



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS PROFISSIONAL

IDENTIFICAÇÃO DAS MUTAÇÕES K76T E C350R ASSOCIADAS À EVOLUÇÃO DA
RESISTÊNCIA DO *PLASMODIUM FALCIPARUM* À CLOROQUINA EM ISOLADOS DO
ESTADO DO PARÁ, REGIÃO AMAZÔNICA BRASILEIRA

EDGARD FERNANDO DE MIRANDA PEREIRA NETO

Belém-Pará
2017

EDGARD FERNANDO DE MIRANDA PEREIRA NETO

IDENTIFICAÇÃO DAS MUTAÇÕES K76T E C350R ASSOCIADAS À EVOLUÇÃO DA
RESISTÊNCIA DO *PLASMODIUM FALCIPARUM* À CLOROQUINA EM ISOLADOS DO
ESTADO DO PARÁ, REGIÃO AMAZÔNICA BRASILEIRA

Defesa de Mestrado do Programa de Pós-
Graduação em Análises Clínicas Profissional
do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Pará como requisito
para obtenção do grau de Mestre em Análises
Clínicas Profissional.

Orientadora: Dra. Giselle Maria Rachid Viana
Co-orientadora: Dra. Andrea Luciana Soares
da Silva

Belém-Pará
2017

EDGARD FERNANDO DE MIRANDA PEREIRA NETO

IDENTIFICAÇÃO DAS MUTAÇÕES K76T E C350R ASSOCIADAS À EVOLUÇÃO DA
RESISTÊNCIA DO *PLASMODIUM FALCIPARUM* À CLOROQUINA EM ISOLADOS DO
ESTADO DO PARÁ, REGIÃO AMAZÔNICA BRASILEIRA.

Defesa de Mestrado do Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Análises Clínicas
Profissional do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito
para obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas Profissional

Orientadora: Dra. Giselle Maria Rachid Viana
Laboratório de Pesquisas Básicas em Malária
Instituto Evandro Chagas - IEC/SVS/MS

Co-Orientadora: Dra. Andrea Luciana Soares da Silva
Laboratório de Genética Médica
Universidade Federal do Pará

Banca Examinadora: Dra. Ana Maria Ventura
Laboratório de Ensaios Clínicos em Malária
Instituto Evandro Chagas - IEC/SVS/MS

Dr. Eduardo José de Melo Santos
Laboratório de Genética Médica
Universidade Federal do Pará

Dra. Izis Monica Carvalho Sucupira
Laboratório de Pesquisas Básicas em Malária
Instituto Evandro Chagas - IEC/SVS/MS

Dra. Ana Cecília Feio dos Santos (suplente)
Laboratório de Pesquisas Básicas em Malária
Instituto Evandro Chagas - IEC/SVS/MS

DEDICATÓRIA

A Deus, Mestre maior, que enche nosso caminho de luz para que estejamos sempre preparados para receber novas conquistas.

Aos meus pais, Edgar Gondim Pereira (*in memoriam*) e Raimunda das Graça Mendes Pereira, minha eterna gratidão por terem me proporcionado um alicerce sólido com suas lições de caráter, educação, paciência e, principalmente, amor incondicional.

A minha esposa Janne Mônica Barreto Pereira, meus amados filhos, Illgner Barreto de Lima, Danielle Caroline Barreto Pereira e Daniel Fernando Barreto Pereira e amada neta, Fernanda Victória Pereira Leite por todo o amor, compreensão e incentivo para alcançar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho só foi realizado graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas e instituições. Assim, manifesto minha eterna gratidão a todos e em particular:

A minha querida orientadora, Dra. Giselle Maria Rachid Viana, por compartilhar seus conhecimentos e por todas as lições de serenidade, generosidade e, principalmente, por me inspirar cientificamente e exemplo de profissionalismo na pesquisa e dedicação à Saúde Pública, agradeço a oportunidade de conviver todos esses anos e desfrutar de seus ensinamentos e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação MACPRO, do Instituto Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (UFPA/ICB/MACPRO) pela oportunidade do aprendizado.

Ao Diretor do Instituto Evandro Chagas (IEC/SVS/MS), Dr. Pedro Fernando Vasconcelos, pelo apoio e oportunidade para a realização deste trabalho.

A Dra. Giselle Maria Rachid Viana, Chefe da Seção de Parasitologia do IEC/SVS/MS, pela colaboração e incentivo para execução dessa pesquisa.

