	A	T	G	T	G	G	T	-54
RDSTP	ATM									
	6,7	-	G	T	G	T	G	G	T	-27

Legenda: ARS – artesunato; ATM – atemeter; DHA – dihidroartemisinina; o sombreado cinzento representa o nucleótido mutado; - nucleótideo não definido; T – tamanho do polimorfismo do gene *pfubp-1*, **0** representa uma sequência idêntica ao clone de referência 3D7; **-27** representa uma deleção de 27 nucleótidos no gene; **-54** representa uma deleção de 54 nucleótidos no gene; 1, 2, 3 – haplótipos encontrados nos isolados do Brasil.

III.2.2.3.5 – Gene *pf sod1*

O gene *pf sod1* foi inicialmente inspeccionado por sequenciação no intuito de pesquisar potenciais polimorfismos, em 16 amostras seleccionadas, sendo 8 destas provenientes

RESULTADOS

do Ruanda e 8 da RDSTP. A análise comparativa das sequências obtidas revelou a existência de um único polimorfismo, D84G, nas amostras da RDSTP. Após análise por PCR-RFLP em 98 amostras do Ruanda, 69 da RDSTP e 66 do Brasil, verificou-se que a presença da mutação era exclusiva da população proveniente da RDSTP não tendo sido revelada nas restantes populações parasitárias inspeccionadas (Figura 33).

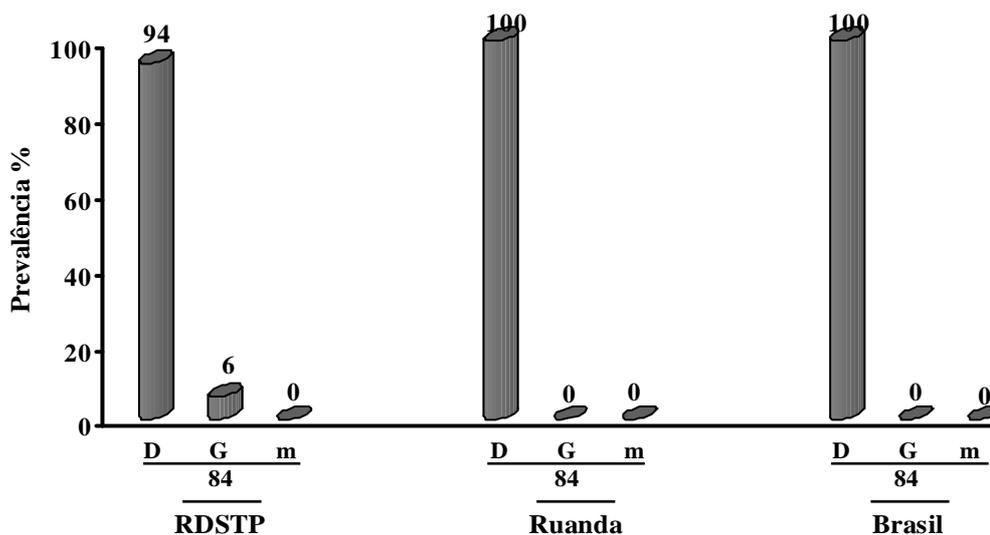


Figura 33 – Prevalência do SNP analisado no gene *pfsod1*
(m – mistura alelos; alelo selvagem – 84D, alelo mutado – 84G).

III.2.2.3.6 – Gene *pfyγcs*

No gene *pfyγcs* foi realizada a pesquisa dum polimorfismo de tamanho, anteriormente descrito entre estirpes diferentes de *P. falciparum* (Lüersen *et al.*, 1999). A proteína codificada por este gene, a γ -GCS, apresenta uma inserção a nível do aminoácido 514, que pode variar no seu número de aminoácidos. Essas inserções são sequências repetidas da sequência YQSNLQQQ (Lüersen *et al.*, 1999).

Após se ter verificado a existência desse polimorfismo de tamanho por observação de produtos amplificados em gel de agarose, foi obtida a sequência da porção do gene onde a mesma se insere em 13 amostras da RDSTP, tendo a análise das sequências confirmado que estes polimorfismos de tamanho se devem a inserções de sequências repetitivas ricas em Glutamina (Figura 34), tal como descrito anteriormente em estirpes diferentes de *P. falciparum*.

RESULTADOS

Com o intuito de alargar o conhecimento sobre a representação intra-populacional desse polimorfismo, foi realizada a sua pesquisa recorrendo à análise de tamanho de produtos de PCR em gel de agarose, fazendo uso de *primers* flanqueadores da sequência polimórfica em 69 amostras da RDSTP, 98 do Ruanda e 66 do Brasil.

Nos isolados do Ruanda e da RDSTP, após visualização dos produtos amplificados, verificou-se existir um elevado grau de polimorfismos de tamanho ao nível intra-populacional (Figura 35). Foram encontrados 8 e 9 alelos, respectivamente, com diferentes tamanhos. Os diferentes polimorfismos foram organizados de 1 a 8, no caso do Ruanda e de 1 a 9 no caso da RDSTP, por ordem crescente de tamanho.

Nos isolados do Brasil ao contrário dos isolados de África, em que se verificou existir um elevado grau de polimorfismos de tamanho a nível intra-populacional, observou-se a existência de somente dois polimorfismos de tamanho, com predominância de 91% de um deles (Figura 35).

Em resumo, foram encontrados 9 alelos com diferente tamanho nos isolados da RDSTP, 8 alelos nos isolados do Ruanda e 2 alelos nos isolados do Brasil, revelando-se assim uma diversidade alélica significativamente mais elevada em parasitas Africanos. Os resultados relativos à caracterização de cada um dos isolados das áreas estudadas relativamente a este polimorfismo de tamanho são apresentados nos Anexos 10, 11 e 12.

1- YQSDLQQQ CQSDLQQQ YQSNLQQQ NVQPKQRQQMIQYV
2- YQSNLQQQ YQSNLQQQ CQSDLQQQ YQSNLQQQ NVQPKQRQQMIQYV
3- YQSNLQQQ YQSDLQQQ YQSDLQQQ CQSDLQQQ YQSNLQQQ NVQPKQRQQMIQYV
4- YQSNLQQQ YQSDLQQQ YQSDLQQQ YQSDLQQQ CQSDLQQQ YQSNLQQQ NVQPKQRQQMIQYV
5- YQSNLQQQ YQSNLQQQ YQSDLQQQ YQSDLQQQ YQSDLQQQ CQSDLQQQ YQSNLQQQ NVQPKQRQQMIQYV
...

Figura 34 – Sequências traduzidas da região polimórfica do gene *pfygc* em algumas amostras da RDSTP, exemplificando inserções repetidas da sequência YQSNLQQQ na proteína predita (1, 2, 3, 4, 5 – amostras da RDSTP).

RESULTADOS

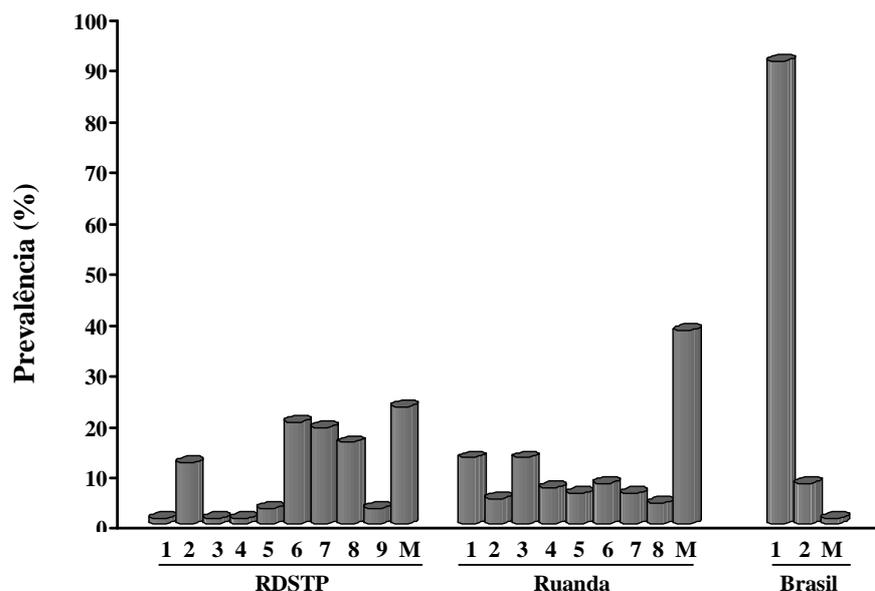


Figura 35 – Prevalência do polimorfismo de tamanho do gene *pfygc* nos isolados das três áreas endêmicas estudadas (1 <2 <3 <4 <5 <6 <7 <8 <9 – polimorfismo de tamanho; M – mistura de alelos de tamanho diferente).

III.2.2.3.7 – Genes *pftctp*, *pfgst*, *pftrx1* e *pftrx2*

A análise das sequências obtidas para os genes *pftctp*, *pfgst*, *pftrx1* e *pftrx2* em 8 amostras da RDSTP e 8 do Ruanda, revelaram a inexistência de polimorfismos.

III.2.2.4 – Correlação dos polimorfismos genéticos com a eficácia *in vitro* dos antimaláricos testados

No intuito de se proceder à análise da correlação entre os diferentes genótipos e a susceptibilidade aos derivados da artemisinina e dado não existir um valor de IC50 previamente apontado como o limiar de resistência *in vitro*, foi inicialmente estipulada como barreira de divisão o valor da média geométrica dos IC50s de cada fármaco. Subsequentemente, as amostras foram organizadas tendo em conta os seus IC50s, que se situaram acima ou abaixo desse valor. No caso da amodiaquina, para se classificarem as amostras de acordo com a sua resposta *in vitro*, foi utilizado o valor limite de resistência equivalente a 60 nM, previamente determinado (Basco *et al.*, 2002). Os dados foram agrupados em tabelas de contingência 2x2, e verificada a significância das potenciais associações entre os genótipos e a eficácia *in vitro* aos fármacos em estudo,

RESULTADOS

usando o teste de Fisher (<http://faculty.vassar.edu/lowry/fisher.html>). As associações foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $P \leq 0,05$.

A prevalência extremamente elevada de alguns alelos nos genes em análise impediu a realização de uma avaliação estatística apropriada da correlação entre todos os genótipos e a resposta dos parasitas aos compostos em análise.

Após tratamento estatístico, verificou-se assim a ausência de associação entre as mutações pontuais analisadas e as respostas *in vitro* aos antimaláricos testados em todas as áreas estudadas (Tabela 18).

No intuito de se pesquisar uma potencial correlação entre o polimorfismo de tamanho no gene *pfygc*s e a susceptibilidade aos fármacos em estudo, as amostras foram agrupadas de acordo com o seu valor de IC50 para cada fármaco em estudo, por ordem crescente. Conseqüentemente, avaliou-se a correlação entre o tamanho do alelo e os valores de susceptibilidade a cada um dos fármacos, utilizando o teste estatístico de correlação *Spearman Rank Order Correlation* (Wessa, 2007).

Os resultados demonstraram que nas amostras do Ruanda se verificou existir uma correlação estatisticamente significativa entre o aumento do tamanho do polimorfismo do gene *pfygc*s e a diminuição da susceptibilidade à amodiaquina, onde $P=0,02$ (Tabela 18).

Tabela 18 – Valores de P , significância estatística da correlação entre os diferentes polimorfismos e a susceptibilidade aos antimaláricos (DHA – dihidroartemisinina, AMD – amodiaquina, ARS – artesunato, ATM – artemeter).

		<i>pfygc</i> s	<i>pfmdr1</i>				<i>pfert</i>	<i>pfsod1</i>	<i>pfATPase6</i>		
			<i>N86Y</i>	<i>F184Y</i>	<i>N1042D</i>	<i>D1246Y</i>	<i>N75E</i>	<i>D84G</i>	<i>R37K</i>	<i>G639D</i>	<i>T2694A</i>
Ruanda	AMD	0,02	0,62	0,8	-	0,16	0,92	-	-	-	0,29
	DHA	0,08	0,17	0,78	-	0,55	0,55	-	-	-	0,12
RDSTP	AMD	0,76	0,84	0,64	-	0,57	-	0,61	-	-	0,69
	ARS	0,73	0,65	0,43	-	0,35	-	0,12	-	-	0,07
	ATM	0,81	0,51	0,78	-	0,29	-	0,75	-	-	0,57
Brasil	ARS	0,66	-	-	0,41	-	-	-	0,55	0,41	0,44
	ATM	0,66	-	-	0,38	-	-	-	0,59	0,38	0,66

III.2.2.5 – Estimativa do nº de cópias dos genes em estudo

A expressão diferencial e/ou nº de cópias alterado de alguns dos genes em análise tem sido associado a diferentes respostas dos parasitas aos derivados da artemisinina. Esta possibilidade de que parasitas com diferentes susceptibilidades, poderiam ter sofrido amplificação desses genes foi investigada. Assim, foi efectuada uma estimativa do nº de cópias dos genes *pfsod1*, *pfmdr1*, *pfpx*, *pfATPase6*, *pfgr*, *pftctp*, *pftrx1*, *pftrx2* e *pfprx* em 8 isolados de *P. falciparum* do Ruanda e 8 isolados de *P. falciparum* da RDSTP e no clone de *P. falciparum* Dd2 (controlo). No caso das amostras provenientes do Brasil procedeu-se apenas à quantificação do número de cópias dos genes *pfmdr1* e *pfATPase6*, num total de oito amostras. Os 8 isolados de cada área endémica foram seleccionados de acordo com os IC50s relativos ao artesunato no caso do Brasil, ao artemeter na RDSTP e dihidroartemisinina no Ruanda, tendo sido testados os 4 isolados com os IC50s mais elevados e os 4 isolados com os IC50s mais baixos de cada região estudada, como anteriormente referido.

Esta estimativa foi feita por PCR em tempo real com detecção com *SYBR Green I*, utilizando como método de quantificação o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Para utilizar este método procedeu-se primeiramente à sua validação, o que foi levado a cabo com sucesso, tal como descrito anteriormente (III.1.2.2). Como controlo multi-cópias foi utilizado DNA do clone de *P. falciparum* Dd2 dado possuir 4 cópias do gene *pfmdr1* (III.1.2.3).

Cada isolado foi analisado em 3 experiências independentes, sendo o resultado final a média do nº de cópias resultante dos três ensaios. Assumiu-se que o isolado possuía uma cópia do gene alvo quando os valores da estimativa se encontravam entre 0,7 e 1,3.

De acordo com os resultados obtidos nas populações parasitárias naturais observou-se que todos os parasitas estudados apresentam uma única cópia de cada gene (Tabela 19), indicando que a variação observada na gama de respostas aos fármacos em estudo não depende de amplificações ou deleções nos genes analisados.

RESULTADOS

Tabela 19 – N° estimado de cópias dos genes em análise

GENE	<i>pfmdr1</i>	<i>pfATPase6</i>	<i>pfctcp</i>	<i>pfgpx</i>	<i>pfsod1</i>	<i>pfgr</i>	<i>pfgst</i>	<i>pftrx1</i>	<i>pftrx2</i>	<i>pfprx</i>	
Número estimado de cópias relativamente ao clone de <i>P. falciparum</i> 3D7											
RDSTP	IC50s										
	ATM (nM)										
	0,2	1,0	0,9	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0	1,3	1,1	0,9
	0,2	1,0	1,0	1,1	1,0	0,9	1,0	1,1	1,1	1,0	1,0
	0,2	1,0	0,9	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0	1,2
	0,2	0,9	1,0	1,0	0,9	0,9	1,0	0,9	1,2	1,2	1,1
	2,3	0,9	0,9	0,9	1,0	1,0	1,0	1,0	1,3	1,1	1,0
	4,1	1,0	0,9	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9	0,9	1,1
6,7	1,0	0,9	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0	1,1	1,1	
12,2	1,3	1,1	1,0	1,0	1,1	1,1	0,9	1,0	1,0	1,1	
Ruanda	IC50s										
	DHA (nM)										
	0,3	1,0	1,1	1,0	0,9	1,0	1,0	0,8	1,1	1,0	1,0
	0,3	0,9	1,1	1,0	1,0	1,2	1,0	0,9	1,0	1,1	1,0
	0,4	0,8	0,8	0,8	0,8	1,0	0,8	0,8	1,0	0,9	0,9
	0,5	1,2	1,1	1,0	1,0	1,2	1,0	0,9	1,0	1,1	0,8
	8,8	1,0	0,8	0,9	0,9	0,9	0,8	1,1	1,0	0,8	0,9
	9,6	0,9	1,0	1,1	1,0	1,1	1,0	0,8	1,1	1,0	1,0
10,1	0,8	0,8	1,0	0,9	1,0	0,9	0,8	1,0	1,0	0,9	
14,3	1,0	0,9	0,8	0,8	1,0	0,9	0,8	1,1	1,0	1,1	
Brasil	IC50s										
	ARS (nM)										
	0,2	1,0	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,2	1,1	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,5	0,7	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,6	0,9	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-
	3,1	1,0	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-
	4,8	1,0	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-
4,8	0,8	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	
4,9	1,0	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	
Dd2	0,1	4,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Legenda: Dd2 - controlo de número de cópias conhecido relativamente ao gene *pfmdr1*. ARS - artesunato, ATM - artemeter, DHA - dihidroartemisinina; (o n° de cópias resultou da média de 3 experiências independentes).

III.3 – SELECÇÃO *IN VITRO* DE PARASITAS DE *P. falciparum* RESISTENTES À ARTEMISININA E SUA ANÁLISE GENOTÍPICA

III.3.1 – Protocolo de selecção

Neste estudo pretendeu-se obter clones de *Plasmodium falciparum* resistentes à artemisinina a partir de clones sensíveis ao fármaco. Para tal, foi desenvolvido e optimizado um protocolo de geração de parasitas resistentes, que incluiu mutagenização e subsequente selecção através de exposição à artemisinina, descrito em pormenor nas secções II.5.6 e II.5.7. Assim, numa fase inicial, os parasitas foram expostos a um agente mutagénico (MNNG) previamente à selecção por pressão de artemisinina, processo ciclicamente repetido em cultura contínua. Assim sendo, as culturas de *P. falciparum* contendo eritrócitos parasitados foram sujeitas a 3 ciclos completos de mutagenização e posterior tratamento com concentrações crescentes de artemisinina. Após cada processo de mutagenização, a cultura foi dividida, sendo uma parte sujeita a tratamento enquanto que a outra parte (cultura controlo), foi mantida nas mesmas condições paralelamente, mas na ausência de tratamento, para avaliação do crescimento e comportamento dos parasitas em cultura.

No decorrer do 4º ciclo de mutagenização verificou-se que o crescimento dos parasitas se encontrava significativamente diminuído. A causa dessa diminuição no crescimento foi atribuída à acção do agente mutagénico que poderia ter sido o responsável pela perda de viabilidade, possivelmente originada por excesso de mutações desfavoráveis. A recuperação do crescimento e viabilidade dos parasitas mantidos em cultura foi então monitorizada e avaliada pela observação diária da morfologia dos parasitas e tempo de crescimento. Nesta fase, quando se considerou que os parasitas haviam recuperado a sua viabilidade e crescimento normais, reiniciou-se o processo de selecção tendo-se alterado no entanto a metodologia que passou a incorporar unicamente a administração cíclica de artemisinina na ausência de agente de mutagénese (Figura 36).

No decorrer de todo o processo foram mantidas culturas controlo nas mesmas condições a que foram sujeitas as culturas tratadas, à excepção do tratamento com artemisinina.

RESULTADOS

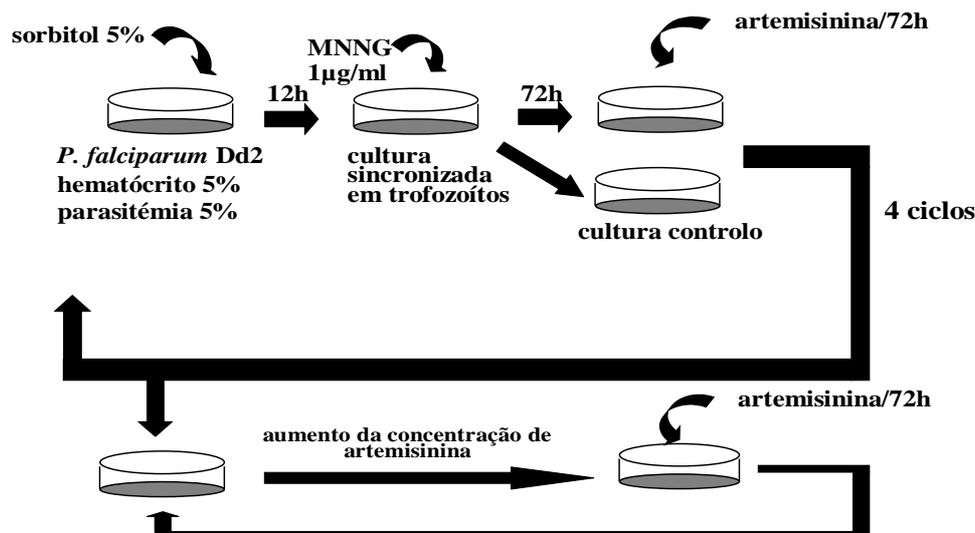


Figura 36 – Esquema do protocolo de selecção realizado (MNNG – mutagénio).

III.3.2 – Resultados do processo de selecção

A selecção de parasitas resistentes à artemisinina foi realizada a partir do clone de *P. falciparum* Dd2 tendo-se exposto estes parasitas a uma concentração inicial relativa a valor de IC₅₀ da artemisinina, ou seja, $1 \pm 0,05$ nM (desvio padrão), valor calculado no nosso laboratório. A quantidade de fármaco administrada a cada ciclo subsequente não obedeceu a nenhuma regra em particular, tendo-se baseado fundamentalmente na observação empírica do comportamento dos parasitas no ciclo anterior, em termos de crescimento e viabilidade.

O processo de selecção contemplou um total de 10 ciclos de tratamento realizados ao longo de aproximadamente 24 meses. Foram inicialmente realizados 4 ciclos de mutagenização e tratamento, após os quais a cultura em selecção já apresentava uma tolerância cinco vezes superior (5 nM) em relação à cultura progenitora (Figura 37). A partir desta seguiram-se 6 ciclos só de tratamento com artemisinina, tendo-se verificado que os parasitas toleraram bem os aumentos de artemisinina administrados. A concentração administrada no último ciclo de selecção demonstrou ser 100 vezes superior à utilizada no primeiro ciclo de tratamento, ou seja 100 nM, indicando uma diminuição significativa na susceptibilidade dos parasitas à artemisinina (Figura 37). Nesta fase do trabalho considerou-se que havia deste modo sido seleccionada uma

RESULTADOS

população de parasitas resistentes que passou a denominar-se *P. falciparum* Dd2-ARTmut.

De forma a excluir a possibilidade de que o MNNG ou outros factores extrínsecos além da artemisinina pudessem ser responsáveis pelo aumento da fármaco-tolerância observada, no decorrer de todo o processo foram mantidos controlos que consistiam em parasitas em cultura nas mesmas condições dos parasitas tratados, mas na ausência de fármaco. O valor do IC50 relativo à artemisinina destes parasitas foi semelhante ao do clone Dd2 progenitor, o que confirma a observação de que o nível de resistência observado na estirpe Dd2-ARTmut foi causado por pressão exclusiva de artemisinina.