Aos funcionários da Seção de Parasitologia do IEC/SVS/MS, por todo respeito que sempre dedicaram a mim.

Aos grandes amigos (Danielle Barbosa, José Maria Nascimento e José Mário Peres) do Laboratório de Pesquisas Básicas em Malária da Seção de Parasitologia do IEC/SVS/MS, em especial a M.Sc. Nathália Nogueira Chamma Siqueira, pelo carinho, respeito e paciência a mim dedicados nos momentos de convivência e muitos outros que teremos juntos. Minha eterna gratidão.

Aos grandes mestres do Programa de Pós-Graduação MACPRO, do Instituto Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (UFPA/ICB/MACPRO), que contribuíram para minha formação profissional, como exemplos de dedicação ao ensino, pesquisa e à Saúde Pública.

A Dra. Andrea Luciana Soares da Silva da Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, laboratório de genética médica (UFPA/ICB/LGM), que viabilizou a realização desse trabalho, compartilhando seus conhecimentos e pela enorme chance que me foi oferecida de trabalhar em conjunto com grandes cientistas dessa renomada instituição de ensino e pesquisa.

A Dra. Lise Musset, do Laboratório de Parasitologia do Instituto Pasteur da Guiana Francesa, pela oportunidade de celebração de projeto colaborativo entre Instituto Evandro Chagas e Instituto Pasteur, que possibilitou a realização dessa dissertação.

Ao Professor M.Sc Ednei Amador, pelas orientações pertinentes quanto às análises estatísticas do estudo.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Ana Maria Ventura, Dra. Izis Sucupira, Dr. Eduardo José de Melo Santos e Dra. Ana Cecília Feio dos Santos, pela receptividade e paciência em compartilhar seus conhecimentos sobre Ensaios Clínicos, Resistência, Transmissão e Genética Médica.

SUMÁRIO

	RESUMO.....	08
	ABSTRACT.....	09
1	INTRODUÇÃO	10
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	10
1.2	TRANSMISSÃO DA MALÁRIA.....	10
1.2.1	Vetores.....	10
1.2.2	Agentes Etiológicos.....	11
1.2.3	Ciclo Evolutivo.....	11
1.3	MALÁRIA NA REGIÃO AMAZÔNICA.....	13
1.3.1	Malária no Estado do Pará.....	15
1.4	TRATAMENTO DOS INDIVÍDUOS INFECTADOS PELOS PLASMÓDIOS HUMANOS.....	16
1.5	MECANISMO DE AÇÃO DA CLOROQUINA.....	17
1.6	GENOMA DO <i>Plasmodium falciparum</i>	19
1.7	RESISTÊNCIA DOS PLAMÓDIOS AOS ANTIMALÁRICOS.....	24
1.8	MÉTODOS DE DETECÇÃO E VIGILÂNCIA DA RESISTÊNCIA DO <i>P.</i> <i>falciparum</i> AOS ANTIMALÁRICOS.....	25
1.8.1	Ensaio <i>in vivo</i>.....	25
1.8.2	Ensaio <i>in vitro</i>.....	26
1.8.3	Marcadores Moleculares.....	27
1.9	MECANISMOS MOLECULARES ASSOCIADOS À EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA DO <i>P. falciparum</i> A CLOROQUINA.....	29
1.10	ORIGEM E DISPERSÃO DA RESISTÊNCIA DO <i>P. falciparum</i> À CLOROQUINA.....	33
2	JUSTIFICATIVA.....	35
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	GERAL.....	37
3.2	ESPECÍFICOS.....	37
4	METODOLOGIA.....	38
4.1	AMOSTRA.....	38
4.2	ASPECTOS ÉTICOS E BIOSSEGURANÇA.....	38
4.3	MÉTODOS LABORATORIAIS.....	39
4.3.1	Controle Interno Endógeno.....	39
4.3.2	Controle de Qualidade.....	39
4.3.3	Caracterização Molecular do Gene <i>pfcr</i>.....	39
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5	RESULTADOS	41
6	DISCUSSÃO	44
7	CONCLUSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
	ANEXO I	65
	APÊNDICE I	67