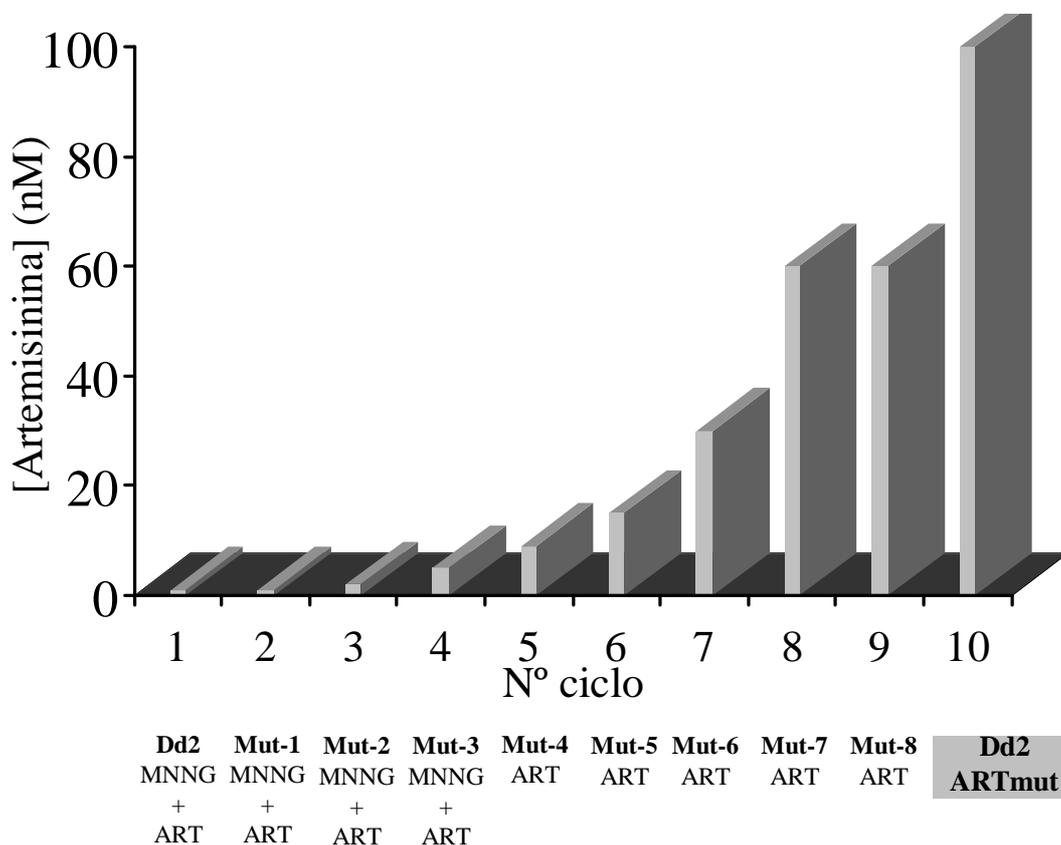


Figura 37 – Processo de selecção

(MNNG – mutagénio, ART – artemisinina; Mut – cultura em processo de selecção sujeita a concentrações crescentes de artemisinina, respectivamente, Mut-1 – 1 nM, Mut-2 – 2 nM, Mut-3 – 5 nM, Mut-4 – 9 nM, Mut-5 – 15 nM, Mut-6 – 30 nM, Mut-7 – 60 nM, Mut-8 – 60 nM, Dd2-ARTmut – 100 nM).

III.3.3 – Clonagem

Após ter sido seleccionada uma população de parasitas com susceptibilidade reduzida à artemisinina, pretendiam-se isolar populações parasitárias isogénicas (clones) resistentes, a partir da mesma. Assim procedeu-se à produção de clones fazendo uso de um método de clonagem por diluição limite usando a estirpe Dd2-ARTmut como material biológico de partida (a metodologia seguida encontra-se descrita em pormenor na secção II.5.8).

Sumariamente, a estirpe Dd2-ARTmut foi diluída em meio de cultura, de modo a que se obtivesse uma solução à concentração de 1×10^6 parasitas/ml, a partir da qual se efectuaram diluições seriadas em meio de cultura de forma a obter 10000 parasitas/100 μ l, 1000 parasitas/100 μ l, 100 parasitas/100 μ l, 10 parasitas/100 μ l, 1 parasita/100 μ l e 0,5 parasita/100 μ l. O processo de clonagem foi efectuado numa placa de cultura de 96 poços (Sarstedt™), na qual foram colocados 100 μ l por poço de cada diluição contendo um determinado n° de parasitas.

A monitorização do crescimento da cultura foi posteriormente realizada através de observação por microscopia óptica das lâminas feitas a partir dos poços com 10000, 1000, 100 e 10 parasitas, tendo-se iniciado ao 6° dia e com uma periodicidade de 48 horas ao longo do processo de cultura. Ao 21° dia foram realizadas lâminas a partir dos poços com 1 e 0,5 parasitas, tendo-se verificado existir crescimento parasitário em cinco culturas correspondendo aos poços contendo inóculos de 0,5 ou 1 parasita.

Dos cinco clones obtidos, foram cultivados com sucesso dois, os quais foram criocongelados e denominados de ARTmut1 e ARTmut2.

III.3.4 – Investigação da estabilidade do fenótipo de resistência na estirpe *P. falciparum* Dd2-ARTmut

No intuito investigar a estabilidade do fenótipo de resistência à artemisinina, a estirpe Dd2-ARTmut foi criocongelada, posteriormente descongelada e reposta em cultura na ausência de pressão de artemisinina durante 3 semanas, tendo-se então reavaliado o seu valor de IC50 relativamente à artemisinina. Os resultados demonstraram que os valores

dos IC50s da Dd2-ARTmut eram semelhantes ao seu progenitor Dd2, reflectindo deste modo uma reversão do fenótipo na ausência de pressão de fármaco. Por outras palavras, a perda de resistência nos parasitas seleccionados indica que a estirpe Dd2-ARTmut adquiriu um fenótipo transitório. A estirpe revertente passou a ser denominada Dd2-ARTmutREV.

III.3.5 – Caracterização do perfil genotípico da estirpe *P. falciparum* Dd2-ARTmut

Nesta fase do trabalho procedeu-se à comparação do perfil de alguns genes em estudo entre a estirpe *P. falciparum* Dd2-ARTmut seleccionada e o seu progenitor Dd2, com o objectivo de verificar a existência de diferenças que pudessem relacionar a alteração verificada na susceptibilidade à artemisinina.

Sumariamente, a procura dos possíveis mecanismos responsáveis pela alteração da susceptibilidade à artemisinina baseou-se na pesquisa de polimorfismos nos genes putativos em análise e na estimativa de potenciais diferenças no número de cópias e/ou nos seus níveis de expressão.

III.3.5.1 – Pesquisa de polimorfismos

A procura de SNPs por sequenciação foi realizada em três genes: no *pfcr1*, no *pfATPase6* e no *pfubp-1*, para os quais foi obtida com sucesso a maioria da sequência codificante na estirpe Dd2-ARTmut e no seu progenitor sensível, o clone *P. falciparum* Dd2 (Figura 38). Após análise e comparação das mesmas, verificou-se não existirem diferenças entre as sequências analisadas (Tabela 20).

Foram também pesquisados SNPs por PCR-RFLP no gene *pfmdr1* e o polimorfismo de tamanho do gene *pfygc5*, tendo-se aqui também verificado não existirem diferenças entre a estirpe Dd2-ARTmut e o clone progenitor sensível (Tabela 20).

Em conclusão, a selecção de resistência transitória à artemisinina *in vitro* não provocou mutações nos genes *pfcr1*, *pfATPase6* e *pfubp-1*, nem alterações nos polimorfismos pesquisados nos genes *pfygc5* e *pfmdr1*.

RESULTADOS

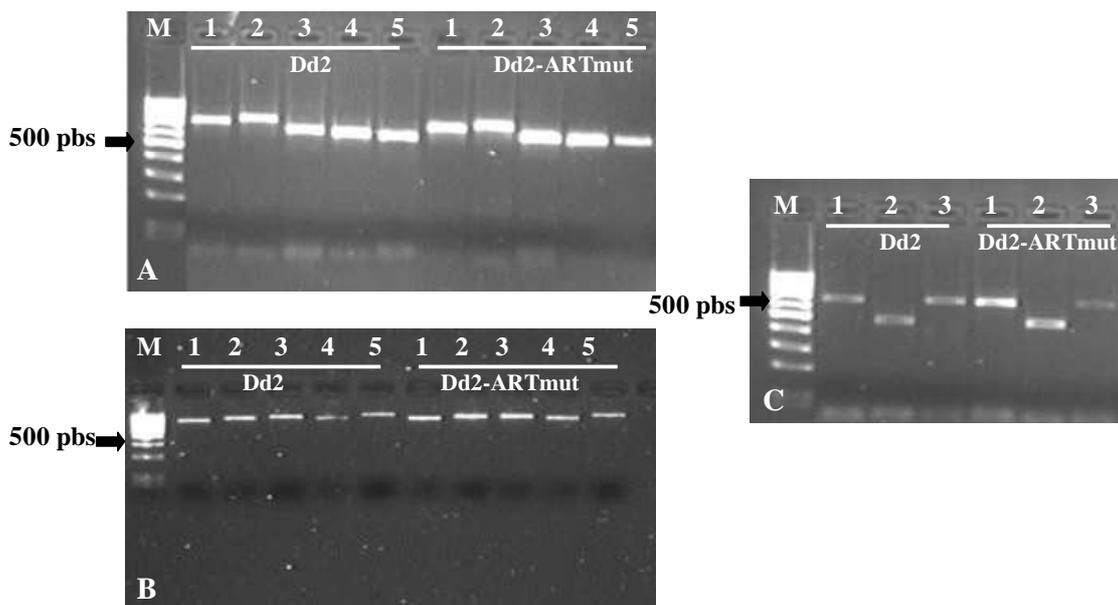


Figura 38 – Géis de agarose (2%) com resultados das ampliações dos fragmentos para sequenciação dos genes *pfATPase6* (A), *pfubp-1* (B) e *pfert* (C) (M -marcador de peso molecular: *MassRuler™ DNA Ladder, Low Range* (Fermentes™); 1, 2, 3, 4, 5 correspondem aos fragmentos amplificados com os pares de *primers* correspondentes 1F/2R, 3F/4R, 5F/6R, 7F/8R, 9F/10R, respectivamente);

A – Tamanho dos fragmentos esperado após a amplificação (pbs): 1 – 684, 2 – 740, 3 – 754, 4 – 696, 5 – 793.

B – Tamanho dos fragmentos esperado após a amplificação (pbs): 1 – 759, 2 – 809, 3 – 689, 4 – 723, 5 – 640.

C – Tamanho dos fragmentos esperado após a amplificação (pbs): 1 – 658, 2 – 482, 3 – 669.

Tabela 20 – Resultados da análise dos SNPs (* - polimorfismo referente a um nucleótido).

Gene	<i>pfmdr1</i>				<i>pfATPase6</i>			<i>pfert</i>	
	N86Y	N1042D	D1246Y	R37K	G639D	S769N	T2694A*	N75E	K76T
Dd2	Y	N	D	R	G	S	A	E	T
Dd2-ATRmut	Y	N	D	R	G	S	A	E	T

RESULTADOS

III.3.5.2 – Estimativa do nº de cópias dos genes *pfATPase6* e *pfmdr1*

No intuito de investigar a causa da alteração na susceptibilidade da estirpe seleccionada Dd2-ARTmut relativamente ao seu progenitor Dd2, procedeu-se à estimativa do nº de cópias dos genes *pfATPase6* e *pfmdr1* nos parasitas relativamente ao clone de *P. falciparum* 3D7 por PCR em tempo real como descrito na secção II.3.12. Para tal, foram realizadas três experiências independentes, tendo o resultado final sido expresso como a média dessas três experiências (Tabela 21). Posteriormente, procedeu-se à mesma análise na estirpe resultante da reversão de resistência, Dd2-ARTmutREV (Tabela 21).

No caso do gene *pfATPase6*, verificou-se que a estirpe Dd2-ARTmut e o clone Dd2 possuem uma única cópia relativamente ao clone de *P. falciparum* 3D7, ou seja, não houve alteração do nº de cópias deste gene como resultado da resistência transitória (Tabela 21). O mesmo foi verificado para a estirpe Dd2-ARTmutREV (Tabela 21).

No entanto, no caso do gene *pfmdr1* observou-se que a estirpe Dd2-ARTmut possuía aproximadamente 6 cópias do gene *pfmdr1* relativamente ao clone de *P. falciparum* 3D7, enquanto que o clone de *P. falciparum* Dd2 possuía 4 cópias. Por outras palavras a geração de resistência à artemisinina *in vitro*, promoveu a selecção de parasitas contendo duas cópias extra do gene *pfmdr1*, relativamente aos progenitores sensíveis (Figura 39). No entanto, verificou-se a permanência destas cópias adicionais mesmo após da reversão do fenótipo de resistência, facto evidenciado pela observação de que a estirpe Dd2-ARTmutREV continua a possuir 6 cópias do gene (Tabela 21)

Tabela 21 – N ° de cópias dos genes *pfATPase6* e *pfmdr1*, no clone Dd2, Dd2ARTmut e Dd2ARTmutREV relativamente ao clone 3D7 (Nº cópias – média das 3 experiências; exp. – experiência; DP – desvio padrão)

GENE		Nº de cópias do gene relativamente ao clone 3D7				
		1ª exp.	2ª exp.	3ª exp.	Nº cópias	DP
<i>pfATPase6</i>	Dd2	1,0	1,0	1,1	1,0	0,06
	Dd2-ARTmut	1,1	1,0	1,0	1,0	0,06
	Dd2-ARTmutREV	0,9	1,0	1,1	1,0	0,10
<i>pfmdr1</i>	Dd2	4,0	3,6	3,7	3,8	0,17
	Dd2-ARTmut	6,4	6,5	6,1	6,3	0,21
	Dd2-ARTmutREV	6,0	6,3	6,1	6,1	0,15

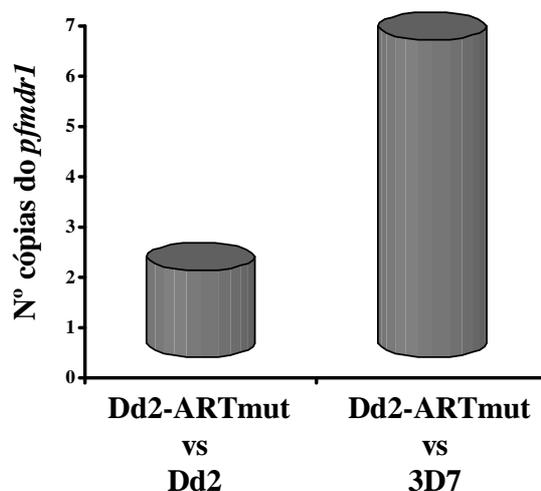


Figura 39 – Nº de cópias do gene *pfmdr1* na estirpe Dd2-ARTmut relativamente ao clone progenitor Dd2 e ao clone 3D7

III.3.5.3. – Resultados dos níveis de expressão do gene *pfmdr1*

Nesta fase do estudo, os resultados obtidos evidenciavam uma amplificação do gene *pfmdr1* na estirpe resistente Dd2-ARTmut, tal como descrito na secção anterior. Pretendeu-se assim averiguar se essa amplificação ao nível genómico era acompanhada pelo aumento da expressão do gene ao nível transcripcional. Deste modo, procedeu-se à quantificação dos níveis de expressão do gene *pfmdr1* no clone de *P. falciparum* Dd2 e na estirpe seleccionada Dd2-ARTmut, relativamente ao clone de *P. falciparum* 3D7, utilizando novamente a técnica de PCR em tempo real, mas utilizando cDNA como molécula alvo.

Após análise dos resultados foi verificado que o gene *pfmdr1* se expressa 6,3 vezes mais no clone Dd2 e 12,3 vezes mais na estirpe Dd2-ARTmut, relativamente ao clone 3D7 (Tabela 22). Assim sendo este gene é expresso aproximadamente duas vezes mais na estirpe Dd2-ARTmut, relativamente ao clone progenitor Dd2 (Figura 40).

RESULTADOS

Tabela 22 – Expressão do gene *pfmdr1* relativamente ao clone 3D7
(Nfold – média das 3 experiências; exp. – experiência; DP – desvio padrão)

	Expressão do gene <i>pfmdr1</i> relativamente ao clone 3D7				
	1ªexp.	2ªexp.	3ªexp.	NFold	DP
Dd2	6,2	6,4	6,3	6,3	0,10
Dd2-ARTmut	12,0	12,4	12,4	12,3	0,23

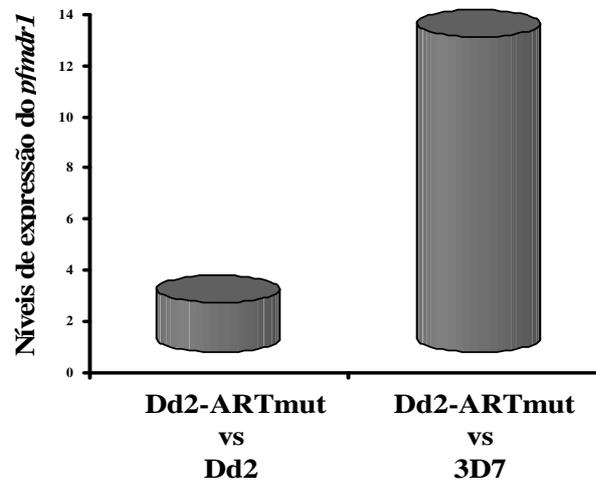


Figura 40 – Expressão do gene *pfmdr1* na estirpe Dd2-ARTmut relativamente ao clone progenitor Dd2 e ao clone 3D7

IV – DISCUSSÃO

Actualmente, um dos maiores obstáculos à contenção eficaz da malária origina-se na problemática da resistência do *Plasmodium falciparum* à maioria dos antimaláricos em uso (Golenser *et al.*, 2006). Excepcionalmente, a resistência *in vivo* à artemisinina e seus derivados não foi ainda detectada. Contudo, é amplamente aceite que existe um risco real de aparecimento de resistência a esta classe de compostos e que tal representaria uma situação virtualmente catastrófica em termos do impacto da malária, visto que i) a ausência duma vacina eficaz faz com que o tratamento farmacológico adequado seja um dos componentes fundamentais no controlo da malária; ii) o *P. falciparum* já se tornou resistente à maioria dos antimaláricos disponíveis; iii) estirpes de *Plasmodium chabaudi chabaudi* com resistência à artemisinina e artesunato geneticamente estável foram já seleccionadas (Afonso *et al.*, 2006); iv) foi reportada a ocorrência de isolados de *P. falciparum* com reduzida susceptibilidade *in vitro* ao artemeter (Jambou *et al.*, 2005) e v) a O.M.S. reconhece que se o *P. falciparum* desenvolver resistência aos derivados da artemisinina, não haverá alternativas terapêuticas eficazes para a malária nos próximos 10 anos (W. H. O., 2006b). Deste modo, no intuito de salvaguardar a eficácia da artemisinina e seus derivados é essencial que se procedam a ensaios regulares de fármaco-vigilância que incluam testes de avaliação da actividade *in vitro* bem como rastreio de mutações potencialmente moduladoras da resposta a estes fármacos. Este tipo de estudo assume hoje em dia uma relevância aumentada tendo em conta que estes compostos estão a ser introduzidos em larga escala a nível mundial, especialmente em combinação com outros fármacos, exercendo uma enorme pressão selectiva que em muitos casos poderá promover a selecção de mutantes resistentes. O uso inadequado e sem controlo destes compostos, situação frequente no tratamento da malária, poderá contribuir adicionalmente para o surgimento de parasitas resistentes.

No âmbito acima descrito, este trabalho teve como finalidade investigar diversos aspectos do fenótipo e genótipo do perfil de fármaco-susceptibilidade à artemisinina e seus derivados no parasita de malária *Plasmodium falciparum*, recorrendo a populações naturais de parasitas e a um modelo *in vitro* de laboratório. Neste sentido, foi efectuado um estudo multicêntrico, onde se avaliou a susceptibilidade *in vitro* a derivados da artemisinina em populações naturais de *P. falciparum* provenientes do Ruanda, da República Democrática de São Tomé e Príncipe (RDSTP) e do Brasil e se investigou o perfil genotípico de determinados genes candidatos nas mesmas amostras.

No laboratório, utilizou-se o clone *P. falciparum* Dd2 para seleccionar clones resistentes à artemisinina *in vitro*.

Em todos os parasitas efectuaram-se estudos de associação entre os níveis de susceptibilidade aos derivados da artemisinina e mutações ou alteração no número de cópias de genes previamente apontados como potenciais moduladores da resposta a esta classe de antimaláricos, tais como os genes *pfcr1*, *pfmdr1*, *pfATPase6*, *pfctcp* e *pfubp-1*, bem como genes que codificam proteínas envolvidas nos mecanismos de defesa ao stress oxidativo, propostos no âmbito deste trabalho: *pfsod1*, *pfgst*, *pfygc5*, *pfgr*, *pfgrp*, *pftrx1*, *pftrx2* e *pfprx*.

IV.1 - ESTUDO MULTICÊNTRICO DE AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* AOS DERIVADOS DA ARTEMISININA E ESTUDO GENÉTICO *MULTILOCUS* EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *P. falciparum* DE ÁFRICA E AMÉRICA DO SUL

As populações naturais de *P. falciparum* Africanas provenientes da RDSTP e Ruanda foram fenotipadas relativamente à sua susceptibilidade *in vitro* aos derivados da artemisinina, componente principal desta tese, e à amodiaquina que foi incluída como complemento ao estudo por ser um composto utilizado em combinação com estes fármacos.

Na RDSTP o trabalho de avaliação da susceptibilidade *in vitro* ao artemeter, artesunato e amodiaquina, foi realizado em parceria com o respectivo Ministério da Saúde, com o objectivo de determinar a susceptibilidade basal do *P. falciparum* relativamente a estes compostos que iriam integrar a nova política terapêutica local de combate à malária. A pesquisa de polimorfismos genéticos nas amostras testadas foi efectuada em paralelo com o intuito de identificar mutações que possam futuramente funcionar como ferramentas adicionais de fármaco-vigilância para monitorização da eficácia destes antimaláricos. Os resultados deste estudo, efectuado em parceria com o Centro Nacional de Endemias da RDSTP, foram publicados (Ferreira *et al.*, 2007) e poderão ser utilizados em estudos futuros como dados de base comparativos.

No Ruanda, o estudo de susceptibilidade *in vitro* foi realizado pelos colegas do Institut de Recherche en Sciences de la Santé, Bobo Dioulasso, Burkina Faso e Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, Antwerpen, Belgium, como anteriormente referido. Entre outros antimaláricos testados, fizeram parte a amodiaquina e a dihidroartemisinina, por integrarem os protocolos de tratamento da malária actualmente implementados nesse País, no intuito de se avaliar o comportamento destes antimaláricos e eventual resistência cruzada nesta área de elevada resistência à cloroquina (Rwagacondo *et al.*, 2003; Tinto *et al.*, 2006).

Nas amostras de *P. falciparum* provenientes da América do Sul, mais especificamente do Estado do Pará, Norte do Brasil, foi avaliada a susceptibilidade *in vitro* relativamente ao artemeter e artesunato. Apesar do protocolo de tratamento oficial em 2005 ainda não integrar os derivados da artemisinina, as razões que levaram à escolha desta região para a realização dum estudo integrado neste trabalho foram: i) a sua proximidade geográfica com a Guiana Francesa, região onde foram encontrados parasitas com susceptibilidade reduzida ao artemeter (Jambou *et al.*, 2005), sugerindo este facto que mutantes tolerantes à artemisinina já estão presentes na Amazónia; ii) por se tratar duma região com elevado fluxo migratório e não controlado (Vasconcelos *et al.*, 2006), o que permite a circulação de pessoas portadoras de estirpes com reduzida susceptibilidade aos derivados da artemisinina entre os vários países que fazem parte da região Amazónica; e iii) estar envolvida por uma zona com mercado informal de medicamentos, o que facilita a circulação e uso inadequado dos derivados de artemisinina.

Os resultados deste estudo, efectuado em parceria com o Instituto Evandro Chagas de Belém do Pará, foram também publicados (Ferreira *et al.*, 2008) e poderão ser utilizados em estudos futuros como valores de referência da susceptibilidade basal *in vitro* dos isolados desta região aos derivados da artemisinina: artemeter e artesunato, assim como do respectivo perfil genotípico relativamente aos moduladores de susceptibilidade aos antimaláricos analisados, visto ser o primeiro ensaio realizado nesta região do Brasil que aborda em conjunto estes dois assuntos. Este trabalho revela-se duma grande importância uma vez que a combinação terapêutica com derivados da artemisinina está a ser iniciada como terapêutica de primeira linha no tratamento da malária neste País.

IV.1.1 – Susceptibilidade *in vitro* relativamente à amodiaquina

A combinação terapêutica amodiaquina-artesunato é uma das combinações utilizadas actualmente como terapêutica de primeira linha em vários países. Estudos terapêuticos recentes indicam resultados promissores, com elevada eficácia e tolerabilidade demonstradas a esta combinação (Bonnet *et al.*, 2007; Holmgren *et al.*, 2007; Oyakhirome *et al.*, 2007). Neste sentido, a avaliação contínua da eficácia destes compostos através da realização de testes *in vitro*, revela-se como uma componente acessória crucial em acções de fármaco-vigilância regular.

Relativamente ao fármaco amodiaquina, verificou-se uma variação expressiva no grau de susceptibilidade de entre as amostras inspeccionadas, tendo-se obtido valores das médias geométricas dos valores de IC50s de 12,9 nM e 17,3 nM, para os isolados da RDSTP e do Ruanda, respectivamente. Estes valores são aproximados a outros obtidos recentemente em populações naturais de *P. falciparum* provenientes de África (Pradines *et al.*, 2006a; Pradines *et al.*, 2006b; Pradines *et al.*, 2006c).

Estes resultados confirmam observações anteriores de que a amodiaquina continua a ser, de um modo geral, eficaz em áreas onde a resistência à cloroquina é elevada (Brasseur *et al.*, 1999; Gorissen *et al.*, 2000; Staedke *et al.*, 2001). Verificou-se no entanto, que 9% da população parasitária estudada na RDSTP e 7% no Ruanda, possuía valores de IC50 acima de 60 nM, valor considerado como limiar de resistência *in vitro* (Basco *et al.*, 2002). No entanto estes valores podem encontrar-se abaixo do número real de parasitas resistentes à amodiaquina. De facto, de acordo com estudos recentes, o limiar de resistência deveria ser inferior ao estabelecido para se poderem estabelecer correlações correctas com a eficácia *in vivo*. Num estudo *in vivo* realizado no Ruanda, foi observado que aproximadamente 30% dos pacientes tratados com amodiaquina não responderam ao tratamento (Rwagacondo *et al.*, 2004), o que apresenta uma tendência discordante com os resultados obtidos nos testes *in vitro*. Noutro estudo realizado no Gabão também não foi encontrada nenhuma relação entre a susceptibilidade *in vivo* e *in vitro*, uma vez que a falha no tratamento foi de 40,5% enquanto que só 5,4% dos isolados provaram ser resistentes *in vitro* (Aubouy *et al.*, 2004).

A amodiaquina é um dos antimaláricos usados em combinação com os derivados da artemisinina e, neste sentido, seria útil proceder-se a uma reconsideração sobre o seu limiar de resistência *in vitro* aproximando-o à realidade *in vivo*, no intuito de melhor interpretação das observações constituídas.

IV.1.2 – Susceptibilidade *in vitro* relativamente aos derivados da artemisinina

Relativamente aos derivados da artemisinina e em tendência similar às respostas à amodiaquina observou-se também uma gama de susceptibilidades extremamente ampla. Globalmente, os valores de IC50s obtidos foram baixos revelando que a sensibilidade parasitária a esta classe de fármacos é globalmente elevada, sendo estes consequentemente mais eficazes comparativamente à amodiaquina.

Dihidroartemisinina

No Ruanda a susceptibilidade relativamente à dihidroartemisinina variou entre um mínimo de 0,3 nM e um máximo de 14,3 nM, tendo-se obtido uma média geométrica dos IC50s de 2,6 nM, valor mais elevado que os obtidos recentemente para este antimalárico noutro país Africano, a República do Congo, com 1,02 nM e 1,1 nM (Menard *et al.*, 2005; Pradines *et al.*, 2006a) e na Tailândia: 1,6 nM e 2,4 nM, (Brockman *et al.*, 2004; Nodel *et al.*, 2007). A única excepção verifica-se nos resultados de um estudo recente realizado no Laos, onde a média geométrica de eficácia a este fármaco se verificou ser significativamente superior, situando-se num valor de média geométrica de IC50s equivalente a 6,29 nM (Mayxay *et al.*, 2007).

Artesunato

Relativamente ao artesunato, o valor da média geométrica dos IC50s foi de 0,13 nM na RDSTP, enquanto que no Brasil, foi de 0,85 nM. Estes valores revelaram-se inferiores aos obtidos noutros países do continente Africano, como por exemplo, no Senegal onde se verificaram valores de 1,53 nM, 1,85 nM e 2,2 nM em estudos independentes (Pradines *et al.*, 2006b; Henry *et al.*, 2006), bem como no Gabão, com valores de média geométrica de IC50 de 0,73 nM e 2,42 nM (Ramharter *et al.*, 2006; Pradines *et al.*, 2006b). Em tendência similar ao caso da dihidroartemisinina, os valores obtidos em países do continente Asiático originários de vários estudos independentes, revelaram-se mais elevados que aqueles observados nos nossos estudos: Tailândia, com valores de

1,6 nM, 2,19 nM e 4,02 nM (Noedl *et al.*, 2003; Brockman *et al.*, 2004; Barends *et al.*, 2007), Cambodja com valores de 1,17 nM e 1,25 nM (Lim *et al.*, 2005; Jambou *et al.*, 2005), Bangladesh com valor de 1,93 nM (Noedl *et al.*, 2003) e o Laos com o valor mais elevado de todos os estudos, correspondendo a 5,02 nM (Mayxay *et al.*, 2007).

Artemeter

Relativamente ao composto artemeter, o valor da média geométrica dos IC50s obtidos na RDSTP foi de 0,59 nM, que em tendência similar ao artesunato foi inferior ao de outros estudos efectuados no Senegal, outro País Africano, onde se verificaram valores de 1,3 nM e 3,07 nM (Jambou *et al.*, 2005; Pradines *et al.*, 2006a). No caso do Brasil, a média geométrica dos IC50s correspondeu a 3,0 nM. De notar que no caso de quatro amostras se obtiveram valores de IC50 acima de 20 nM. No estudo realizado na Guiana francesa a média geométrica foi de 2 nM, com uma amostra apresentando um IC50 máximo de 117 nM (Jambou *et al.*, 2005), muito superior aos máximos obtidos no presente estudo.

Sumário

Em termos gerais, os resultados obtidos neste estudo para as populações naturais de *P. falciparum* em África e no Brasil parecem estar de acordo com o observado em outros estudos, com pequenas excepções. Colectivamente, os resultados são concordantes com a ideia que, embora as populações parasitárias naturais de *P. falciparum* variem significativamente na sua susceptibilidade relativamente a esta classe de fármacos, tanto intra- como inter-regionalmente, não existem relatos de respostas *in vitro* indicativas de verdadeira resistência. Uma excepção a esta tendência, reflectiu-se no trabalho de Jambou *et al.* (2005) que descreve vários isolados de *P. falciparum* provenientes da Guiana Francesa com valores de IC50 acima dos 40 nM relativamente ao artemeter, facto que parece evidenciar uma diminuição significativa na tolerância a este derivado da artemisinina (Jambou *et al.*, 2005). No mesmo relato existe a sugestão de que esta tolerância exacerbada se pode ter originado no uso inadequado de derivados de artemisinina provenientes do comércio paralelo e utilizados para auto-medicação, factor que tem vindo a exercer uma pressão farmacológica sub-ótima que favorece a selecção destes parasitas quimio-tolerantes (Jambou *et al.*, 2005).

Com excepção do exemplo anterior, os resultados deste estudo sugerem adicionalmente que a susceptibilidade aos derivados da artemisinina é mais comparável entre o continente Africano e o Americano do que com o Sudeste Asiático onde a quimio-tolerância parece maior. A título exemplificativo, um estudo recente no Laos reporta médias geométricas dos IC50 de 5,02 nM e 6,29 nM, para o artesunato e dihidroartemisinina, respectivamente (Mayxay *et al.*, 2007) enquanto que na Tailândia outro estudo relata um valor de 4,02 nM para o artesunato (Barends *et al.*, 2007), ambos significativamente superiores aos observados neste estudo. O facto de se observar de uma maneira geral uma tolerância maior a esta classe de compostos em parasitas do Sudeste Asiático tem muito provavelmente uma origem multifactorial. Uma das hipóteses explicativas deste fenómeno poderá ser, no entanto, o fenómeno de multi-resistência frequente nesta região, que poderá estar a contribuir para uma tolerância diminuída concomitante a esta classe de antimaláricos. De facto, tem-se observado com alguma frequência uma correlação entre os perfis de fármaco-tolerância entre compostos quimicamente distintos, indiciando a existência de fenótipos de multi-resistência. A secção subsequente aborda os resultados deste estudo relativamente a este assunto, onde este tipo de fenótipo foi corroborado.

IV.1.3 – Correlação das susceptibilidades *in vitro* entre os antimaláricos testados

Nas áreas estudadas verificou-se uma tendência de correlação directamente proporcional entre as respostas aos antimaláricos testados em todas as combinações possíveis ($P < 0,05$) ou seja, entre a amodiaquina e o artemeter, a amodiaquina e o artesunato, a amodiaquina e a dihidroartemisinina e entre o artemeter e o artesunato. De notar que na RDSTP foi observado que uma determinada amostra possuía os valores de IC50s mais elevados para os três fármacos.

A correlação mais significativa observada verificou-se entre os derivados da artemisinina, situação espectável tendo em conta que esta classe de compostos partilha muito provavelmente o mesmo mecanismo de acção (Robert *et al.*, 2001).

A correlação entre as susceptibilidades *in vitro* de populações naturais de *Plasmodium falciparum* aos derivados da artemisinina e à amodiaquina já tinha sido verificada noutros estudos (Pradines *et al.*, 1998a; Menard *et al.*, 2005). Além deste caso, tem sido

frequentemente descrita a ocorrência de perfis de resistência cruzada entre outros fármacos, tais como a mefloquina, o quinino, a halofantrina e a cloroquina (Basco & Le Bras, 1993; Bustos *et al.*, 1994; Le Bras, 1998; Pradines *et al.*, 1998a; Pradines *et al.*, 1998b; Huong *et al.*, 2001; Noedl *et al.*, 2001; Wongsrichanalai *et al.*, 2001; Basco & Ringwald, 2002; Lim *et al.*, 2005; Menard *et al.*, 2005; Jambou *et al.*, 2005; Pradines *et al.*, 2006a; Tinto *et al.*, 2006; Noedl *et al.*, 2007).

O facto de existir uma correlação positiva entre as respostas aos derivados da artemisinina e antimaláricos de diferentes classes com estruturas químicas diferentes e mecanismos de acção distintos é preocupante e alerta para um problema que se prende com a possível existência dum fenótipo de tolerância cruzada entre antimaláricos de diferentes classes. Este fenómeno não se encontra completamente clarificado podendo ser no entanto atribuído a: i) mecanismos de resistência comuns e universais ainda não conhecidos; ii) diminuição do *uptake* ou aumento da eliminação intracelular dos fármacos; iii) capacidade adquirida de activação de mecanismos gerais de detoxificação quando sujeito à presença de substâncias nocivas, como antimaláricos; iv) combinação ou sinergismo entre estes mecanismos.

No entanto esta teoria não está comprovada visto que outros estudos não corroboram as observações anteriores, não existindo uma uniformidade nos resultados obtidos na correlação entre as respostas dos derivados da artemisinina e antimaláricos de classes diferentes (Alin, 1997; Le Bras, 1998; Noedl *et al.*, 2001; Randrianariveolosia *et al.*, 2001; Chaijaroenkul *et al.*, 2005; Pradines *et al.*, 2006a).

IV.1.4 – Análise do perfil genotípico das amostras colhidas nas diferentes áreas endémicas

IV.1.4.1 – Genes codificantes de transportadores membranares: *pfmdr1* e *pfcr1*

O gene *pfmdr1* tem sido relacionado com uma capacidade de modulação das respostas à artemisinina e seus derivados, quer por amplificação génica, quer por mutações pontuais na sua sequência (Duraisingh & Cowman, 2005). Neste último caso, a forma selvagem do gene tem sido associadas à diminuição da susceptibilidade a esta classe de

antimaláricos (Duraisingh *et al.*, 2000a; Duraisingh *et al.*, 2000b; Pickard *et al.*, 2003; Sidhu *et al.*, 2005).

Relativamente à amodiaquina, alguns estudos têm estabelecido associações entre a falência terapêutica *in vivo* e as mutações N86Y e D1246Y (Dokomajilar *et al.*, 2006; Holmgren *et al.*, 2006b; Holmgren *et al.*, 2007; Nsohya *et al.*, 2007).

Neste estudo investigou-se a prevalência de mutações referidas como potenciais moduladoras da susceptibilidade a antimaláricos, *pfmdr1* N86Y, *pfmdr1* F184Y, *pfmdr1* N1042D e *pfmdr1* D1246Y, bem como o número de cópias deste gene num sub-grupo de amostras. Adicionalmente, investigou-se a possibilidade de os genótipos observados se correlacionarem com diferenças encontradas entre as susceptibilidades aos derivados da artemisinina e amodiaquina nas populações naturais de *P. falciparum* estudadas.

A análise do *pfmdr1* da população parasitária proveniente da RDSTP revelou uma predominância dos alelos 86Y, 184F, 1042N e 1246D. Estas prevalências alélicas corroboram os resultados obtidos noutro estudo anteriormente realizado neste País (Lopes *et al.*, 2002a). Este perfil genotípico parece ser característico da África Ocidental, sendo coincidente com resultados obtidos no Gabão (Grobusch *et al.*, 1998; Mawili-Mboumba *et al.*, 2002; Mayengue *et al.*, 2007) a região continental mais próxima da RDSTP. Tendo em conta que existe um elevado fluxo populacional entre os dois Países, é plausível que a população parasitária encontrada na RDSTP tenha sido originalmente introduzida a partir do Gabão (Lopes *et al.*, 2002a).

No Ruanda verificou-se uma predominância dos alelos 86Y e 1042N tal como na RDSTP, confirmando-se a presença dos alelos típicos de África. Para a posição 1246 a prevalência para o alelo 1246D foi de 35% e para o alelo 1246Y de 34%, de notar que o alelo mutante 1246Y característico da América do Sul circula nesta população com uma prevalência aproximadamente igual ao alelo selvagem 1246D. A predominância do alelo mutante 184Y ao contrário do verificado na RDSTP, não permite tirar uma conclusão, uma vez que a amostragem foi muito reduzida, tendo sido apenas analisadas oito amostras.

No Brasil verificou-se uma predominância extremamente elevada dos alelos 86N, 1042D e 1246Y, haplótipo típico desta região, com prevalências de 100%, 88% e 100% respectivamente. Estes resultados confirmam os resultados obtidos noutros estudos realizados no continente Americano onde se verificou que estes alelos são predominantes (Póvoa *et al.*, 1998; Zalis *et al.*, 1998; Plummer *et al.*, 2004; Viana *et al.*, 2006).

Em termos de distribuição dos polimorfismos, os resultados obtidos corroboram outras análises realizadas em populações naturais de *P. falciparum* de diferentes áreas geográficas, onde o genótipo tipo K1, caracterizado pela mutação 86Y, é característico de isolados resistentes à cloroquina provenientes de várias áreas geográficas da Ásia e África (Foote *et al.*, 1990, Adagu *et al.*, 1996). Enquanto que o tipo 7G8, tem sido associado a estirpes de *P. falciparum* resistentes à cloroquina provenientes da América do Sul, caracterizados pela presença do triplo mutante nos resíduos 1034, 1042 e 1246 do gene *pfmdr1* (Foote *et al.*, 1990). No entanto, recentemente foi relatado a presença da mutação 86Y em parasitas da América do Sul (Montoya *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos para o gene *pfmdr1* são difíceis de interpretar em relação às susceptibilidades a estes antimaláricos devido ao “clustering” geográfico acima referido, natural de determinados genótipos e provável selecção de alguns genótipos por pressão de outros antimaláricos. Não foi encontrada correlação entre genótipos e diferenças nas respostas aos derivados da artemisinina e amodiaquina.

Relativamente à estimativa do número de cópias do gene *pfmdr1* e a susceptibilidade à amodiaquina, os resultados obtidos corroboram outros recentemente publicados de que a resistência à amodiaquina é independente da amplificação do gene (Holmgren *et al.*, 2006a), dado que amostras com valores de IC50 diversos apresentaram uma cópia única. No caso dos derivados da artemisinina, estudos anteriores têm associado o aumento do número de cópias do gene *pfmdr1* à diminuição da susceptibilidade *in vitro* (Price *et al.*, 1999; Pickard *et al.*, 2003; Price *et al.*, 2004). No entanto, em tendência similar à amodiaquina, verificou-se neste estudo que todas as amostras de *P. falciparum* inspeccionadas possuíam uma cópia única deste gene independentemente da sua susceptibilidade a estes compostos.

De facto, a amplificação do gene *pfmdr1* tem sido fortemente associada à resistência à mefloquina maioritariamente no Sudeste Asiático, nomeadamente na Tailândia (Wilson *et al.*, 1993; Price *et al.*, 1999; Pickard *et al.*, 2003; Price *et al.*, 2004; Nelson *et al.*, 2005). O facto de não ter sido detectada amplificação do gene *pfmdr1* nos isolados do Brasil, apesar do uso intensivo da mefloquina e quinino nesta região no passado e da existência de relatos de resistência a estes antimaláricos (Zalis *et al.*, 1998; Calvosa *et al.*, 2001) pode ser indicativo dum mecanismo de resistência diferente nesta população. Alternativamente, este gene pode estar sobre-expresso ao nível do mRNA ou a nível proteico em alguns parasitas através de outros mecanismos moleculares que não a amplificação génica. Por último, existe a possibilidade destas observações poderem ser o reflexo do reduzido tamanho da amostra (somente foram testados oito isolados).

O gene *pfcr1* foi implicado na modulação da susceptibilidade às artemisininas num estudo de transfecção genética em que foi verificado que determinadas mutações no gene aumentam a susceptibilidade a esta classe de antimaláricos (Sidhu *et al.*, 2002). No entanto, este fenómeno não foi confirmado em populações naturais de *P. falciparum* em estudos posteriores, onde não se verificou este tipo de associação (Jambou *et al.*, 2005). No caso da amodiaquina, alguns estudos associaram a resistência *in vivo* com a mutação *pfcr1* K76T (Ochong *et al.*, 2003; Dokomajilar *et al.*, 2006; Holmgren *et al.*, 2006b; Ursing *et al.*, 2007).

No âmbito deste estudo foram analisadas as mutações *pfcr1* K76T e *pfcr1* N75E nas populações naturais de *P. falciparum* estudadas, na tentativa de estabelecer a sua prevalência e/ou de encontrar uma possível associação entre o genótipo *pfcr1* e a susceptibilidade aos derivados da artemisinina e amodiaquina.

Na RDSTP, os dois polimorfismos analisados revelaram que as mutações associadas com a resistência à cloroquina, N75E e K76T, se encontram fixas na população parasitária local. Este resultado corrobora o de um estudo realizado em 2002 onde se verificou que 100% dos isolados analisados possuía o alelo 76T (Lopes *et al.*, 2002a). A fixação destes polimorfismos foi muito provavelmente devida ao uso indiscriminado de cloroquina, que causou a selecção de parasitas resistentes a este fármaco, parasitas estes prevalentes nesta região desde 1990 (Martet *et al.*, 1991).

No Ruanda, por outro lado apesar do nível de resistência à cloroquina ser elevado, verificou-se que ainda circulam na população parasitária local, parasitas portadores dos alelos selvagens, tendo-se verificado no entanto que os alelos 76T e 75E são extremamente predominantes: 93% e 77%, respectivamente. Curiosamente, o número reduzido de casos em que foi detectado o alelo 76K, verificou-se em indivíduos portadores de infecções mistas. Colectivamente os resultados obtidos sugerem que também no caso do Ruanda os alelos mutantes se encontram muito próximos de atingir a fixação, provavelmente por forte selecção prévia por intermédio de pressão intensa de cloroquina.

No Brasil verificou-se que todos os isolados analisados eram portadores dos alelos *pfCRT* 76T e *pfCRT* 75N, coincidindo com resultados obtidos anteriormente nesta região (Vieira *et al.*, 2001; Vieira *et al.*, 2004; Viana *et al.*, 2006), evidenciando mais uma vez a forte selecção do alelo mutante 76T implicado na resistência à cloroquina.

Por último, não foi verificada qualquer correlação entre os polimorfismos e as diferenças nas susceptibilidades dos antimaláricos testados. De facto, os resultados obtidos relativamente aos genes *pfCRT* e *pfMDR1* são difíceis de interpretar em relação às respostas dos derivados da artemisinina e amodiaquina, maioritariamente devido à pressão selectiva anteriormente exercida por outros antimaláricos, tais como a cloroquina, que promoveram a selecção de determinados genótipos.

IV.1.4.2 – Gene *pfATPase6*

O gene *pfATPase6* codifica uma ATPaseCa²⁺ tipo SERCA do *Plasmodium* que foi recentemente proposta como principal alvo terapêutico dos derivados da artemisinina (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003), bem como um potencial determinante de resistência (Uhlemann *et al.*, 2005; Jambou *et al.*, 2005).

A pesquisa de polimorfismos *de novo* no gene *pfATPase6* por sequenciação foi realizada num conjunto de amostras com diferentes susceptibilidades às artemisininas, provenientes das três regiões em estudo. Da análise das sequências foram descritos oito novos polimorfismos, de entre os quais, dois sinónimos e seis não-sinónimos. Num estudo prévio realizado em parasitas provenientes do continente Africano e Americano,

mais especificamente do Senegal e da Guiana Francesa, foram encontrados 23 polimorfismos sinónimos e não-sinónimos, tendo sido identificados 8 tipos de proteína PfATPase6 (Jambou *et al.*, 2005). Nesse estudo, que incluiu também parasitas provenientes do Camboja, todas as mutações encontradas foram sinónimas, indicando uma maior conservação do gene e consequentemente da proteína, por parte dos parasitas Asiáticos (Jambou *et al.*, 2005). Em concordância, outro estudo realizado com amostras da Tailândia, somente encontrou um polimorfismo não-sinónimo entre as sequências (Price *et al.*, 2004). No entanto, existe pouca informação relativa aos possíveis génotipos existentes do gene *pfATPase6* nas diferentes regiões, o que limita a interpretação de resultados obtidos.

Foi verificado que os polimorfismos encontrados no nosso estudo apresentam uma distribuição regional. Este agrupamento geográfico observado para os alelos do gene *pfATPase6* nas populações do continente Africano e Americano, já havia sido anteriormente verificado (Jambou *et al.*, 2005). Este acontecimento poderá ser devido a eventos ancestrais selectivos distintos nas diferentes áreas, assim como acontece com o agrupamento geográfico observado para o gene *pfCRT* resistente à cloroquina (Wootton *et al.*, 2002) e para os haplótipos resistentes aos anti-folatos *pfDHFR* e *pfDHPS* (Cortese *et al.*, 2003).

Relativamente à diversidade, as populações Africanas analisadas apresentam um maior número de polimorfismos, tendo sido detectados um total de 5 polimorfismos e identificadas 4 tipos de proteínas. No Brasil foram detectados um total de 4 polimorfismos e identificados 3 tipos de proteínas. Na população parasitária do Brasil verificou-se a existência de dois haplótipos principais, no entanto, não foi encontrada correlação entre os diferentes haplótipos e as respostas aos derivados da artemisinina.

A mutação S769N havia sido previamente correlacionada com o aumento da tolerância *in vitro* ao artemeter em parasitas da Guiana Francesa, onde foi detectada em 6 de 7 isolados com reduzida susceptibilidade *in vitro* ao artemeter, essas amostras apresentavam uma média de valores de IC50 20 vezes superior ao valor máximo apresentado pelos outros isolados estudados (Jambou *et al.*, 2005). No nosso estudo foi verificada a inexistência dessa mutação nas populações estudadas por um método de PIRA-PCR desenvolvido, num total de 233 amostras inspeccionadas, incluindo

amostras do Brasil, RDSTP e Ruanda. Observações similares foram reportadas da Tanzânia, em que foi descrita a ausência da mesma mutação (Mugittu *et al.*, 2006). Se a proteína PfATPase6 é o alvo e o maior determinante da resistência aos derivados da artemisinina, a ausência da mutação S769N na população aqui analisada, pode estar relacionada com diferenças no uso dos antimaláricos entre as populações, ou seja, os parasitas estudados sofreram menor exposição aos derivados da artemisinina. De facto o IC50 do artemeter mais elevado obtido neste estudo foi significativamente menor que os encontrados no Senegal e na Guiana Francesa, 45 nM e 117 nM, respectivamente, o que reforça a hipótese. À data da realização destes estudos os derivados da artemisinina ainda não eram oficialmente dispensados na RDSTP nem no Brasil e no Ruanda a política terapêutica de ACTs tinha sido implementado dois anos antes como 2ª linha. Adicionalmente, a provável quantidade circulante no mercado paralelo foi insuficiente para exercer uma pressão selectiva significativa nas populações analisadas.

A distribuição das duas mutações não-sinónimas aqui descritas pela primeira vez, R37K e G639D, demonstrou ser variável entre os isolados analisados. Em termos de previsão de potenciais alterações funcionais, o modelo bioinformático empregue antecipa que cada uma destas mutações codifique alterações em resíduos localizados em domínios proteicos diferentes. A mutação R37K encontra-se na porção terminal N, domínio este que tem como função o transporte transmembranar de catiões, enquanto que a mutação G639D se localiza na porção citoplasmática da proteína, inserindo-se no domínio funcional hidrolase, com actividade catalítica, como anteriormente referido. No entanto, a significância biológica destas mutações é difícil de prever na ausência de análises bioquímicas funcionais, que se situaram fora do âmbito e tempo previsto para este estudo.

IV.1.4.3 – Gene *pfubp-1*

O gene *pfubp-1* codifica uma protease ubiquitina-específica em *P. falciparum*. Recentemente, esta proteína foi indiciada como potencial modulador da susceptibilidade ao artesunato no modelo de malária de roedores *Plasmodium chabaudi* (Hunt *et al.*, 2007).

Em *P. falciparum*, o presente estudo permitiu revelar que este gene apresenta um polimorfismo no seu tamanho, podendo apresentar *indels* (inserções/deleções) de até 54 nucleótidos numa região da proteína prevista como sendo de baixa complexidade biológica. Verificou-se ainda que a população parasitária proveniente do Ruanda apresenta maior diversidade e combinações diversas entre o polimorfismo de tamanho neste gene e o genótipo do gene *PfATPase6*, enquanto que nas amostras do Brasil parece existir uma associação mais evidente entre o tamanho do polimorfismo e o genótipo do gene *pfATPase6*, dando origem a haplótipos característicos onde se inserem várias amostras diferentes.

Estas observações são provavelmente o reflexo da menor intensidade de transmissão de malária já descrita para a região da América do Sul comparativamente a África (W.H.O., 2006c), que tem como consequência uma taxa de recombinação genética mais reduzida no Brasil, comparativamente com África.

IV.1.4.4 – Gene *pfctp*

O gene *pfctp* havia sido anteriormente indicado como um potencial responsável na resistência à artemisinina e seus derivados, num trabalho realizado com estirpes *P. yoelli* resistentes à artemisinina, que apresentaram uma quantidade significativamente maior de proteína TCTP relativamente às progenitoras sensíveis (Walker *et al.*, 2000).

Neste estudo foi obtida a uma porção significativa da sequência codificante do gene *pfctp* para alguns isolados de *P. falciparum* seleccionados provenientes da RDSTP e do Ruanda, assim como para o clone de referência de *P. falciparum* 3D7. Após análise das sequências, não foram encontrados polimorfismos. Estes resultados coincidem com os obtidos por Jambou *et al.* que verificaram que parasitas provenientes do Senegal, Cambodja e Papua Nova Guiné e o clone de referência de *P. falciparum* 3D7, possuíam a mesma sequência de DNA do gene *pfctp*, sugerindo a grande conservação deste gene (Jambou *et al.*, 2005).

Colectivamente estes resultados sugerem que o gene *pfctp* não é provavelmente um alvo terapêutico ou um forte candidato à resistência a antimaláricos.

IV.1.4.5 – Genes envolvidos na defesa do *stress* oxidativo

Alguns dos genes que codificam proteínas envolvidas nos mecanismos de defesa do *stress* oxidativo têm sido implicados na resistência aos derivados da artemisinina em células tumorais (Efferth *et al.*, 2003a; Efferth *et al.*, 2003b; Efferth & Volm, 2005) e no parasita *Schistosoma japonicum* (Xiao *et al.*, 2002; Zhai *et al.*, 2002).

Tendo em conta a estrutura química, e assumindo que o seu mecanismo de acção no *Plasmodium* é por produção de radicais livres que causam a redução de antioxidantes e da glutatona (GSH) no eritrócito infectado (Ittarat *et al.*, 2003) é plausível que a concentração parasitária de GSH e de outros antioxidantes assim como a alteração da função das enzimas envolvidas no mecanismo de defesa do *stress* oxidativo afecte a sensibilidade ao fármaco. Assim sendo, o aumento dos níveis parasitários de GSH e outros antioxidantes ou a alteração das funções das enzimas envolvidas, poderia levar à diminuição da susceptibilidade à artemisinina. De acordo com estas suposições, genes codificantes de proteínas envolvidas nos mecanismos de defesa ao *stress* oxidativo como: *pfsod1*, *pfgst*, *pfgr*, *pfgpx*, *pftrx1*, *pftrx2* e *pfprx*, poderiam estar também envolvidos no mecanismo de resistência à artemisinina, devido a mutações pontuais e/ou alterações na sua expressão genética.

No gene *pfsod1* foi encontrado um polimorfismo, D84G, exclusivo de isolados da RDSTP mas não foi encontrada correlação entre este polimorfismo e as diferentes susceptibilidades aos antimaláricos testados. Nos genes *pfgst*, *pfygs*, *pfgr*, *pfgpx*, *pftrx1*, *pftrx2* e *pfprx*, não foi verificada alteração no número de cópias, nem nas suas sequências em quaisquer das amostras estudadas indicando que estes genes não participam da modulação da eficácia aos derivados da artemisinina.

O gene *pfygs* codifica uma enzima envolvida no mecanismo de defesa do *stress* oxidativo, a γ -GCS (γ -glutamil-cisteinil sintetase). Neste estudo observou-se um elevado grau de polimorfismos de tamanho numa região rica em glutamina, a nível intra-populacional nas populações naturais Africanas, nas quais foram encontrados 9 alelos com diferente tamanho nos isolados da RDSTP e 8 alelos nos isolados do Ruanda. No Brasil não foi verificada essa variação, tendo-se observado a existência de apenas dois polimorfismos de tamanho, com predominância de 91% de um deles. A

maior diversidade existente em África talvez se deva à maior taxa de recombinação genética observada neste continente relativamente ao Brasil.

Este polimorfismo de tamanho já havia sido descrito por Lüersen *et al.* entre estirpes diferentes de *P. falciparum* adaptadas a laboratório: FCBR (Colômbia), 3D7 (Origem desconhecida), FCH5 (África), HB3 (Honduras), Dd2 (Indochina), 7G8 (Brasil) e K1 (Tailândia), não tendo no entanto sido encontrada correlação entre o tipo de γ -GCS e a origem da estirpe. O tipo de polimorfismo era o mesmo nas estirpes K1 e 7G8, assim como nas estirpes FCBR e na FCH5, enquanto que estirpes da mesma área geográfica como a Dd2 e K1 possuíam tipos de γ -GCS diferentes (Lüersen *et al.*, 1999).

O gene *pfygc*s codifica uma proteína citosólica, envolvida no mecanismo de defesa do *stress* oxidativo. Estes polimorfismos de tamanho devem-se a inserções de sequências repetitivas numa região rica em Glutamina, o que não é vulgar em proteínas citoplasmáticas. As sequências repetitivas de regiões ricas em determinados aminoácidos (N, A, D, V, P, E, G, Q e S) são comuns no *Plasmodium* em proteínas de superfície como as MSP2 (Eisen *et al.*, 1998; Basco *et al.*, 2004), MSP1 (Sakihama *et al.*, 2004; Takala *et al.*, 2006), CSP (Galinski *et al.*, 1987; Escalante *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002) e RESA (Cowman *et al.*, 1984). A função destas repetições em proteínas citoplasmáticas não é conhecida mas a sua conservação possivelmente confere vantagens selectivas para os parasitas, uma vez que o número de sequências repetitivas afecta os parâmetros físicos da γ -GCS (Lüersen *et al.*, 1999).

Foi também avaliada a correlação entre o tamanho do polimorfismo do gene *pfygc*s e a susceptibilidade aos antimaláricos em estudo. Relativamente aos derivados da artemisinina verificou-se não existir correlação entre o polimorfismo e a susceptibilidade. Quanto à amodiaquina, foi verificada uma correlação estatisticamente significativa ($P=0,02$) entre o aumento do tamanho do polimorfismo do gene *pfygc*s e a diminuição da susceptibilidade a este fármaco nos isolados provenientes do Ruanda. No entanto, essa correlação não foi verificada nas amostras da RDSTP, nem num estudo recentemente realizado por Nogueira *et al.* (2007) em isolados da RDSTP, Angola e Tailândia (dados não publicados). Estes resultados contraditórios não permitem estabelecer uma associação entre o tamanho do polimorfismo do gene *pfygc*s e a susceptibilidade à amodiaquina.

IV.2 – SELECÇÃO *IN VITRO* DE PARASITAS DE *P. falciparum* RESISTENTES À ARTEMISININA E SUA ANÁLISE GENOTÍPICA

O objectivo deste estudo foi seleccionar clones de *P. falciparum* resistentes à artemisinina a partir de clones sensíveis ao fármaco. Para tal, o clone *P. falciparum* Dd2 multi-resistente, mas sensível à artemisinina, foi sujeito a crescimento *in vitro* na presença de concentrações crescentes de artemisinina. Uma cultura *in vitro* não tratada do mesmo progenitor *P. falciparum* Dd2 foi mantida em paralelo durante o mesmo tempo, de modo a descartar a possibilidade de que potenciais alterações genéticas poderiam ter sido seleccionadas pelas condições *in vitro*.

Os parasitas sob selecção por pressão de artemisinina inicialmente não toleraram aumentos abruptos de fármaco, mas após 6 ciclos de tratamento a sua tolerância à artemisinina aumentou significativamente e após mais 4 ciclos, foram seleccionados parasitas que demonstraram ser 100 vezes mais tolerantes que os seus progenitores sensíveis. Essa estirpe foi denominada de *P. falciparum* Dd2-ARTmut. No entanto, verificou-se que a resistência não era estável tendo-se perdido na ausência de pressão de fármaco. Por outras palavras, foi seleccionada resistência transitória à artemisinina em *P. falciparum*.

O fenótipo de resistência transitória à artemisinina verificado neste estudo tem correspondência com resultados obtidos recentemente noutra trabalho, em que foram geradas por selecção duas estirpes de *P. falciparum* com susceptibilidade diminuída à artemisinina, ART-R^{NF54} e ART-R^{7G8}, a partir de progenitores sensíveis NF54 e 7G8, respectivamente, onde também se verificou que essa resistência foi revertida após remoção de fármaco (Hunt *et al.*, 2007).

A dificuldade em seleccionar resistência *in vitro* estável à artemisinina em *P. falciparum*, pode ter várias origens: i) possivelmente, o aparecimento do fenótipo de resistência estável implica aquisição e acumulação de mutações desfavoráveis ao parasita o que os torna ecologicamente desfavorecidos relativamente aos parasitas susceptíveis à artemisinina, acabando estes por crescer em detrimento dos resistentes; ii) as mutações adquiridas não lhe permitem a viabilidade *in vitro*, não sendo assim possível seleccionar mutantes com a característica de resistência estável à artemisinina;

iii) a população parasitária possui a capacidade de activar mecanismos de adaptação fisiológica que lhe permitem adquirir um fenótipo de resistência transitória vantajoso nas condições em que se encontra.

Em *P. falciparum* os mecanismos de adaptação fisiológica não estão bem explorados, ao contrário do que acontece noutros organismos, como as bactérias, em que o fenómeno de “adaptação fisiológica” é bem conhecido. Bactérias inicialmente susceptíveis a antibióticos tornam-se resistentes por pressão com esses compostos, sendo esta resistência revertida quando se transferem para um meio sem antibiótico. Essa resistência reversível nas bactérias é devido a presença de bombas de efluxo, que lhes permite uma adaptação fisiológica ao meio (Viveiros *et al.*, 2005).

Neste estudo, o aumento da tolerância à artemisinina observado durante todo o processo de selecção talvez seja um fenómeno de adaptação fisiológica do parasita à presença do fármaco no seu meio de crescimento e não um fenómeno de resistência. Essa adaptação fisiológica permite ao parasita crescer nas condições adversas, ou seja na presença de artemisinina, enquanto elas estiverem presentes no seu ambiente. Quando a pressão de fármaco desaparece, o parasita readapta-se fisiologicamente ao novo meio de crescimento não necessitando de accionar os mecanismos que lhe facultavam vantagens de sobrevivência anteriormente.

A comparação dos potenciais genes moduladores da susceptibilidade às artemisininas entre a estirpe Dd2-ARTmut seleccionada e o seu progenitor Dd2, teve como finalidade identificar o potencial responsável pela alteração transitória na susceptibilidade. O estudo comparativo entre as sequências dos genes *pfcr1*, *pfATPase6* e *pfubp-1*, assim como dos polimorfismos analisados nos genes *pfmdr1* e *pfygc5*, revelou não existirem diferenças entre parasitas resistentes e sensíveis. Estes resultados concordam com os de outro trabalho, em que não se observaram diferenças nas sequências dos genes *pfcr1*, *pfubp-1* e *pfmdr1* entre as estirpes com resistência transitória à artemisinina ART-R^{NF54} e ART-R^{7G8}, e os seus progenitores sensíveis, NF54 e 7G8, respectivamente (Hunt *et al.*, 2007). Colectivamente, os resultados dos dois estudos parecem indicar que a alteração do fenótipo de susceptibilidade à artemisinina não depende de mutações pontuais nestes genes. No entanto, a avaliação do número cópias nos genes *pfATPase6* e *pfmdr1* apurou que na estirpe *P. falciparum* Dd2-ARTmut, o gene *pfmdr1* havia sofrido

amplificação tendo adquirido duas cópias extra durante o processo de selecção com artemisinina. A quantificação dos transcritos na Dd2-ARTmut relativamente ao seu progenitor sensível revelou também um aumento. Curiosamente, após análise similar do parasita Dd2-ARTmutREV (sensível após reversão) verificou-se que a amplificação do gene *pfmdr1* havia sido mantida.

O gene *pfmdr1* codifica uma proteína transportadora, a Pgh1 (*P-glicoprotein homologue 1*), localizada na membrana do vacúolo digestivo do parasita (Cowman *et al.*, 1991). Este gene tem sido implicado no fenótipo de resistência a vários antimaláricos, modulando a susceptibilidade aos diversos antimaláricos quer por amplificação génica quer por mutações na sequência do gene (Duraisingh & Cowman, 2005). De que forma a proteína Pgh-1 afecta o fenótipo de susceptibilidade a fármacos não está esclarecido. É sugerido que a Pgh-1 pode transportar os fármacos directamente, tanto para fora como para dentro do vacúolo digestivo, ou alternativamente, pode influenciar indirectamente a acumulação dos substratos e dos fármacos através da regulação do gradiente de PH ou potencial da membrana (Duraisingh & Cowman, 2005).

Relativamente às artemisininas vários estudos realizados em populações naturais *in vitro* e *in vivo* assim como experiências laboratoriais indicam que a amplificação e/ou aumento da expressão do gene *pfmdr1* desempenha um determinado papel na alteração da susceptibilidade a esta classe de antimaláricos.

Em populações naturais foi observado uma associação entre a diminuição da susceptibilidade *in vitro* à artemisinina e seus derivados e o aumento do número de cópias do gene *pfmdr1* (Price *et al.*, 1999; Pickard *et al.*, 2003; Price *et al.*, 2004).

Recentemente, um estudo *in vivo* realizado para avaliar a associação entre as falhas terapêuticas com artesunato-mefloquina e alterações genéticas no gene *pfmdr1*, revelou pacientes que possuíam parasitas com três ou mais cópias do gene *pfmdr1* antes do tratamento se encontrou fortemente associado com recrudescências. Este tratamento seleccionou números de cópias de *pfmdr1* aumentadas, visto que os isolados das recrudescências possuíam mais cópias do gene ($P = 0,04$) (Alker *et al.*, 2007).

Em experiências laboratoriais, estudos realizados com estirpes de *P. falciparum* resistentes à mefloquina seleccionadas a partir de progenitores sensíveis verificaram aumentos dos níveis de expressão do gene *pfmdr1* em relação à estirpe sensível acompanhado de uma diminuição na susceptibilidade à artemisinina (Kim *et al.*, 2001; Begum *et al.*, 2002). Posteriormente, num estudo realizado utilizando estirpes de *P. yoelii* com diferentes perfis de resistência a antimaláricos foi verificado que uma estirpe resistente à artemisinina, a *P. yoelii* ART, apresentava um aumento de 2 para 3 no número de cópias do gene *pymdr1* relativamente à estirpe progenitora sensível (Ferrer-Rodríguez *et al.*, 2004). Recentemente um estudo realizado revelou que a disrupção genética (*knock-out*) do nº de cópias de 2 para 1 do gene *pfmdr1* na estirpe resistente à mefloquina FCB resultou num aumento da susceptibilidade à artemisinina *in vitro*, reforçando a ideia que o número de cópias deste gene possui capacidade de modular este fenótipo (Sidhu *et al.*, 2006).

Todos estes estudos corroboravam as observações iniciais deste estudo de que a amplificação do gene *pfmdr1* que ocorreu durante o processo de selecção com artemisinina, seria o responsável pela diminuição da susceptibilidade da estirpe Dd2-ARTmut relativamente ao seu progenitor sensível. No entanto após a reversão da resistência verificou-se que a amplificação do gene *pfmdr1* havia sido mantida na estirpe Dd2-ARTmutREV (sensível após reversão), logo esta amplificação não deverá ser a causa da resistência, pelo menos no nosso modelo de estudo.

Estas observações sugerem que a relação causa/efeito entre a diminuição da susceptibilidade à artemisinina e a amplificação do gene *pfmdr1* deve ser reconsiderada uma vez que essa característica permanece após reversão.

Talvez a amplificação do *pfmdr1* possa estar relacionada com o mecanismo de adaptação fisiológico da Dd2-ARTmut à presença dum “agente” tóxico, tendo a estirpe sensível Dd2-ARTmutREV mantido essa alteração genética que não lhe confere resistência à artemisinina, mas se novamente sujeita à pressão com artemisinina reactive esse mecanismo de adaptação que lhe permita sobreviver nessas condições.

IV.3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho englobou um estudo multicêntrico de avaliação da susceptibilidade *in vitro* aos derivados da artemisinina envolvendo populações naturais de *P. falciparum* de África e América do Sul, assim como a análise de determinados marcadores genéticos inseridos no contexto da resistência a antimaláricos. Os resultados destes ensaios permitiram que se avaliasse a estrutura populacional do parasita *P. falciparum* em termos de fenótipo bem como do perfil de genes apontados como moduladores das respostas a estes fármacos antes da aplicação em larga escala dos mesmos. Estes dados constituem assim uma ferramenta singular de fármaco-vigilância dado poderem ser utilizados em futuros ensaios como termo de comparação que permite avaliar a evolução das populações parasitárias em termos fenotípicos e genotípicos. Neste âmbito, uma monitorização contínua da susceptibilidade das populações parasitárias naturais a estes antimaláricos e dos moduladores genéticos putativos da sua resposta, poderá ajudar a proteger a eficácia a longo prazo das combinações terapêuticas com derivados da artemisinina.

A selecção *in vitro* de resistência transitória à artemisinina nos parasitas de *P. falciparum* reforçou a concepção pré-existente da dificuldade de selecção de resistência estável a esta classe de antimaláricos. No entanto foram obtidos resultados importantes e inovadores que questionam a relação causal previamente estabelecida entre a amplificação do gene *pfmdr1* e a diminuição da susceptibilidade às artemisininas, assim como do papel deste gene na resistência a esta classe de antimaláricos.

Em conclusão, consideramos que este trabalho contribuiu com informação relevante relativamente a características fenotípicas e genotípicas de populações parasitárias naturais relativas aos derivados da artemisinina nas áreas endémicas estudadas e proporcionou dados importantes no contexto do mecanismo de acção e de resposta a esta classe de antimaláricos.

V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adagu, I.S., Dias, F., Pinheiro, L., Rombo, L., do Rosário, V., Warhurst, D.C.. 1996. Guinea Bissau: association of chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* with the Tyr86 allele of the multiple drug-resistance gene *Pfmdr1*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Jan-Feb; **90** (1): 90-91.
- Adagu, I.S., Warhurst, D.C.. 2001. *Plasmodium falciparum*: linkage disequilibrium between loci in chromosomes 7 and 5 and chloroquine selective pressure in Northern Nigeria. *Parasitology*, Sep; **123** (Pt 3): 219-224.
- 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), *tctp*, *mdr1*, and *cg10*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Feb; **50** (2): 480-489.
- Alecrim, M.G., Lacerda, M.V., Mourão, M.P., Alecrim, W.D., Padilha, A., Cardoso, B.S., Boulos, M.. 2006. Successful treatment of *Plasmodium falciparum* malaria with a six-dose regimen of Artemether-Lumefantrine versus Quinine-Doxycycline in the western Amazon region of Brasil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Jan; **74** (1): 20-25.
- Alin, M.H.. 1997. In vitro susceptibility of Tanzanian wild isolates of *Plasmodium falciparum* to artemisinin, chloroquine, sulfadoxine/pyrimethamine and mefloquine. *Parasitology*, Jun; **114** (Pt 6): 503-506.
- Alker, A.P., Lim, P., Sem, R., Shah, N.K., Yi, P., Bouth, D.M., Tsuyuoka, R., Maguire, J.D., Fandeur, T., Arie, F., Wongsrichanalai, C., Meshnick, S.R.. 2007. *Pfmdr1* and *in vivo* resistance to artesunate-mefloquine in *falciparum* malaria on the Cambodian-Thai border. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Apr; **76** (4): 641-647.
- Atamna, H., Ginsburg, H.. 1997. The malaria parasite supplies glutathione to its host cell investigation of glutathione transport and metabolism in human erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *European Journal of Biochemistry*, Dec; **250** (3): 670-679.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aubouy, A., Mayombo, J., Keundjian, A., Bakary, M., Le Bras, J., Deloron, P.. 2004. Short report: lack of prediction of amodiaquine efficacy in treating *Plasmodium falciparum* malaria by in vitro tests. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Sep; **71** (3): 294-296.
- Barends, M., Jaidee, A., Khaohirun, N., Singhasivanon, P., Nosten, F.. 2007. In vitro activity of ferroquine (SSR 97193) against *Plasmodium falciparum* isolates from the Thai-Burmese border. *Malaria Journal*, **6**: 81.
- Basco, L.K., Le Bras, J.. 1993. In vitro activity of artemisinin derivatives against African isolates and clones of *Plasmodium falciparum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Sep; **49** (3): 301-307.
- Basco, L.K., Le Bras, J., Rhoades, Z., Wilson, C.M.. 1995. Analysis of *pfmdr1* and drug susceptibility in fresh isolates of *Plasmodium falciparum* from subsaharan Africa. *Molecular Biochemical Parasitology*, Nov; **74** (2): 157-166.
- Basco, L.K., Ndounga, M., Keundjian, A., Ringwald, P.. 2002. Molecular epidemiology of malaria in Cameroon IX. Characteristics of recrudescence and persistent *Plasmodium falciparum* infections after chloroquine or amodiaquine treatment in children. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Feb; **66** (2): 117-123.
- Basco, L.K., Ringwald, P.. 2002. Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. X. Evaluation of PFMDR1 mutations as genetic markers for resistance to amino alcohols and artemisinin derivatives. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Jun; **66** (6): 667-671.
- Basco, L.K., Tahar, R., Escalante, A.. 2004. Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XVIII. Polymorphisms of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 gene in isolates from symptomatic patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Mar; **70** (3): 238-244.
- Begum, K., Kim, H.S., Okuda, Y., Wataya, Y., Kimura, M., Huruta, T.. 2002. Genomic analysis of mefloquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Research*, **Suppl.** (2): 223-224.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bennett, T.N., Paguio, M., Gligorijevic, B., Seudieu, C., Kosar, A.D., Davidson, E., Roepe, P.D.. 2004. Novel, Rapid, and Inexpensive Cell-Based Quantification of Antimalarial Drug Efficacy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, May; **48** (5): 1807-1810.
- Bennett, T.N., Patel, J., Ferdig, M.T., Roepe, P.D.. 2007. Plasmodium falciparum Na⁺/H⁺ exchanger activity and quinine resistance. *Molecular Biochemical Parasitology*, May; **153** (1): 48-58.
- 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.
- Bonnet, M., Roper, C., Félix, M., Coulibaly, L., Kankolongo, G.M., Guthmann, J.P.. 2007. Efficacy of antimalarial treatment in Guinea: *in vivo* study of two artemisinin combination therapies in Dabola and molecular markers of resistance to sulphadoxine-pyrimethamine in N'Zérékoré. *Malaria Journal*, **6**: 54.
- Bozdech, Z., Ginsburg, H.. 2004. Antioxidant defense in *Plasmodium falciparum* – data mining of the transcriptome. *Malaria Journal*, Jul; **3**: 23.
- Bozdech, Z., Zhu, J., Joachimiak, M.P., Cohen, F.E., Pulliam, B., DeRisi, J.L.. 2003. Expression profiling of the schizont and trophozoite stages of *Plasmodium falciparum* with a long-oligonucleotide microarray. *Genome Biology*, Jan; **4** (2): R9.
- Brasseur, P., Guiguemde, R., Diallo, S., Guiyedi, V., Kombila, M., Ringwald, P., Olliaro, P.. 1999. Amodiaquine remains effective for treating uncomplicated malaria in west and central Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Nov-Dec; **93** (6): 645-650.
- Bray, P.G., Hawley, S.R., Ward, S.A.. 1996. 4-Aminoquinoline resistance of Plasmodium falciparum: insights from the study of amodiaquine uptake. *Molecular Pharmacology*, Dec; **50** (6): 1551-1558.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brockman, A., Singlam, S., Phiaphun, L., Looareesuwan, S., White, N.J., Nosten, F.. 2004. Field evaluation of a novel colorimetric method-double-site enzyme-linked lactate dehydrogenase immunodetection assay-to determine drug susceptibilities of *Plasmodium falciparum* clinical isolates from northwestern Thailand. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, Apr; **48** (4): 1426-1429.
- Brooks, D.R., Wang, P., Read, M., Watkins, W.M., Sims, P.F., Hyde, J.E.. 1994. Sequence variation of the hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. *European Journal of Biochemistry*, Sep; **224** (2): 397-405.
- Bustos, M.D.G., Gay, F., Diquet, B.. 1994. In vitro tests on Philippine isolates of *Plasmodium falciparum* against four standard antimalarials and qinghaosu derivatives. *Bulletin of the World Health Organization*, 72 (5): 729-735.
- 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.
- Calvosa, V.S., Adagu, I.S., Póvoa, M.M.. 2001. *Plasmodium falciparum*: emerging mefloquine resistance in vitro in Para State, north Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, May-Jun; **95** (3): 330-331.
- 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): 236-241.
- Chaiyaroj, S.C., Buranakiti, A., Angkasekwinai, P., Looareesuwan, S., Cowman, A.F.. 1999. Analysis of mefloquine resistance and amplification of *pfmdr1* in multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Nov; **61** (5): 780-783.
- Chaijaroenkul, W., Bangchang, K.N., Mungthin, M., Ward, S.A.. 2005. In vitro antimalarial drug susceptibility in Thai border areas from 1998–2003. *Malaria Journal*, Aug; **4**: 37.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chau, A.C., Fitch, C.D.. 1981. Mechanism of hemolysis induced by ferriprotoporphyrin IX. *Journal of Clinical Investigation*, Sep; **68** (3): 672-677.
- Cohen, S.N., Yielding, K.L.. 1965. Inhibition of DNA and RNA polymerase reactions by chloroquine. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, Aug; **54** (2): 521-527.
- 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 *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, Apr; **96** (8): 4506-4511.
- 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.
- Corpet, F.. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, Nov; **16** (22): 10881-10890.
- Cortese, J.F., Caraballo, A., Contreras, C.E., Plowe, C.V.. 2002. Origin and dissemination of *Plasmodium falciparum* drug-resistance mutations in South America. *Journal of Infectious Diseases*, Oct; **186** (7): 999-1006.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cowman, A.F., Coppel, R.L., Saint, R.B., Favaloro, J., Crewther, P.E., Stahl, H.D., Bianco, A.E., Brown, G.V., Anders, R.F., Kemp, D.J.. 1984. The ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) polypeptide of *Plasmodium falciparum* contains two separate blocks of tandem repeats encoding antigenic epitopes that are naturally immunogenic in man. *Molecular Biochemical Parasitology*, Jun; **2** (3): 207-221.
- Cowman, A.F., Galatis, D., Thompson, J.K.. 1994. Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the *pfmdr1* gene and cross-resistance to halofantrine and quinine. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, Feb; **91** (3): 1143-1147.
- Cowman, A.F., Karcz, S., Galatis, D., Culvenor, J.G.. 1991. A P-glycoprotein homologue of *Plasmodium falciparum* is localized on the digestive vacuole. *Journal of Cell Biology*, Jun; **113** (5): 1033-1042.
- 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.
- Cravo, P., Figueiredo, S., Nogueira, F., Lopes, D., Ferreira, I.D., Ferreira, C., Gil, J.P., do Rosário, V.E.. 2004. High frequency of the genetic polymorphisms associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance, among *Plasmodium falciparum* isolates from Sao Tome and Principe, West Africa. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, Apr; **98** (3): 293-296.
- Cravo, P.V.L., Carlton, J.M., Hunt, P., Bisoni, L., Padua, R.A., Walliker, D.. 2003. Genetics of Mefloquine Resistance in Rodente Malaria Parasite *Plasmodium chabaudi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Feb; **47** (2): 709-718.
- Culleton, R., Martinelli, A., Hunt, P., Carter, R.. 2005. Linkage group selection: Rapid gene discovery in malaria parasites. *Genome Research*, Jan; **15** (1): 92-97.
- Daily, J.P., Roberts, C., Thomas, S.M., Ndir, O., Dieng, T., Mboup, S., Wirth, D.F.. 2003. Prevalence of *Plasmodium falciparum* *pfert* polymorphisms and *in vitro* chloroquine sensitivity in Senegal. *Parasitology*, May; **126** (Pt 5): 401-405.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Desjardins, R.E., Canfield, C.J., Haynes, J.D., Chulay, J.D.. 1979. Quantitative assessment of anti-malarial activity *in vitro* by a semi-automated microdilution technique. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Dec; **16** (6): 710-718.
- Diggs, C., Joseph, K., Flemmings, B., Snodgrass, R., Hines, F.. 1975. Protein synthesis *in vitro* by cryopreserved *Plasmodium falciparum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Sep; **24** (5): 760-763.
- Djimde, A., Doumbo, O.K., Cortese, J.F., Kayentao, K., Doumbo, S., Diourte, Y., Dicko, A., Su, X.Z., Nomura, T., Fidock, D.A., Wellems, T.E., Plowe, C.V., Coulibaly, D.. 2001. A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *The New England Journal of Medicine*, Jan; **344** (4): 257-263.
- 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.
- Duah, N.O., Wilson, M.D., Ghansah, A., Abuaku, B., Edoh, D., Quashie, N.B., Koram, K.A.. 2007. Mutations in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter and multidrug resistance genes, and treatment outcomes in Ghanaian children with uncomplicated malaria. *Journal of Tropical Paediatrics*, Feb; **53** (1): 27-31.
- Duraisingh, M.T., Cowman, A.F.. 2005. Contribution of the *pfmdr1* gene to antimalarial drug-resistance. *Acta Tropica*, Jun; **94** (3): 181-190.
- Duraisingh, M.T., Jones, P., Sambou, I., von Seidlein, L., Pinder, M., Warhurst, D.C.. 2000 a. The tyrosine-86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Molecular Biochemical Parasitology*, Apr; **108** (1): 13-23.
- Duraisingh, M.T., Roper, C., Walliker, D., Warhurst, D.C.. 2000 b. Increased sensitivity to the antimalarials mefloquine and artemisinin is conferred by mutations in the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*, May; **36** (4): 955-961.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Durand, R., Jafari, S., Vauzelle, J., Delabre, J.F., Jesic, Z., Le Bras, J.. 2001. Analysis of *pfcr* point mutations and chloroquine susceptibility in isolates of *Plasmodium falciparum*. *Molecular Biochemical Parasitology*, Apr; **114** (1): 95-102.
- 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. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, Aug; **424** (6951): 957-961.
- Efferth, T.. 2005. Mechanistic perspectives for 1,2,4-trioxanes in anti-cancer therapy. *Drug Resistance Updates*, Feb-Apr; **8** (1-2): 85-97.
- Efferth, T., Briehl, M.M., Tome, M.E.. 2003 b. Role of antioxidant genes for the activity of artesunate against tumor cells. *International Journal Oncology*, Oct; **23** (4): 1231-1235.
- Efferth, T., Sauerbrey, A., Olbrich, A., Gebhart, E., Rauch, P., Weber, H.O., Hengstler, J.G., Halatsch, M.E., Volm, M., Tew, K.D., Ross, D.D., Funk, J.O.. 2003 a. Molecular modes of action of artesunate in tumor cell lines. *Molecular Pharmacology*, Aug; **64** (2): 382-394.
- Efferth, T., Volm, M.. 2005. Glutathione-related enzymes contribute to resistance of tumor cells and low toxicity in normal organs to artesunate. *In Vivo*, Jan-Feb; **19** (1): 225-232.
- Eisen, D., Billman-Jacobe, H., Marshall, V.F., Fryauff, D., Coppel, R.L.. 1998. Temporal variation of the merozoite surface protein-2 gene of *Plasmodium falciparum*. *Infection and immunity*, **66** (1): 239-246.
- Escalante, A.A., Grebert, H.M., Isea, R., Goldman, I.F., Basco, L., Magris, M., Biswas, S., Kariuki, S., Lal, A.A.. 2002. A study of genetic diversity in the gene encoding the circumsporozoite protein (CSP) of *Plasmodium falciparum* from different transmission areas—XVI. Asembo Bay Cohort Project. *Molecular Biochemical Parasitology*, Nov-Dec; **125** (1-2): 83-90.
- Famin, O., Ginsburg, H.. 2002. Differential effects of 4-aminoquinoline-containing antimalarial drugs on hemoglobin digestion in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Biochemical Pharmacology*, Feb; **63** (3): 393-398.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ferdig, M.T., Cooper, R.A., Mu, J., Deng, B., Joy, D.A., Su, X.Z., Wellems, T.E.. 2004. Dissecting the loci of low-level quinine resistance in malaria parasites. *Molecular Microbiology*, May; **52** (4): 985-997.
- Ferrer-Rodríguez, I., Pérez-Rosado, J., Gervais, G.W., Peters, W., Robinson, B.L., Serrano, A.E.. 2004. *Plasmodium yoelii*: identification and partial characterization of an MDR1 gene in an artemisinin-resistant line. *Journal of Parasitology*, Feb; **90** (1): 152-160.
- 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 Rosário, V.E., Cravo, P.. 2007. *In vitro* assessment of artesunate, artemether and amodiaquine susceptibility and molecular analysis of putative resistance-associated mutations of *Plasmodium falciparum* from São Tomé and Príncipe. *Tropical Medicine and International Health*, Mar; **12** (3): 353-362.
- Ferreira, I.D., Martinelli, A., Rodrigues, L.A., do Carmo, E.L., do Rosário, 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*. *Tropical Medicine and International Health*, Mar; **13** (2): 199-207.
- Ferreira, I.D., Nogueira, F., Borges, S.T., do Rosario, V.E., Cravo, P.. 2004. Is the expression of genes encoding enzymes of glutathione (GSH) metabolism involved in chloroquine resistance in *Plasmodium chabaudi* parasites?. *Molecular Biochemical and Parasitology*, Jul; **136** (1): 43-50.
- Ferone, R.. 1977. Folate metabolism in malaria. *Bulletin of the World Health Organization*, **55** (2-3): 291-298.
- Fidock, D.A., Nomura, T., Talley, A.K., Cooper, R.A., Dzekunov, S.M., Ferdig, M.T., Ursos, L.M., Sidhu, A.B., Naude, B., Deitsch, K.W., Su, X.Z., Wootton, J.C., Roepe, P.D., Wellems, T.E.. 2000. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Molecular Cell*, Oct; **6** (4): 861-871.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Finn, R.D., Mistry, J., Schuster-Böckler, B., Griffiths-Jones, S., Hollich, V., Lassmann, T., Moxon, S., Marshall, M., Khanna, A., Durbin, R., Eddy, S.R., Sonnhammer, E.L., Bateman, A.. 2006. Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Research*, Jan; **34**: 247-251.
- Florens, L., Washburn, M.P., Raine, J.D., Anthony, R.M., Grainger, M., Haynes, J.D., Moch, J.K., Muster, N., Sacci, J.B., Tabb, D.L., Witney, A.A., Wolters, D., Wu, Y., Gardner, M.J., Holder, A.A., Sinden, R.E., Yates, J.R., Carucci, D.J.. 2002. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*, Oct; **419** (6906): 520-526.
- Foley, M., Tilley, L.. 1998. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. *Pharmacology and Therapeutics*, Jul; **79** (1): 55-87.
- Foote, S.J., Kyle, D.E., Martin, R.K., Oduola, A.M., Forsyth, K., Kemp, D.J., Cowman, A.F.. 1990. Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, May; **345** (6272): 255-258.
- Foote, S.J., Thompson, J.K., Cowman, 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.
- Foster, S.. 1994. Economic prospects for a new antimalarial drug. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Jun; **88** (suppl.1): 55-56.
- 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.
- Frontali, C., Walliker, D., Mons, B.. 1991. Genome organization and genetics of *Plasmodium*. *Acta Leiden*, **60** (1): 13-17.
- Galinski, M.R., Arnot, D.E., Cochrane, A.H., Barnwell, J.W., Nussenzweig, R.S., Enea, V.. 1987. The circumsporozoite gene of the *Plasmodium cynomolgi* complex. *Cell*, Jan; **48** (2): 311-319.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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., Shallom, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, 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.. 2002. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, Oct; **419** (6906): 498-511.
- Geary, T.G., Bonanni, L.C., Jensen J.B., Ginsburg, H.. 1986 a. Effects of combinations of quinoline-containing antimalarials on *Plasmodium falciparum* in culture. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, Jun; **80** (3): 285-291.
- Geary, T.G., Jensen, J.B., Ginsburg, H.. 1986 b. Uptake of [3H] chloroquine by drug-sensitive and -resistant strains of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochemical Pharmacology*, Nov; **35** (21): 3805-3812.
- 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, S.A., Bray, P.G.. 1999. An integrated model of chloroquine action. *Parasitology Today*, Sep; **15** (9): 357-359.
- Gogtay, N.J., Kadam, V.S., Karnad, D.R., Kanbur, A., Kamtekar, K.D., Kshirsagar, N.A.. 2000. Probable resistance to parenteral artemether in *Plasmodium falciparum*: case reports from Mumbai (Bombay), India. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, Jul; **94** (5): 519-520.
- 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.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gomez-Saladin, E., Fryauff, D.J., Taylor, W.R., Laksana, B.S., Susanti, A.I., Purnomo, Subianto, B., Richie, T.L.. 1999. *Plasmodium falciparum mdr1* mutations and *in vivo* chloroquine resistance in Indonesia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Aug; **61** (2): 240-244.
- Gorissen, E., Ashruf, G., Lamboo, M., Bennebroek, J., Gikunda, S., Mbaruku, G., Kager, P.A.. 2000. *In vivo* efficacy study of amodiaquine and sulfadoxine/pyrimethamine in Kibwezi, Kenya and Kigoma, Tanzania. *Tropical Medicine and International Health*, Jun; **5** (6): 459-463.
- Graves, P.R., Kwiek, J.J., Fadden, P., Ray, R., Hardem, K., Coley, A.M., Foley, M., Haystead, T.A.. 2002. Discovery of Novel Targets of Quinoline Drugs in the Human Purine Binding Proteome. *Molecular Pharmacology*, Dec; **62** (6): 1364-1372.
- Grobusch, M.P., Adagu, I.S., Kremsner, P.G., Warhurst, D.C.. 1998. *Plasmodium falciparum*: *in vitro* chloroquine susceptibility and allele-specific PCR detection of *Pfmdr1 Asn86Tyr* polymorphism in Lambarene, Gabon. *Parasitology*, Mar; **116** (Pt3): 211-217.
- 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.
- Harinasuta, T., Migasen, S., Boonag, D.. 1962. Chloroquine resistance in Thailand. *Unesco 1st Regional Symposium on Scientific Knowledge of Tropical Parasites*. Singapore: University of Singapore.
- 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.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Henry, M., Diallo, I., Bordes, J., Ka, S., Pradines, B., Diatta, B., M'Baye, P.S., Sane, M., Thiam, M., Gueye, P.M., Wade, B., Touze, J.E., Debonne, J.M., Rogier, C., Fusai, T.. 2006. Urban malaria in Dakar, Senegal: chemosusceptibility and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Jul; **75** (1): 146-151.
- 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.
- Hien, T.T., White, N.J.. 1993. Qunghaosu. *Lancet*, Mar; **341** (8845): 603-608.
- Holmgren, G., Björkman, A., Gil, J.P.. 2006 a. 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., Gil, J.P., Ferreira, P.M., Veiga, M.I., Obonyo, C.O., Björkman, A.. 2006 b. Amodiaquine resistant Plasmodium falciparum malaria in vivo is associated with selection of pfprt 76T and pfmdr1 86Y. *Infection, genetics and evolution*, Jul; **6** (4): 309-314.
- 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.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Huaman, M.C., Roncal, N., Nakazawa, S., Long, T.T., Gerena, L., Garcia, C., Solari, L., Magill, A.J., Kanbara, H.. 2004. Polymorphism of the *Plasmodium falciparum* multidrug resistance and chloroquine resistance transporter genes and in vitro susceptibility to aminoquinolines in isolates from the Peruvian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, May; **70** (5): 461-466.
- Hunt, P., Afonso, A., Creasey, A., Culleton, R., Sidhu, A.B., Logan, J., Valderramos, S.G., McNae, I., Cheesman, S., Rosario, V.D., 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*, Jul; **65** (1): 27-40.
- Huong, N.M., Hewitt, S., Davis, T.M., Dao, L.D., Toan, T.Q., Kim, T.B., Hanh, N.T., Phuong, V.N., Nhan, D.H., Cong, L.D.. 2001. Resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in a highly endemic area of southern Viet Nam: a study in vivo and in vitro. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, May-Jun; **95** (3): 325-329.
- Inselburg, J.. 1985. Induction and isolation of artemisinin-resistant mutants of *Plasmodium falciparum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, May; **34** (3): 417-418.
- 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 on 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., Sreepian, A., Srisarin, A., Pathepchtovong, K.. 2003. Effect of dihydroartemisinin on the antioxidant capacity of *P. falciparum* infected erythrocytes. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, Dec; **34** (4): 744-750.
- Jambou, R., Legrand, E., Niang, M., Khim, N., Lim, P., Volney, B., Ekala, 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.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ke, X., Collins, A., Ye, S.. 2001. PIRA PCR designer for restriction analysis of single nucleotide polymorphisms. *Bioinformatics*, Sep; **17** (9): 838-839.
- Kim, H.S., Okuda, Y., Begum, K., Nagai, Y., Wataya, Y., Kimura, M., Huruta, T.. 2001. Analysis of *Pfmdr 1* gene in mefloquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Research*, **suppl** (1): 231-232.
- Kim, T., Kim, Y.J., Song, K.J., Song, J.W., Cha, S.H., Kim, Y.K., Shin, Y.K., Suh, I.B., Lim, C.S.. 2002 The molecular characteristics of circumsporozoite protein gene subtypes from *Plasmodium vivax* isolates in Republic of Korea. *Parasitology Research*, Dec; **88** (12): 1051-1054.
- 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.
- Krogstad, D.J., Gluzman, I.Y., Kyle, D.E., Oduola, A.M., Martin, S.K., Milhous, W.K., Schlesinger, P.H.. 1987. Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. *Science*, Nov; **238** (4831): 1283-1285.
- 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.
- Kyosiimire-Lugemwa, J., Nalunkuma-Kazibwe, A.J., Mujuzi, G., Mulindwa, H., Talisuna, A., Egwang, T.G.. 2002. The Lys-76-Thr mutation in PfCRT and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Uganda. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Jan-Feb; **96** (1): 91-95.
- Labbé, A.C., Bualombai, P., Pillai, D.R., Zhong, K.J., Vanisaveth, V., Hongvanthong, B., Looareesuwan, S., Kain, K.C.. 2001. Molecular markers for chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Thailand and Laos. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, Dec; **95** (8): 781-788.
- Lambros, C., Vanderberg, J.P.. 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *Journal of Parasitology*, Jun; **65** (3): 418-420.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Le Bras, J.. 1998. In vitro susceptibility of African *Plasmodium falciparum* isolates to dihydroartemisinin and the risk factors for resistance to Qinghaosu. *Médecine tropicale: revue du Corps de santé colonial*, **58** (Suppl.3): 18-21.
- 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.
- Leal, O., Leal, E.A., Borges Júnior, F.R., Paez, M.L., Teodósio, S., Tavares-Neto, J.. 2003. Clinical-parasitological response to treatment with quinine associated to doxycycline in uncomplicated falciparum malaria. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Nov-Dec; **36** (6): 751-754.
- Liebau, E., Bergmann, B., Campbell, A.M., Teesdale-Spittle, P., Brophy, P.M., Lüersen, K., Walter, R.D.. 2002. The glutathione S-transferase from *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, Sep-Oct; **124** (1-2): 85-90.
- Lim, A.S., Galatis, D., Cowman, A.F.. 1996. *Plasmodium falciparum*: amplification and overexpression of *pfmdr1* is not necessary for increased mefloquine resistance. *Experimental Parasitology*, Aug; **83** (3): 295-303.
- Lim, C.S., Kim, Y.K., Lee, K.N., Kim, S.H., Hoffman, K.J., Song, K.J., Song, J.W.. 2001. The analysis of circumsporozoite-protein gene sequences from South Korean isolates of *Plasmodium vivax*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, Apr; **95** (3): 229-235.
- Lim, P., Chim, P., Sem, R., Nemh, S., Poravuth, Y., Lim, C., Seila, S., Tsuyuoka, R., Denis, M.B., Socheat, D., Fandeur, T.. 2005. In vitro monitoring of *Plasmodium falciparum* susceptibility to artesunate, mefloquine, quinine and chloroquine in Cambodia: 2001–2002. *Acta Trópica*, Jan; **93** (1): 31-40.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D.. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods*, Dec; **25** (4): 402-408.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Looareesuwan, S., Buchachart, K., Wilairatana, P., Chalermrut, K., Rattanapong, Y., Amradee, S., Siripiphat, S., Chullawichit, S., Thimasan, K., Ittiverakul, M., Triampon, A., Walsh, D.S.. 1997. Primaquine-tolerant vivax malaria in Thailand. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, Dec; **91** (8): 939-943.
- Lopes, D., Nogueira, F., Ferreira, C., Gil, J.P., do Rosário, V.E., Cravo, P.. 2002 a. *Pfprt* and *pfmdr1* mutations and malaria chloroquine resistance in the Democratic Republic of São Tomé & Príncipe, West Africa. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, Dec; **96** (8): 831-834.
- Lopes, D., Rungsihirunrat, K., Nogueira, F., Seugorn, A., Gil, J.P., do Rosario, V.E., Cravo, P.. 2002 b. Molecular characterisation of drug-resistant *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Malaria Journal*, Oct; **1**: 12.
- Lüersen, K., Walter, R.D., Müller, S.. 1999. The putative γ -glutamylcysteine synthetase from *Plasmodium falciparum* contains large insertions and a variable tandem repeat. *Molecular and Biochemical Parasitology*, Jan; **98** (1): 131-142.
- Luxemburger, C., Brockman, A., Silamut, K., Nosten, F., van Vugt, M., Gimenez, F., Chongsuphajaisiddhi, T., White, N.J.. 1998. Two patients with falciparum malaria and poor *in vivo* responses to artesunate. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Nov-Dec; **92** (6): 668-669.
- 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.
- Maguire, J.D., Sumawinata, I.W., Masbar, S., Laksana, B., Prodjodipuro, P., Susanti, I., Sismadi, P., Mahmud, N., Bangs, M.J., Baird, J.K.. 2002. Chloroquine-resistant *Plasmodium malariae* in south Sumatra, Indonésia. *Lancet*, Jul; **360** (9326): 58-60.
- Martet, G., Conceição, S., Cordaliani, G., Delolme, H., Raphenon, G., Hovette, P., Doury, J.C., Baudon, D., Touze, J.E., Lecamus, J.L.. 1991. Le paludisme en République de São Tomé e Príncipe. Évaluation épidémiologique et chimiorésistance de *Plasmodium falciparum*. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **84** (3): 273-280.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Martin, R.E., Kirk, K.. 2004. The Malaria Parasite's Chloroquine Resistance Transporter is a Member of the Drug/Metabolite Transporter Superfamily. *Molecular Biology and Evolution*, Oct; **21** (10): 1938-1949.
- Martin, R.E., Trueman, J.W.H., Kirk, K.. 2003. Bioinformatic analysis of PfCRT places it in a known family of transport proteins. *Experimental Parasitology*. **105**: 56-57.
- Martin, S.K., Oduola, A.M., Milhous, W.K.. 1987. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. *Science*, Feb; **235** (4791): 899-901.
- Mawili-Mboumba, D.P., Kun, J.F.J., Lell, B., Kremsner, P.G., Ntoumi, F.. 2002. *Pfmdr1* Alleles and Response to Ultralow-Dose Mefloquine Treatment in Gabonese Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Jan; **46** (1): 166-170.
- Mayengue, P.I., Kalmbach, Y., Issifou, S., Kremsner, P.G., Ntoumi, F.. 2007. No variation in the prevalence of point mutations in the *Pfcrt* and *Pfmdr1* genes in isolates from Gabonese patients with uncomplicated or severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Parasitology Research*, Feb; **100** (3): 487-493.
- Mayxay, M., Barends, M., Brockman, A., Jaidee, A., Nair, S., Sudimack, D., Pongvongsa, T., Phompida, S., Phetsouvanh, R., Anderson, T., White, N.J., Newton, P.N.. 2007. *In vitro* antimalarial drug susceptibility and *pfcr*t mutation among fresh *Plasmodium falciparum* isolates from the Lao PRD (Laos). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Feb; **76** (2): 245-250.
- Menard, D., Djalle, D., Manirakiza, A., Yapou, F., Siadoua, V., Sana, S., Matsika-Claquin, M.D., Nestor, M., Talarmin, A.. 2005. Drug-resistant malaria in Bangui, Central African Republic: an *in vitro* assessment. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Aug; **73** (2): 239-243.
- Menard, D., Yapou, F., Manirakiza, A., Djalle, D., Matsika-Claquin, M.D., Talarmin, A.. 2006. Polymorphisms in *pfcr*t, *pfmdr1*, *dhfr* genes and *in vitro* responses to antimalarials in *Plasmodium falciparum* isolates from Bangui, Central African Republic. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Sep; **75** (3): 381-387.
- Meshnick, S.R.. 2002. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *International Journal of Parasitology*, Dec; **32** (13): 1655-1660.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ministère de la Santé, 2004. *Rapport Annuel 2003 du Ministère de la Santé*. Kigali, Rwanda.
- Ministério da Saúde, 2006. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasil.
- Mita, T., Kaneko, A., Hombhanje, F., Hwaihwanje, I., Takahashi, N., Osawa, H., Tsukahara, T., Masta, A., Lum, J.K., Kobayakawa, T., Ishizaki, T., Björkman, A.. 2006. Role of *pfmdr1* mutations on chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates with *pfcr1* K76T from Papua New Guinea. *Acta Tropica*, May; **98** (2): 137-144.
- Montoya, P., Tobón, A., Blair, S., Carmona, J., Maestre, A.. 2007. Polymorphisms of the *pfmdr1* gene in field samples of *Plasmodium falciparum* and their association with therapeutic response to antimalarial drugs and severe malaria in Colombia. *Biomedica*, Jun; **27** (2): 204-215.
- Mugittu, K., Genton, B., Mshinda, H., Beck, H.P.. 2006. Molecular monitoring of *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin in Tanzania. *Malaria Journal*, Dec; **5**: 126.
- Murphy, G.S., Basri, H., Purnomo, Andersen E.M., Bangs, M.J., Mount, D.L., Gordon, J., Lal, A.A., Purwokusumo, A.R., Harjosuwarno, S.. 1993. *Vivax* malaria resistant to treatment and prophylaxis with chloroquine. *Lancet*, Jan; **341** (8837): 96-100.
- Nagesha, H.S., Din-Syafuruddin, Casey, G.J., Susanti, A.I., Fryauff, D.J., Reeder, J.C., Cowman, A.F.. 2001. Mutations in the *pfmdr1*, *dhfr* and *dhps* genes of *Plasmodium falciparum* are associated with *in-vivo* drug resistance in West Papua, Indonesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Jan-Feb; **95** (1): 43-49.
- Nelson, A.L., Purfield, A., McDaniel, P., Uthaimongkol, N., Buathong, N., Sriwichai, S., Miller, R.S., Wongsrichanalai, C., Meshnick, S.R.. 2005. *pfmdr1* genotyping and *in vivo* mefloquine resistance on the Thai-Myanmar border. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, May; **72** (5): 586-592.
- Ngo, T., Duraisingh, M., Reed, M., Hipgrave, D., Biggs, B., Cowman, A.F.. 2003. Analysis of *pfcr1*, *pfmdr1*, *dhfr*, and *dhps* mutations and drug sensitivities in *Plasmodium falciparum* isolates from patients in Vietnam before and after treatment with artemisinin. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Mar; **68** (3): 350-356.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Nishiyama, Y., Okuda, Y., Kim, H.S., Huruta, T., Kimura, M., Wataya, Y.. 2004 Genetic analysis of mefloquine-resistant mechanism of *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Symposium Series*; **48**: 163-164.
- Noedl, H., Faiz, M.A., Yunus, E.B., Rahman, M.R., Hossain, M.A., Samad, R., Miller, R.S., Pang L.W., Wongsrichanalai, C.. 2003. Drug-Resistant malaria in Bangladesh: and *In vitro* assesment. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Feb; **68** (2): 140-142.
- Noedl, H., Krudsood, S., Leowattana, W., Tangpukdee, N., Thanachartwet, W., Looareesuwan, S., Miller, R.S., Fukuda, M., Jongsakul, K., Yingyuen, K., Sriwichai, S., Ohrt, C., Knirsch, C.. 2007. In vitro antimalarial activity of azithromycin, artesunate, and quinine in combination and correlation with clinical outcome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Feb; **51** (2): 651-656.
- Noedl, H., Wernsdorfer, W.H., Krudsood, S., Wilairatana, P., Viriyavejakul, P., Kollaritsch, H., Wiedermann, G., Looareesuwan, S.. 2001. In vivo-in vitro model for the assessment of clinically relevant antimalarial cross-resistance. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Dec; **65** (6): 696-699.
- Noedl, H., Wernsdorfer, W.H., Miller, R.S., Wongsrichanalai, C.. 2002. Histidine-Rich Protein II: a Novel Approach to Malaria Drug Sensitivity Testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Jun; **46** (6): 1658-1664.
- Nsoby, S.L., Dokomajilar, C., Joloba, M., Dorsey, G., Rosenthal, P.J.. 2007. Resistance-mediating *Plasmodium falciparum* pfcrt and pfmdr1 alleles after treatment with artesunate-amodiaquine in Uganda. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Aug; **51** (8): 3023-3025.
- Nzila, A.M., Mberu, E.K., Sulo, J., Dayo, H., Winstanley, P.A., Sibley, C.H., Watkins, W.M.. 2000. Towards an understanding of the mechanism of pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: genotyping of dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of Kenyan parasites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Apr; **44** (4): 991-996.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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., Ogungbamigbe, T.O., Fagbenro-Beyioku, A.F., Fendel, R., Kremsner, P.G., Kun, J.F.J.. 2007. Rapid detection of Pfcrt and Pfmdr1 mutations in *Plasmodium falciparum* isolates by FRET and *in vivo* response to chloroquine among children from Osogbo, Nigeria. *Malaria Journal*, Apr; **6**: 41.
- Olliaro, P., Mussano, P.. 2003. Amodiaquine for treating malaria. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, **2**: CD000016.
- Oyakhrome, S., Pötschke, M., Schwarz, N.G., Dörnemann, J., Laengin, M., Salazar, C.O., Lell, B., Kun, J.F.J., Kremsner, P.G., Grobusch, M.P.. 2007. Artesunate – amodiaquine combination therapy for falciparum malaria in young Gabonese children. *Malaria Journal*, Mar; **6**: 29.
- Peel, S.A., Bright, P., Yount, B., Handy, J., Baric, R.S.. 1994. A strong association between mefloquine and halofantrine resistance and amplification, overexpression, and mutation in the P-glycoprotein gene homolog (*pfmdr*) of *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Nov; **51** (5): 648-658.
- Peters, W., Robinson, B.L.. 1999. The chemotherapy of rodent malaria. LVI. Studies on the development of resistance to natural and synthetic endoperoxides. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, Jun; **93** (4): 325-339.
- Pickard, A.L., Wongsrichanalai, C., Purfield, A., Kamwendo, D., Emery, K., Zalewski, C., Kawamoto, F., Miller, R.S., Meshnick, S.R.. 2003. Resistance to antimalarials in Southeast Asia and genetic polymorphisms in *pfmdr1*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Aug; **47** (8): 2418-2423.
- Pinto, J., Sousa, C.A., Gil, V., Ferreira, C., Gonçalves, L., Lopes, D., Petrarca, V., Charlwood, J.D., do Rosário, V.E.. 2000. Malaria in São Tomé and Príncipe: parasite prevalences and vector densities. *Acta Tropica*, Sep; **76** (2): 185-193.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Plummer, W.B., Pereira, L.M.P., Carrington, C.V.F.. 2004. *Pfprt* and *pfmdr1* Alleles Associated with Chloroquine Resistance in *Plasmodium falciparum* from Guyana, South America. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Jun; **99** (4): 389-392.
- Pologe, L.G., Ravetch, J.V.. 1988. Large deletions result from breakage and healing of *P. falciparum* chromosomes. *Cell*, Dec; **55** (5): 869-874.
- Póvoa, M.M., Adagu, I.S., Oliveira, S.G., Machado, R.L., Miles, M.A., Warhurst, D.C.. 1998. *Pfmdr1* Asn1042Asp and Asp1246Tyr polymorphisms, thought to be associated with chloroquine resistance, are present in chloroquine-resistant and chloroquine-sensitive Brazilian field isolates of *Plasmodium falciparum*. *Experimental Parasitology*, Jan; **88** (1): 64-68.
- Pradines, B., Hovette, P., Fusai, T., Atanda, H.L., Baret, E., Cheval, P., Mosnier, J., Callec, A., Cren, J., Amalvict, R., Gardair, J.P., Rogier, C.. 2006 a. Prevalence of In Vitro Resistance to Eleven Standard or New Antimalarial Drugs among *Plasmodium falciparum* Isolates from Pointe-Noire, Republic of the Congo. *Journal of Clinical Microbiology*, Jul; **44** (7): 2403-2408.
- Pradines, B., Mamfoumbi, M.M., Parzy, D., Owono M.M., Lebeau, C., Mourou Mbina, J.R., Doury, J.C., Kombila, M.. 1998 a. In vitro susceptibility of Gabonese wild isolates of *Plasmodium falciparum* to artemether, and comparison with chloroquine, quinine, halofantrine and amodiaquine. *Parasitology*, Dec; **117** (Pt 6): 541-545.
- Pradines, B., Mamfoumbi, M.M., Tall, A., Sokhna, C., Koeck, J.L., Fusai, T., Mosnier, J., Czarnecki, E., Spiegel, A., Trape, J.F., Kombila, M., Rogier, C.. 2006 b. In Vitro Activity of Tafenoquine against the Asexual Blood Stages of *Plasmodium falciparum* Isolates from Gabon, Senegal, and Djibouti. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Sep; **50** (9): 3225-3226.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Pradines, B., Rogier, C., Fusai, T., Tall, A., Trape, J.F., Doury, J.C.. 1998 b. In vitro activity of artemether against African isolates (Senegal) of *Plasmodium falciparum* in comparison with standard antimalarial drugs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Mar; **58** (3): 354-357.
- Pradines, B., Tall, A., Ramiandrasoa, F., Spiegel, A., Sokhna, C., Fusai, T., Mosnier, J., Daries, W., Trape, J.F., Kunesch, G., Parzy, D., Rogier, C.. 2006 c. In vitro activity of iron-binding compounds against Senegalese isolates of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Jun; **57** (6): 1093-1099.
- Price, R.N., Cassar, C., Brockman, A., Duraisingh, M., Van Vugt, M., White, N.J., Nosten, F., Krishna, S.. 1999. The *pfmdr1* gene is associated with a multidrug-resistant phenotype in *Plasmodium falciparum* from the western border of Thailand. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Dec; **43** (12): 2943-2949.
- Price, R.N., Nosten, F.. 2001. Drug resistant falciparum malaria: clinical consequences and strategies for prevention. *Drug Resistant Updates*, Jun; **4** (3): 187-196.
- Price, R.N., Uhlemann, A.C., Brockman, A., McGready, R., Ashley, E., Phaipun, L., Patel, R., Laing, K., Looareesuwan, S., White, N.J., Nosten, F., Krishna, S.. 2004. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet*, Jul; **364** (9432): 438-447.
- Ramharter, M., Burkhardt, D., Nemeth, J., Adegnika, A.A., Kremsner, P.G.. 2006. In vitro activity of artemisone compared with artesunate against *Plasmodium falciparum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Oct; **75** (4): 637-639.
- Randrianariveლოსia, M., Raharimalala, L.A., Randrianasolo, L., Ratsimbaoa, A., Rason, M.A., Ariey, F., Jambou, R.. 2001. Madagascan isolates of *Plasmodium falciparum* showing low sensitivity to artemether in vitro. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, Apr; **95** (3): 237-243.
- Rason, M.A., Andrianantenaina, H.B., Ariey, F., Raveloson, A., Domarle, O., Randrianariveლოსia, M.. 2007. Prevalent pfmdr1 N86Y mutant Plasmodium falciparum in madagascar despite absence of pfcrt mutant strains. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Jun; **76** (6): 1079-1083.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Reed, M.B., Saliba, K.J., Caruana, S.R., Kirk, K., Cowman, A.F.. 2000. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, Feb; **403** (6772): 906-909.
- 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.
- Rosário, V.. 1981. Cloning of naturally occurring mixed infections of malaria parasites. *Science*, May; **212** (4498): 1037-1038.
- Ross, J.. 2005. Treating Child Malaria in Rwandan Communities. *eJournal USA: Economic Perspectives*, Aug; **10** (3): 25-26.
- Rwagacondo, C.E., Karema, C., Mugisha, V., Erhart, A., Dujardin, J.C., Van Overmeir, C., Ringwald, P., D'Alessandro, U.. 2004. Is amodiaquine failing in Rwanda? Efficacy of amodiaquine alone and combined with artesunate in children with uncomplicated malaria. *Tropical Medicine and International Health*, Oct; **9** (10): 1091-1098.
- Rwagacondo, C.E., Niyitegeka, F., Sarushi, J., Karema, C., Mugisha, V., Dujardin, J.C., Van Overmeir, C., van den Ende, J., D'Alessandro, U.. 2003. Efficacy of amodiaquine alone and combined with sulfadoxine-pyrimethamine and of sulfadoxine-pyrimethamine combined with artesunate. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Jun; **68** (6): 743-747.
- Sahr, F., Willoughby, V.R., Gbakima, A.A., Bockarie, M.J.. 2001. Apparent drug failure following artesunate treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in Freetown, Sierra Leone: four case reports. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, Jul; **95** (5): 445-449.
- Sakihama, N., Matsuo, T., Mitamura, T., Horii, T., Kimura, M., Kawabata, M., Tanabe, K.. 2004. Relative frequencies of polymorphisms of variation in Block 2 repeats and 5' recombinant types of *Plasmodium falciparum* msp1 alleles. *Parasitology International*, Mar; **53** (1): 59-67.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Sanchez, C.P., Wunsch, S., Lanzer, M.. 1997. Identification of a chloroquine importer in *Plasmodium falciparum*. Differences in import kinetics are genetically linked with the chloroquine-resistant phenotype. *Journal of Biology and Chemistry*, Jan 31; **272** (5): 2652-2658.
- 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.
- Schmidt, L. H., Crosby, R., Rasco, J., Vaughan, D.. 1978. Antimalarial Activities of Various 4-Quinoline methanols with Special Attention to WR-142,490 (Mefloquine). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Jun; **13** (6): 1011-1030.
- 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.
- Severini, C., Menegon, M., Sannella, A.R., Paglia, M.G., Narciso, P., Matteelli, A., Gulletta, M., Caramello, P., Canta, F., Xayavong, M.V., Moura, I.N., Pieniazek, N.J., Taramelli, D., Majori, G.. 2006. Prevalence of pfcrt point mutations and level of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Africa. *Infection, genetics and evolution*, Jul; **6** (4): 262-268.
- Sidhu, A.B., Uhlemann, A.C., Valderramos, S.G., Valderramos, J.C., Krishna, S., Fidock, D.A.. 2006. Decreasing *pfmdr1* copy number in *Plasmodium falciparum* malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. *Journal of Infectious Diseases*, Aug; **194** (4): 528-535.
- Sidhu, A.B., Valderramos, S.G., Fidock, D.A.. 2005. *pfmdr1* mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*, Aug; **57** (4): 913-926.
- Sidhu, A.B., Verdier-Pinard, D., Fidock, D.A.. 2002. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by *pfprt* mutations. *Science*, Oct; **298** (5591): 210-213.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Sienkiewicz, N., Daher, W., Dive, D., Wrenger, C., Viscogliosi, E., Wintjens, R., Jouin, H., Capron, M., Muller, S., Khalife, J.. 2004. Identification of a mitochondrial superoxide dismutase with an unusual targeting sequence in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, Sep; **137** (1): 121-132.
- Sinden, R.E., Hartley, R.H., Winger, L.. 1985. The development of *Plasmodium ookinetes in vitro*: an ultrastructural study including a description of meiotic division. *Parasitology*, Oct; **91** (Pt 2): 227-244.
- Singh, R.K.. 2002. The response of a case of multidrug-resistant, *Plasmodium falciparum* malaria to an unusual combination of antimalarial drugs. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, Jun; **96** (4): 417-418.
- Sinnis, P., Wellems, T.E.. 1988. Long-range restriction maps of *Plasmodium falciparum* chromosomes: crossingover and size variation among geographically distant isolates. *Genomics*, Nov; **3** (4): 287-295.
- Sirawaraporn, W., Sathitkul, S., Sirawaraporn, R., Yuthavong, Y., Santi, D.V.. 1997. Antifolate-resistant mutants of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, Feb; **94** (4): 1124-1129.
- Slater, A.F., Swiggard, W.J., Orton, B.R., Flitter, W.D., Goldberg, D.E., Cerami, A., Henderson, G.B.. 1991. An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, Jan; **88** (2): 325-329.
- Staedke, S.G., Kanya, M.R., Dorsey, G., Gasasira, A., Ndezi, G., Charlebois, E.D., Rosenthal, P.J.. 2001. Amodiaquine, sulfadoxine/pyrimethamine, and combination therapy for treatment of uncomplicated falciparum malaria in Kampala, Uganda: a randomised trial. *Lancet*, Aug; **358** (9279): 368-374.
- Staedke, S.G., Sendagire, H., Lamola, S., Kanya, M.R., Dorsey, G., Rosenthal, P.J.. 2004. Relationship between age, molecular markers, and response to sulphadoxine-pyrimethamine treatment in Kampala, Uganda. *Tropical Medicine and International Health*, May; **9** (5): 624-629.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Su, X., Kirkman, L.A., Fujioka, H., Wellems, T.E.. 1997. Complex polymorphisms in an approximately 330 kDa protein are linked to chloroquine-resistant *P. falciparum* Southeast Asia and Africa. *Cell*, Nov; **91** (5): 593-603.
- Surolia, N., Padmanaban, G.. 1991. Chloroquine inhibits heme-dependent protein synthesis in *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, Jun; **88**: 4786-4790.
- Talisuna, A.O., Kyosiimire-Lugemwa, J., Langi, P., Mutabingwa, T.K., Watkins, W., Van Marck, E., Egwang, T., D'Alessandro, U.. 2002. Role of the *pfcr* codon 76 mutation as a molecular marker for population-based surveillance of chloroquine (CQ)-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Ugandan sentinel sites with high CQ resistance. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Sep-Oct; **96** (5): 551-556.
- Takala, S.L., Escalante, A.A., Branch, O.H., Kariuki, S., Biswas, S., Chaiyaroj, S.C., Lal, A.A.. 2006. Genetic diversity in the Block 2 region of the merozoite surface protein 1 (MSP-1) of *Plasmodium falciparum*: Additional complexity and selection and convergence in fragment size polymorphism. *Infection, genetics and evolution*, Sep; **6** (5): 417-424.
- Teklehaimanot, A.. 2003. Report on malaria Mission to Sao Tome and Principe. Columbia University.
- Thaithong, S., Chan, S.W., Songsomboon, S., Wilairat, P., Seesod, N.; Sueblinwong, T., Goman, M., Ridley, R., Beale, G.. 1992. Pyrimethamine resistant mutations in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, Jun; **52** (2): 149-158.
- Thomas, S.M., Ndir, O., Dieng, T., Mboup, S., Wypij, D., Maguire, J.H., Wirth, D.F.. 2002. *In vitro* chloroquine susceptibility and PCR analysis of *pfcr* and *pfmdr1* polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Senegal. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, May; **66** (5): 474-480.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Trager, W., Jensen, J.B.. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, Aug; **193** (4254): 673-675.
- Tran, C.V., Saier, M.H.J.. 2004. The principal chloroquine resistance protein of *Plasmodium falciparum* is a member of the drug/metabolite transporter superfamily. *Microbiology*, Jan; **150** (Pt1): 1-3.
- 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.
- Triglia, T., Foote, S.J., Kemp, D.J., Cowman, A.F.. 1991. Amplification of the multidrug resistance gene *pfmdr1* in *Plasmodium falciparum* has arisen as multiple independent events. *Molecular Cell Biology*, Oct; **11** (10): 5244-5250.
- 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.
- Vander Jagt, D.L., Hunsaker, L.A., Campos, N.M.. 1986. Characterisation of a hemoglobin-degrading, low molecular weight protease from *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, Mar; **18** (3): 389-394.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Vasconcelos, K.F., Plowe, C.V., Fontes, C.J., Kyle, D., Wirth, D.F., Pereira da Silva, L.H., Zalis, M.G.. 2000. Mutations in *Plasmodium falciparum* Dihydrofolate Reductase and Dihydropteroate Synthase of Isolates from the Amazon Region of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Sep-Oct; **95** (5): 721-728.
- Viana, G.M.R., Machado, R.L.D., Calvosa, V.S.P., Póvoa, M.M.. 2006. Mutations in the *pfmdr1*, *cg2*, and *pfcr1* genes in *Plasmodium falciparum* samples from endemic malaria areas in Rondonia and Pará State, Brazilian Amazon Region. *Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro*, Dec; **22** (12): 2703-2711.
- Vieira, P.P., Alecrim, M.G., Silva, L.H., Gonzales-Jimenez, I., Zalis, M.G.. 2001. Analysis of the *Pfcr1* 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, M.U., Alecrim, M.G., Alecrim, W.D., da Silva, L.H., Sihuinha, M.M., Joy, D.A., Mu, J., Su, X.Z., Zalis, M.G.. 2004. *pfcr1* Polymorphism and the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* populations across the Amazon Basin. *Journal of Infectious Diseases*, Jul; **190** (2): 417-424.
- 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 semi-synthetic endoperoxide artemisone in vitro and in vivo. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Apr; **59** (4): 658-665.
- Viveiros, M., Jesus, A., Brito, M., Leandro, C., Martins, M., Ordway, D., Molnar, A.M., Molnar, J., Amaral, L.. 2005. Inducement and Reversal of Tetracycline Resistance in *Escherichia coli* K-12 and Expression of Proton Gradient-Dependent Multidrug Efflux Pump Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Aug; **49** (8): 3578-3582.
- Walker, D.J., Pitsch, J.L., Peng, M.M., Robinson, B.L., Peters, W., Bhisutthibhan, J., Meshnick, S.R.. 2000. Mechanisms of artemisinin resistance in the rodent malaria pathogen *Plasmodium yoelii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Feb; **44** (2): 344-347.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Walliker, D., Quakyi, I.A., Wellems, T.E., McCutchan, T.F., Szarfman, A., London, W.T., Corcoran, L.M., Burkot, T.R., Carter, R.. 1987. Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*, Jun; **236** (4809): 1661-1666.
- Ward, S.A., Bray, P.G.. 2000. Definitive proof for a role of *pfmdr 1* in quinoline resistance in *Plasmodium falciparum*. *Drug Resistance Update*, Apr; **3** (2): 80-81.
- Wellems, T.E., Panton, L.J., Gluzman, I.Y., do Rosario, V.E., Gwadz, R.W., Walker-Jonah, A., Krogstad, D.J.. 1990. Chloroquine resistance not linked to *mdr*-like genes in a *Plasmodium falciparum* cross. *Nature*, May; **345** (6272): 253-255.
- Wellems, T.E., Plowe, C.V.. 2001. Chloroquine-resistant malaria. *Journal of Infectious Diseases*, Sep; **184** (6): 770-776.
- Wellems, T.E., Walker-Jonah, A., Panton, L.J.. 1991. Genetic mapping of the chloroquine-resistance locus on *Plasmodium falciparum* chromosome 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, Apr; **88** (8): 3382-3386.
- Wessa, P.. 2007. Free Statistics Software, Office for Research Development and Education, version 1.1.21, URL <http://www.wessa.net/>.
- 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.. 2004. Antimalarial drug resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, Apr; **113** (4): 1084-1092.
- Wilson, C.M., Serrano, A.E., Wasley, A., Bogenschutz, M.P., Shankar, A.H., Wirth, D.F.. 1989. Amplification of a gene related to mammalian *mdr* genes in drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Science*, Jun; **244** (4909): 1184-1186.
- Wilson, C.M., Volkman, S.K., Thaithong, S., Martin, R.K., Kyle, D.E., Milhous, W.K., Wirth, D.F.. 1993. Amplification of *pfmdr 1* associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Molecular Biochemical Parasitology*, Jan; **57** (1): 151-160.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Wilson, R.J., Gardner, M.J., Feagin, J.E., Williamson, D.H.. 1991. Have Malaria Parasites Three Genomes? *Parasitology Today*, Jun; **7** (6): 134-136.
- Wongsrichanalai, C., Lin, K., Pang, L.W., Faiz, M.A., Noedl, H., Wimonwattrawatee, T., Laoboonchai, A., Kawamoto, F.. 2001. *In vitro* susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates from Myanmar to antimalarial drugs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Nov; **65** (5): 450-455.
- Wongsrichanalai, C., Pickard, A.L., Wernsdorfer, W.H., Meshnick, S.R.. 2002. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infectious Diseases*, Apr; **2** (4): 209-218.
- Wootton, J.C., Feng, X., Ferdig, M.T., Cooper, R.A., Mu, J., Baruch, D.I., Magill, A.J., Su, X.Z.. 2002. Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, Jul; **418** (6895): 320-323.
- World Health Organization. 1973. Chemotherapy of Malaria and Resistance to Antimalarials. Report of a WHO scientific group. WHO Technical Report Series, **529**. Geneva: WHO.
- World Health Organization 1997. Instructions for the Use of the *InVitro* micro-test kit for the assessment of the response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, mefloquine, quinine, amodiaquine, sulfadoxine/pyrimetamine and artemisinin. Document CTD/MAL/97.20. Geneva: WHO.
- World Health Organization. 2001 a. Antimalarial drugs combination therapy. Report of a WHO Technical Consultation WHO/CDS/RBM/2001.35. Geneva: WHO.
- World Health Organization. 2001 b. The use of antimalarial drugs. Report of an Informal Consultation. WHO/CDS/RBM/2001.33. Geneva: WHO.
- World Health Organization. 2005 a. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs: report on global monitoring: 1996-2004. WHO/HTM/MAL/2005.1103. Geneva: WHO.
- World Health Organization. 2005 b. World Malaria Report 2005. WHO/HTM/MAL/2005.1102. Geneva: WHO.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- World Health Organization. 2006 a. Malaria vector control and personal protection: report of a WHO study group. WHO technical report series, **936**. Geneva: WHO.
- World Health Organization. 2006 b. WHO briefing on *Malaria Treatment Guidelines* and artemisinin monotherapies. Geneva: WHO.
- World Health Organization. 2006 c. WHO guidelines for the treatment of malaria. HTM/MAL/2006.1108. Geneva: WHO.
- Wünsch, S., Sanchez, C.P., Gekle, M., Grosse-Wortmann, L., Wiesner, J., Lanzer, M.. 1998. Differential stimulation of the Na⁺/H⁺ exchanger determines chloroquine uptake in *Plasmodium falciparum*. *The Journal of Cell Biology*, Jan; **140** (2): 335-345.
- Xiao, S.H., Yao, J.M., Utzinger, J., Cai, Y., Chollet, J., Tanner, M.. 2004. Selection and reversal of *Plasmodium berghei* resistance in the mouse model following repeated high doses of artemether. *Parasitology Research*, Feb; **92** (3): 215-219.
- Xiao, S.H., You, J.Q., Gao, H.F., Mei, J.Y., Jiao, P.Y., Chollet, J., Tanner, M., Utzinger, J.. 2002. *Schistosoma japonicum*: effect of artemether on glutathione S-transferase and superoxide dismutase. *Experimental Parasitology*, Sep; **102** (1): 38-45.
- 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.
- Young, M.D., Moore, D.V.. 1961. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, May; **10**: 317-320.
- Zalis, M.G., Pang, L., Silveira, M.S., Milhous, W.K., Wirth, D.F.. 1998. Characterization of *Plasmodium falciparum* isolated from the Amazon region of Brazil: evidence for quinine resistance. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, May; **58** (5): 630-637.
- Zhai, Z.L., Jiao, P.Y., Mei, J.Y., Xiao, S.H.. 2002. Glutathione inhibits the antischistosomal activity of artemether. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, **20** (4): 212-215.

VI – ANEXOS

ANEXO 1

Principais soluções utilizadas neste trabalho:

Água tratada com DEPC

0,1 ml de DEPC por cada 100 ml de água

Autoclavar 15 minutos

Solução de crioconservação

28% Glicerol + 72% solução (4,2% Sorbitol + 0,65% NaCl)

-Esterilizar por filtração

-Guardar a 4°C

Tampão TBE (10X) – Tris 1 M, Ácido Bórico 1 M, EDTA 50 mM.

Tampão TE – Tris-HCL 10mM (pH 8.0), EDTA 0.1 mM (pH 8.0).

ANEXO 2

Preparação de meio de cultura e de RPMI incompleto:

Meio de cultura

Composição por litro de meio:

RPMI 1640 (Gibco™)	10,44 gr
HEPES 25mM (Sigma)	5,94 gr
Hipoxantina (Sigma)	0,05 gr
ALBUMAX II (Gibco™)	5 gr
NaHCO ₃ (Merck) 5%	38 ml

- Adicionar os reagentes a 1 litro de água milliQ
- Homogeneizar com agitador magnético durante 2 horas
- Esterilizar por filtração
- Guardar a 4°C

RPMI incompleto

Composição por litro:

RPMI 1640 (Gibco™)	10,44 gr
HEPES 25mM (Sigma)	5,94 gr
Hipoxantina (Sigma)	0,05 gr

- Adicionar os reagentes a 1 litro de água milliQ
- Aquecer no agitador com regulação térmica (sem ferver) durante 2 horas
- Esterilizar por filtração
- Guardar a 4°C até 3meses.

Preparação de eritrócitos não parasitados

A partir de dadores humanos saudáveis, isentos de qualquer tipo de medicação, colher 10 a 20 ml de sangue venoso em seringa de 20 ml e colocar em monovetes com EDTA. Após uma centrifugação a 2000 r.p.m. durante 5 minutos, eliminar o sobrenadante (plasma + glóbulos brancos) e adicionar RPMI incompleto repetir a centrifugação e lavagem 3 vezes, por fim adicionar ao *pellet* de eritrócitos um volume igual de meio de cultura.

A suspensão de eritrócitos, em concentração similar ao hematócrito normal (50%) é dividida em alíquotas de 1ml e conservado a 4°C, durante um período máximo de 15 dias.

ANEXO 3

REPÚBLICA DEMOCRÁTICA DE S. TOMÉ E PRÍNCIPE

MINISTÉRIO DA SAÚDE
CENTRO NACIONAL DE ENDEMIAS
(Unidade – Disciplina - Trabalho)

**AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO DE AVALIAÇÃO DE
SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* A ANTIMALÁRICOS**

Eu, _____

acompanhante de _____

Aceito livremente que seja incluído no estudo de avaliação de susceptibilidade *in vitro* à amodiaquina, artesunato e artemeter, para poder avaliar a eficácia destes antimaláricos, a cargo do Ministério da Saúde / Centro Nacional de Endemias em colaboração com o Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais / Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Lisboa, após ter-me sido explicado com pormenor os objectivos do estudo e os procedimentos necessários.

S. Tomé aos dias, ____ do mês de _____ de 2004.

Assinatura

ANEXO 4

QUESTIONÁRIO INDIVIDUAL

Ref. _____

Data _____

Nome _____

Idade _____ Sexo _____

Morada _____

Sintomas _____

Local de colheita _____

Antimalárico	Período (dias)	Última toma
quinino, artemisinina e derivados	> 7	
4-aminoquinoleínas	>14	
pirimetamina e/ou sulfamidas	>28	
mefloquina	>56	

Observações _____

ANEXO 5



Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais / Instituto de Higiene e Medicina Tropical / Universidade Nova de Lisboa / Portugal

Instituto Evandro Chagas / Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde / Brasil

AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO DE AVALIAÇÃO DE SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* AOS ANTIMALÁRICOS, ARTESUNATO E ARTEMETER.

Eu, _____

acompanhante de _____

Aceito livremente participar no estudo de avaliação de susceptibilidade *in vitro* aos antimaláricos, artesunato e artemeter, a cargo do Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais / Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Lisboa em colaboração com o Instituto Evandro Chagas de Belém, após ter-me sido explicado com pormenor os objectivos do estudo e os procedimentos necessários.

Tucuruí-Pará, ____ de _____ de 2005.

Assinatura

ANEXO 6

QUESTIONÁRIO INDIVIDUAL



Ref. _____

Data da colheita ____/ ____/ 2005

Local de colheita _____

Nome _____

Idade _____ Sexo _____

Endereço _____

Sintomas _____

Já teve malária antes? (S) (N) Tipo? (PV) (PF) (PV+PF) (PM)

Quantas? _____ Quando foi a ultima? _____

Tomou algum antimalárico? Sim () Não ()

Antimalárico	Período (dias)	Ultima toma
quinino, artemisinina e derivados	> 7	
4-aminoquinoleínas	>14	
pirimetamina e/ou sulfamidas	>28	
mefloquina	>56	

Parasitémia _____ /mm³ _____ %

ANEXO 7

Primers e condições de PCR utilizados na sequenciação

Gene	Fragmento	Primers	sequência (5'→3')	Região alvo (pb)	Condições PCR
<i>pfATPase6</i>	1F/2R	Forward	CATACGATGTTGAGGATGTAC	28-722 (684)	94°C, 3'; 94°C, 30'; 53°C, 45'; 72°C, 60'; 72°C, 10';
		Reverse	GACCTATTTTCAGTCTTCATACC		
	3F/4R	Forward	GAGAATCCTGTTTCAGTTGAC	558-1308 (740)	94°C, 3'; 94°C, 30'; 52°C, 45'; 72°C, 60'; 72°C, 10';
		Reverse	ATCCTTCTTCTCCATCATCC		
	5F/6R	Forward	ACCGTGTTTCATTTGTTTAGAG	1138-1892 (754)	94°C, 3'; 94°C, 30'; 53°C, 45'; 72°C, 60'; 72°C, 10';
		Reverse	CCATTTGTTGTTGCCTGAGC		
	7F/8R	Forward	AATCACCAAGGGGTATCAAC	1771-2467 (696)	94°C, 3'; 94°C, 30'; 52°C, 45'; 72°C, 60'; 72°C, 10';
		Reverse	ACGTATAACCAGCCATATGG		
	9F/10R	Forward	TTCAAAATATGGGAAAAAGAGCA	2285-3078 (793)	94°C, 3'; 94°C, 30'; 53°C, 45'; 72°C, 60'; 72°C, 10';
		Reverse	TGTTGCTGGTAATCCGTCAG		
<i>pfprt</i>	1F/2R	Forward	GTTAATAATAAATACACGCAGTC	1-1125 (658)	94°C, 3'; 94°C, 30'; 51°C, 45'; 72°C, 60'; 72°C, 10';
		Reverse	CAACAATAATAACTGCTCCGAG		
	3F/4R	Forward	TCATAGGTCTTACAAGAACTAC	812-1965 (482)	94°C, 3'; 94°C, 30'; 51°C, 45'; 72°C, 60'; 72°C, 10';
		Reverse	CATACCAAGACCACAATTCTC		
	5F/6R	Forward	TTCCAATTGTTCACTTCTTGTC	1580-3236 (669)	94°C, 3'; 94°C, 30'; 53°C, 45'; 72°C, 60'; 72°C, 10'
		Reverse	CTTATAAAGTGTAATGCGATAGC		
<i>pfSod1</i>	1F/2R	Forward	CATTGCCCAAATTAAGTACGC	10-554 (544)	94°C, 3'; 94°C, 30'; 53°C, 45'; 72°C, 60'; 72°C, 10'
		Reverse	CAATTTACTAGGTTCCACCAAG		

ANEXOS

<i>pfubp-1</i>	1F/2R	Forward	CACACGTCATAATTACAACCTCTC	295-1054 (759)	94°C, 3'; 94°C, 30"; 53°C, 45"; 72°C, 60"; 72°C, 10';	40 ciclos
		Reverse	TTAACAAGACGTCCATTTTGATC			
	3F/4R	Forward	CTCTTCCTATCGTCATACAC	859-1668 (809)	94°C, 3'; 94°C, 45"; 51°C, 45"; 72°C, 60"; 72°C, 10';	40 ciclos
		Reverse	TTTGTTCCACATTTTGTTCACC			
	5F/6R	Forward	CATTTTGCTAACCTAGATGATG	1553-2242 (689)	94°C, 3'; 94°C, 45"; 51°C, 45"; 72°C, 60"; 72°C, 10';	40 ciclos
		Reverse	TGATCGGATATTCTATTTTGCG			
	7F/8R	Forward	AGTACCTCCAAGTATGAAGAAC	2135-2858 (723)	94°C, 3'; 94°C, 30"; 53°C, 45"; 72°C, 60"; 72°C, 10';	40 ciclos
		Reverse	AACCGTCCTAACCTTATTATTC			
	9F/10R	Forward	AAAGAAATTATCCACATCCACC	2703-3343 (640)	94°C, 3'; 94°C, 45"; 51°C, 45"; 72°C, 60"; 72°C, 10';	40 ciclos
		Reverse	ATAATTTTCATTCCACTTTAAGGC			
<i>pfgst</i>	1F/2R	Forward	GATGCAAGGGGTAAAGCTG	30-633 (603)	94°C, 3'; 94°C, 30"; 52°C, 30"; 72°C, 60"; 72°C, 10'	45 ciclos
		Reverse	GTATACACTTTCTTTTCTATTAG			
<i>pfctcp</i>	1F/2R	Forward	CAAATGATGAAGTATGTTCCG	37-485 (448)	94°C, 3'; 94°C, 30"; 52°C, 30"; 72°C, 60"; 72°C, 10'	45 ciclos
		Reverse	CGTGGTGTTATTTCTTCTCC			
<i>pftrx1</i>	1F/2R	Forward	CATATGTAGGAAGAGAAGCTCC	7-585 (578)	94°C, 3'; 94°C, 30"; 54°C, 45"; 72°C, 60"; 72°C, 10';	40 ciclos
		Reverse	CAACTTTGATAAATATTCACCTAAC			
<i>pftrx2</i>	1F/2R	Forward	GTGCAGGAGCAATTTTTTCGG	17-619 (602)	94°C, 3'; 94°C, 30"; 54°C, 45"; 72°C, 60"; 72°C, 10';	45 ciclos
		Reverse	CTATTAACGATTCGGTAGTTG			
<i>pfygc5</i>	1F/2R	Forward	GACGAAGAAGGAGAAGTAGAAG	750-882 (132)	94°C, 3'; 94°C, 30"; 58°C, 45"; 72°C, 60"; 72°C, 10';	40 ciclos
		Reverse	GACATATTGTATCATTGTGACG			

ANEXO 8

Primers e condições de PCR para os polimorfismos analisados

Gene	Primers	sequência (5' → 3')	Região alvo (pb)	Condições de PCR		
<i>pfmdr1</i>	<i>N86Y</i>	Forward	GTATGTGCTGTATTATCAGGAGGA	183-504 (321)	94°C, 3'; 94°C, 60"; 58°C, 30"; 72°C, 60";	
		Reverse	CGTACCAATTCCTGAACTCAC			35 ciclos
	<i>F184Y</i>	Forward	CAAGTGAGTTCAGGAATTGGTAC	480-710 (230)	94°C, 3'; 94°C, 30"; 53°C, 45"; 72°C, 60"; 72°C, 10'	
		Reverse	GCCTCTTCTATAATGGACATGG			45 ciclos
	<i>N1042D</i>	Forward	GTAATGCAGCTTTATGGG	3075-3263 (188)	94°C, 3'; 94°C, 30"; 50°C, 30"; 68°C, 60";	
		Reverse	TCTGAATCTCCTTTTAAGGAC			45 ciclos
	<i>D1246Y</i>	Forward	CTACAGCAATCGTTGGAGAAA	3466-3974 (508)		
		Reverse	GCTCTAGCTATAGCTATTCTC			
	<i>pfcr1</i>	<i>K76T</i>	Forward	GATGGCTCACGTTTAGGTGG	267-538 (271)	94°C, 3'; 94°C, 5"; 53°C, 45"; 72°C, 45"; 72°C, 3'
			Reverse	CTTTTGAATTTCCCTTTTATTTC		
		<i>75N</i>	<i>Pfcr1</i> 75F	GATGGCTCACGTTTAGGTGG	267-426 (163)	94°C, 3'; 94°C, 45"; 60°C, 45"; 72°C, 30"; 72°C, 3'
			<i>Pfcr1</i> 75NR	TAAAGTTCTTTTAGCAAAAATTGT _a T _i		
<i>75E</i>		<i>Pfcr1</i> 75F	GATGGCTCACGTTTAGGTGG			
		<i>Pfcr1</i> 75ER	TAAAGTTCTTTTAGCAAAAATTGT _f T _e			
<i>pf sod1</i>	<i>D84G</i>	Forward	CATTGCCCAAATTAAGTACGC	10-554 (544)	94°C, 3'; 94°C, 30"; 53°C, 45"; 72°C, 60"; 72°C, 10'	
		Reverse	CAATTTACTAGGTTCCACCAAG			45 ciclos

ANEXOS

<i>pfATPase6</i>	R37K	Forward	CGTTGAACTTATTATATCTTTGTC	-76-255 (331)	94°C, 3'; 94°C, 30"; 51°C, 30"; 72°C, 45"; 72°C, 10'	40 ciclos
		Reverse	TTTCATATCTAATAAAGTTAACACG			
	G639D	Forward	TATAGGAGAAAATACATTTGA _t CATG	1889-2055 (166)	94°C, 3'; 94°C, 30"; 51°C, 30"; 72°C, 30"; 72°C, 10'	35 ciclos
		Reverse	ACATTCATTTCTCCAAGAAGAA			
	S769N	Forward	ACTTAGCTTTGCTTATAAAAAcTTAA	2279-2551 (272)	94°C, 3'; 94°C, 45"; 54°C, 45"; 72°C, 45"; 72°C, 3'	40 ciclos
		Reverse	AATTATCCTTTTCATCATCTCC			
	T2694A*	Forward	GAATTGTTTTCTGTAGAACTGAAC	2650-2832 (182)	94°C, 3'; 94°C, 45"; 54°C, 45"; 72°C, 45"; 72°C, 3'	40 ciclos
		Reverse	ATCTGATGCTTCTTTAGCTACC			

Legenda: Na sequência dos *primers* os nucleótidos a letra minúscula representam as bases mutadas; * Referente a um nucleótido não ao número dum aminoácido.

ANEXO 9

Primers utilizados no PCR em tempo real

Gene	Primer	sequência (5'—>3')	Conc. (nM)	Tamanho do amplicão (pbs)
<i>pfβactinaI</i>	Forward	CGGATCAGGTAATGTAAAAGC	300	90
	Reverse	CCTGGATTCTTTGGTCTTCC	300	
<i>pfmdr1</i>	Forward	CAAGTGAGTTCAGGAATTGGTAC	300	230
	Reverse	GCCTCTTCTATAATGGACATGG	300	
<i>pfsod1</i>	Forward	GATTACAGAAATGACAGAGCATC	300	56
	Reverse	CAATTTACTAGGTTCCACCAAG	600	
<i>pfgst</i>	Forward	GATGCAAGGGGTAAAGCTG	300	150
	Reverse	GGTACTTGCTCAAAAGGAG	600	
<i>pftctp</i>	Forward	CAAATGATGAAGTATGTTCCG	300	55
	Reverse	GGTACTTCAAATGGATCTTGTTG	600	
<i>pftrx1</i>	Forward	CATATGTAGGAAGAGAAGCTCC	300	53
	Reverse	ATCTGCAAAAACCTGCTTCAGCC	600	
<i>pftrx2</i>	Forward	CGCTAGTGACAAAGAAGGC	300	60
	Reverse	ACAAACAACAGTATTTCTGACC	600	
<i>pfprx</i>	Forward	GAATCTATAGGATGGACATATG	300	207
	Reverse	GGACACATATTGTGCCTGC	600	
<i>pfgr</i>	Forward	GCAGTGGCCTTAAAAATGAATG	300	68
	Reverse	GCTGTAGGATGTATAGGTATGG	300	
<i>pfgpx</i>	Forward	CGTCGATAAAAATGGAGAAGTTG	300	56
	Reverse	CTAACGGGTTTGTGTTTGGGTG	600	
<i>pfATPase6</i>	Forward	GCTGCATTCATTAGTTTCGTG	300	126
	Reverse	GCCATACACCTACGGCAGC	600	

Legenda: Conc. - Concentração de cada *primer* para a qual a eficiência da reacção é máxima.

ANEXO 10

Resultados da análise dos polimorfismos nos isolados de *P. falciparum* do Ruanda pesquisados por PCR ou PCR-RFLP, isolados ordenados pelos valores de IC50s da dihidroartemisinina

IC50 DHA (nM)	IC50 AMD (nM)	<i>pfsod1</i>			<i>pfprt</i>				<i>pfmdr1</i>				<i>pfATPase6</i>	<i>pfygc5</i>
		84	75	76	86	184#	1042	1246	2694*					
0,3	3,1	D	E	T	Y	Y	N	D	A	3				
0,3	8,3	D	E	T	Y	Y	N	Y	T/A	5				
0,4	21,8	D	E	T	Y	Y	N	Y	A	6				
0,5	4,5	D	E	T	Y	F	N	D	A	M				
0,6	6,3	D	E	T	Y		N	D/Y	A	6				
0,6	77,9	D	E	T	Y		N	Y	T/A	M				
0,8	4,5	D	E	T	Y		N	D	T/A	M				
0,8	6,2	D	E	T	Y		N	D/Y	T/A	4				
0,9	11,3	D	E	T	Y		N	Y	T	6				
1,0	11,2	D	E	T	Y		N	D	T	8				
1,2	19,3	D	E	T	Y		N	D/Y	T/A	M				
1,2	14,0	D	E	T	Y		N	D/Y	T/A	M				
1,3	13,2	D	E	T	Y		N	D/Y	A	6				
1,3	16,8	D	E	T	Y		N	D/Y	A	1				
1,3	9,9	D	E	T	Y		N	D	A	8				
1,4	4,6	D	E/N	T	Y		N	D/Y	A	6				
1,6	8,1	D	E	T	Y		N	D	A	4				
1,6	11,8	D	E/N	T	Y		N	D/Y	T	M				
1,6	22,2	D	E	T	Y		N	Y	A	2				
1,9	7,6	D	E	T	Y		N	D	T	6				
1,9	14,9	D	E	T	Y		N	Y	A	3				
2,0	10,0	D	E/N	T	Y		N	Y	T	3				
2,0	10,7	D	E	T	Y		N	D/Y	A	M				
2,1	6,7	D	E	T	Y/N		N	D	T	3				
2,3	10,6	D	E/N	T	Y		N	D/Y	T	4				
2,4	13,5	D	E	T	N		N	Y	A	3				
2,4	19,2	D	E	T	Y		N	D	T	M				
2,5	20,4	D	E/N	T	Y		N	D/Y	A	M				
2,5	25,1	D	E	T	Y		N	D	T/A	1				
2,6	19,8	D	E	T	Y		N	D/Y	T	5				
2,6	34,5	D	E/N	K/T	Y		N	Y	T/A	M				
2,7	15,4	D	E	T	Y		N	D	A	M				
2,8	25,3	D	E	T	Y		N	D/Y	A	1				
2,8	17,3	D	E	T	Y		N	D/Y	T	6				
2,9	34,2	D	E	T	Y		N	Y	A	1				
3,1	14,0	D	E	T	N		N	D	T	3				
3,1	16,0	D	E	T	Y		N	Y	A	6				
3,1	14,2	D	E	T	N		N	Y	A	3				
3,2	2,1	D	E/N	T	Y		N	D/Y	A	1				
3,2	37,5	D	E	T	Y		N	Y	A	3				
3,2	19,1	D	N	T	Y		N	D/Y	T/A	M				
3,3	2,5	D	E	T	N		N	D	A	M				
3,4	32,7	D	E	T	Y		N	Y	A	M				
3,5	26,8	D	E	T	Y		N	D/Y	A	M				
3,5	18,1	D	E	T	Y		N	D	T/A	1				
3,6	11,2	D	E/N	T	N		N	D	A	7				
3,7	31,2	D	E/N	K/T	Y		N	Y	A	1				
3,8	6,3	D	E	T	Y		N	D	T/A	M				
3,8	121,1	D	E	T	Y		N	D	A	1				
4,1	12,7	D	E	T	Y		N	Y	T	4				

ANEXOS

4,2	16,9	D	E	T	Y	N	Y	A	1
4,3	28,7	D	E	T	Y	N	D/Y	T/A	2
4,4	10,3	D	E/N	K/T	Y	N	Y	T/A	1
4,5	10,8	D	E	T	N/Y	N	D/Y	A	M
4,6	54,4	D	E/N	T	Y	N	Y	A	1
4,7	35,0	D	E/N	T	Y	N	D	T/A	M
4,8	16,5	D	E	T	Y	N	D	A	4
4,9	36,6	D	E/N	K/T	Y	N	D/Y	T/A	M
5,2	15,9	D	E	T	Y	N	D	A	2
5,2	34,0	D	E	T	Y	N	D	T/A	M
5,4	25,2	D	E	T	Y	N	Y	T	5
5,5	76,1	D	E/N	K/T	Y	N	Y	T	M
5,9	28,6	D	E/N	K/T	Y	N	D/Y	A	M
6,2	35,7	D	E	T	Y	N	Y	T/A	M
6,4	91,7	D	E	T	Y	N	Y	T/A	M
7,3	34,5	D	E	T	Y	N	D	A	2
7,3	22,7	D	E	T	Y	N	D	T	M
7,6	16,5	D	E	T	Y/N	N	D/Y	T	5
7,6	20,7	D	E	T	Y/N	N	D/Y	A	7
8,8	16,8	D	E	T	N	F	D	T	1
9,6	53,2	D	E/N	T	Y	Y	D/Y	A	7
10,1	34,9	D	E	T	Y	Y	Y	A	4
14,3	44,7	D	E/N	T	Y	Y	D	A	M
-	-	D	E	T	Y	N	Y	T/A	3
-	-	D	E	T	Y	N	Y	A	M
-	-	D	E	T	Y	N	D/Y	A	3
-	-	D	E	T	Y	N	D/Y	T	4
-	-	D	E	T	Y	N	Y	T/A	M
-	-	D	E	T	Y	N	D	A	M
-	-	D	E	T	Y/N	N	D	A	M
-	-	D	E/N	T	Y	N	D	T	7
-	-	D	E	T	Y	N	Y	T/A	M
-	-	D	E	T	Y	N	Y	A	7
-	-	D	E	T	Y	N	D/Y	A	1
-	-	D	E	T	Y	N	D	T/A	M
-	-	D	E	T	N	N	D	T	3
-	-	D	N	T	N	N	D	A	M
-	-	D	E	T	Y	N	Y	A	3
-	-	D	E	T	Y/N	N	Y	T/A	M
-	-	D	E	T	N	N	D	T/A	M
-	-	D	E	T	Y	N	D/Y	T	3
-	-	D	E/N	K/T	Y	N	D/Y	A	M
-	-	D	E	T	Y	N	Y	A	M
-	-	D	E/N	T	Y	N	D	T	8
-	-	D	E	T	Y	N	D/Y	A	5
-	-	D	E	T	N	N	Y	A	7
-	-	D	E/N	T	Y	N	D/Y	T/A	2
-	-	D	E	T	Y/N	N	D	A	5

Legenda:

O sombreado cinzento representa os isolados seleccionados para a pesquisa de polimorfismos por sequenciação e cálculo do nº de cópias, 4 com elevada sensibilidade e 4 com baixa sensibilidade, relativamente à dihidroartemisinina.

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 – Classificação dos alelos de acordo com o seu tamanho, onde 1 representa o alelo de menor tamanho e 8 o de tamanho maior;

M – Mistura de dois alelos de tamanho diferente;

- Polimorfismo *pfmdr1*F184Y pesquisado por sequenciação do DNA;

***** - Referente a um nucleótido.

DHA – dihidroartemisinina; AMD – amodiaquina

ANEXO 11

Resultados da análise dos polimorfismos nos isolados de *P. falciparum* da RDSTP, pesquisados por PCR ou PCR-RFLP, isolados ordenados pelos valores de IC50s do artemeter

IC50 ATM (nM)	IC50 ARS (nM)	IC50 AMD (nM)	<i>pfsod1</i>			<i>pfmdr1</i>				<i>pfATPase6</i>	<i>pfygc5</i>
			84	75	76	86	184#	1042	1246	2694*	
0,2	-	36,1	D	E	T	Y		N	D/Y	A	2
0,2	0,1	10,5	D	E	T	Y		N	D	T	2
0,2	0,02	15,3	D	E	T	Y	Y	N	D	A	7
0,2	0,02	13,6	D	E	T	Y		N	D	T	8
0,2	0,1	37,0	D	E	T	Y		N	D	A	8
0,2	1,1	23,2	G	E	T	Y	F	N	D	A	6
0,2	0,02	17,2	D	E	T	N		N	D	A	2
0,2	0,02	11,5	D	E	T	Y/N		N	D/Y	A	M
0,2	0,02	4,7	D	E	T	Y		N	D	A	M
0,2	0,02	7,1	D	E	T	Y	F	N	D	T	M
0,2	0,06	-	D	E	T	Y		N	D/Y	T	8
0,2	0,02	1,6	D	E	T	Y		N	D	A	6
0,2	0,02	1,0	D	E	T	Y	F	N	D	A/T	7
0,2	0,02	4,7	D	E	T	Y		N	D	T	6
0,3	-	3,7	D	E	T	Y		N	D	A/T	6
0,3	-	-	D	E	T	Y		N	D/Y	A	M
0,3	0,1	1,7	D	E	T	Y/N		N	D	A/T	M
0,3	3,4	51,6	D	E	T	Y/N		N	D	A	7
0,3	0,04	17,8	D	E	T	Y		N	D	T	7
0,3	0,02	1,5	D	E	T	Y		N	D	A	7
0,3	0,02	6,0	D	E	T	Y		N	D	A/T	M
0,3	0,4	27,9	D	E	T	Y		N	D	A	4
0,5	0,1	34,4	D	E	T	Y		N	D/Y	A/T	M
0,5	1,6	39,9	D	E	T	Y		N	D/Y	T	M
0,5	0,7	9,1	D	E	T	Y		N	D	T	8
0,5	0,02	8,9	D	E	T	Y		N	D	A	8
0,6	0,02	9,2	D	E	T	Y		N	D	A	6
0,6	0,1	38,2	D	E	T	Y		N	D	A	8
0,6	0,1	29,3	D	E	T	Y		N	D	T	7
0,6	0,1	37,5	D	E	T	Y		N	D	A/T	7
0,7	-	10,6	D	E	T	Y		N	Y	A	8
0,7	0,3	1,2	D	E	T	Y		N	D	T	5
0,8	0,1	-	D	E	T	Y/N		N	D	A	7
0,8	0,1	11,9	D	E	T	Y		N	D	A	M
0,9	0,2	4,2	D	E	T	Y		N	D	T	1
1,0	-	-	D	E	T	N		N	D	A	8
1,0	0,1	13,8	D	E	T	Y		N	D	A	2
1,1	0,3	26,4	D	E	T	Y		N	D/Y	A	2
1,4	-	-	D	E	T	Y		N	D	A	7
1,4	-	126,1	D	E	T	Y		N	D	A	6
1,4	2,0	18,3	D	E	T	Y		N	D	A	M
1,5	0,1	32,0	D	E	T	Y		N	D	A	2
1,7	-	-	D	E	T	N		N	D	A	5

ANEXOS

1,8	0,6	42,7	G	E	T	Y		N	Y	T	7
2,0	0,1	11,5	D	E	T	Y		N	D	A/T	M
2,1	0,5	132,8	D	E	T	Y		N	D	A/T	M
2,1	0,6	3,9	D	E	T	Y		N	D	T	7
2,3	0,5	33,8	D	E	T	Y	F	N	D	T	M
4,1	0,4	129,3	D	E	T	Y	Y	N	D	A	6
6,7	1,7	59,6	D	E	T	Y	F	N	D	T	9
12,5	9,0	156,0	D	E	T	Y/N	F	N	D	T	7
-	-	1,0	D	E	T	Y		N	D/Y	T	8
-	-	1,0	D	E	T	Y		N	D	A	7
-	-	1,0	D	E	T	N		N	D	A	8
-	-	1,0	D	E	T	Y/N		N	D	T	8
-	-	30,3	G	E	T	Y/N		N	D	A	9
-	-	37,8	D	E	T	Y		N	D	T	6
-	-	39,9	G	E	T	Y		N	D	A	6
-	-	44,0	D	E	T	Y		N	D/Y	A	6
-	-	-	D	E	T	Y		N	D	A	6
-	-	-	D	E	T	Y		N	D/Y	A	2
-	-	-	D	E	T	Y		N	D/Y	T	6
-	-	-	D	E	T	Y/N		N	D	T	M
-	-	-	D	E	T	N		N	D	T	3
-	-	-	D	E	T	Y/N		N	Y	A	6
-	-	-	D	E	T	Y		N	D	A	2
-	-	-	D	E	T	Y/N		N	D	A	M
-	-	-	D	E	T	Y/N		N	D	A/T	M
-	-	-	D	E	T	Y		N	D	A	6

Legenda:

O sombreado cinzento representa os isolados seleccionados para a pesquisa de polimorfismos por sequenciação e cálculo do nº de cópias, 4 com elevada sensibilidade e 4 com baixa sensibilidade, relativamente ao artemeter.

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 – Classificação dos alelos de acordo com o seu tamanho, onde 1 representa o alelo de menor tamanho e 9 o de tamanho maior;

M – Mistura de dois alelos de tamanho diferente;

- Polimorfismo *pfmdr1*F184Y pesquisado por sequenciação;

***** - Referente a um nucleótido.

ATM – artemeter; ARS – artesunato; AMD – amodiaquina.

ANEXO 12

Resultados da análise dos polimorfismos nos isolados de *P. falciparum* do Brasil, pesquisados por PCR ou PCR-RFLP, isolados ordenados pelos valores de IC50s do artesunato.

IC50 ARS (nM)	IC50 ATM (nM)	<i>pfsod1</i>		<i>pfprt</i>		<i>pfmdr1</i>			<i>pfATPase6</i>				<i>pfygc5</i>
		84	75	76	86	1042	1246	37	639	769	2694*		
0,1	0,2	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	2	
0,1	0,3	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
0,2	0,5	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
0,2	0,6	D	N	T	N	N	Y	G	G	S	A	1	
0,2	0,8	D	N	T	N	D/N	Y	G	G	S	A	1	
0,2	1,0	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
0,2	1,5	D	N	T	N	D	Y	A	G/A	S	A/T	M	
0,3	3,0	D	N	T	N	N	Y	G	G	S	A	1	
0,3	2,2	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
0,3	1,5	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
0,4	1,0	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	2	
0,4	1,4	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
0,4	2,1	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
0,4	2,3	D	N	T	N	N	Y	G	G	S	A	1	
0,5	2,0	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
0,5	3,4	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
0,5	3,2	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
0,5	0,5	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
0,5	0,6	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
0,5	0,9	D	N	T	N	D	Y	A	A	S	T	1	
0,5	1,8	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
0,6	2,8	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
0,7	3,0	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
0,7	4,2	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
0,7	2,0	D	N	T	N	D	Y	A	G/A	S	A/T	1	
0,9	2,2	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
0,9	2,7	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
0,9	1,8	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
1,0	5,1	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
1,1	3,8	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
1,2	3,6	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
1,3	2,4	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
1,3	3,4	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
1,3	4,5	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
1,3	4,8	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
1,3	3,5	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
1,4	4,4	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	2	
1,5	3,2	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
1,5	5,6	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
1,5	6,5	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
1,6	8,2	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
1,6	5,3	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1	
1,7	3,8	D	N	T	N	D	Y	G	G/A	S	A/T	2	

ANEXOS

1,7	4,3	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	2
1,7	5,5	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1
1,8	3,5	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1
2,0	5,2	D	N	T	N	N	Y	G	G	S	A	1
2,1	4,3	D	N	T	N	D	Y	A	A	S	T	1
2,1	8,5	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1
2,4	9,8	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1
2,8	22,5	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1
3,1	12,6	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1
3,4	10,4	D	N	T	N	D	Y	A	A	S	T	1
4,8	22,1	D	N	T	N	N	Y	G	G	S	A	1
4,8	23,2	D	N	T	N	D	Y	A	A	S	T	1
4,9	23,0	D	N	T	N	D	Y	G	G	S	A	1
-	-	D	N	T	N	D	Y	A	G/A	S	A/T	1
-	-	D	N	T	N	D	Y	A	G/A	S	A	1
-	-	D	N	T	N	D	Y	A	A	S	T	1
-	-	D	N	T	N	D	Y	-	G	S	A	1
-	-	D	N	T	N	N	Y	-	-	S	A	1
-	-	D	N	T	N	D/N	Y	-	-	S	A	1
-	-	D	N	T	N	D	Y	-	-	S	A	1
-	-	D	N	T	N	D	Y	-	-	S	A	1
-	-	D	N	T	N	D	Y	-	-	S	A	1

Legenda:

O sombreado cinzento representa os isolados seleccionados para a pesquisa de polimorfismos por sequenciação e cálculo do nº de cópias, 4 com elevada sensibilidade e 4 com baixa sensibilidade, relativamente ao artesunato.

1, 2 – Classificação dos alelos de acordo com o seu tamanho, onde 1 representa o alelo de menor tamanho e 2 o de tamanho maior;

M – mistura de dois alelos de tamanho diferente;

* - Referente a um nucleótido.

ATM – artemeter; ARS – artesunato.

VII – PUBLICAÇÕES

A partir do conjunto de resultados, apresentados nesta dissertação, foram efectuadas apresentações em congressos e foram publicados os seguintes artigos científicos:

Ferreira, I.D., Martinelli, A., Rodrigues, L.A., do Carmo, E.L., do Rosário, 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*. *Tropical Medicine and International Health*, Mar; **13** (2): 199-207.

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

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).

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.