APÊNDICE II	68
APÊNDICE III	69

RESUMO

Resistência do *Plasmodium falciparum* à Cloroquina (CQ) tem sido associada a mutações no gene *P. falciparum* resistente à CQ relacionado ao transportador (*pfcr*t), com a mutação K76T considerada como o evento crítico. Em regiões com elevada endemicidade, a interrupção do uso de CQ como medicamento de primeira escolha para tratamento de infecções por *P. falciparum* tem conduzido para a restauração do perfil de suscetibilidade à CQ, decorrente da reexpansão do alelo selvagem (WT) K76, relacionado ao gene *pfcr*t. Nesse cenário, populações de parasitos resistentes estavam em desvantagem seletiva na ausência de pressão da droga. Já em áreas de baixa transmissão, como é o caso dos países da América do Sul, as mutações de resistência aos medicamentos podem atingir prevalência de 100%, isto é, há fixação de alelos resistentes aos medicamentos antimaláricos, o que impede o retorno de parasitos WT. No entanto, observou-se na Guiana Francesa que, apesar da fixação do alelo mutante K76T, a prevalência de isolados resistentes à Cloroquina (CQR) caiu progressivamente de mais de 90% para menos de 30% após 17 anos de interrupção do uso de CQ no país. Inquérito molecular retrospectivo em isolados da Guiana Francesa identificou uma única mutação em *pfcr*t que codificava uma substituição C350R associada com a recuperação da suscetibilidade à CQ. Como foi verificado esse fenômeno nas populações da Guiana Francesa, torna-se necessário conduzir vigilância molecular para observação da evolução desse fenômeno ao longo do tempo em outros países da América do Sul. Este estudo foi realizado para identificar as mutações K76T e C350R associadas à evolução da resistência de *P. falciparum* a CQ em isolados de duas localidades (Goianésia do Pará e Itaituba) no estado do Pará, região Amazônica brasileira. Para a realização do estudo do tipo transversal retrospectivo, foram incluídas alíquotas de DNA de amostras de *P. falciparum* obtidas durante o período de 2010 a 2012 de Goianésia do Pará e Itaituba (estado do Pará). A qualidade do DNA foi avaliada usando o gene da β -globina como um controle interno e foi confirmada pela amplificação por PCR dos alelos de Proteína 2 de Superfície do Merozoítio (MSP2). As mutações K76T e C350R do gene *pfcr*t foram amplificadas utilizando iniciadores específicos e protocolo de PCR, de acordo com Pelleau *et al.* (2015). Foram analisadas 75 amostras, 33 de Goianésia do Pará e 42 de Itaituba. Todas essas amostras foram consideradas de boa qualidade e avaliadas. Assim, Goianésia do Pará e Itaituba apresentaram 90,9% (30/33) e 81,0% (34/42) para a presença da mutação K76T, respectivamente. A mutação C350R foi observada em 97,0% (32/33) das amostras de Goianésia do Pará e 97,6% (41/42) de Itaituba. Houve uma predominância da presença simultânea das mutações K76T e C350R na amostra analisada dos dois municípios do estado do Pará, enquanto Goianésia do Pará alcançou frequência expressiva de 90,9%. Além disso, não houve correlação entre o perfil de combinação da presença das mutações K76T e C350R associadas a parasitemia assexuada igual ou superior a 1.000 parasitos/ μ L ($p= 0.4397$), bem como para a associação entre a ausência da mutação K76T e presença de C350R e parasitemia de até 499 parasitos/ μ L ($p= 0,9106$), tanto para Goianésia do Pará como Itaituba. Esses achados indicam a presença de populações de *P. falciparum* com as mutações K76T e C350R do gene *pfcr*t na Amazônia brasileira, particularmente no estado do Pará. Portanto, é fundamental continuar monitorando a distribuição e prevalência dessas mutações nesta e em outras áreas da bacia Amazônica.

Palavras-chave: *P. falciparum*, resistência, *pfcr*t, K76T, C350R, bacia Amazônica.

ABSTRACT

Plasmodium falciparum resistance to Chloroquine (CQ) has been associated with mutations in the transporter-related CQ resistant *P. falciparum* gene (*pfcr*), with the K76T mutation considered as the critical event. In regions with high endemicity, interrupt of the use of CQ as a first choice drug for the treatment of *P. falciparum* infections has led to the restoration of the susceptibility profile to CQ due to re-expansion of the wild-type allele (WT) K76, related to *pfcr* gene. In this scenario, populations of resistant parasites were selectively disadvantaged in the absence of drug pressure. In areas of low transmission, such as South America, drug resistance mutations can reach a prevalence of 100%, that is, the establishment of alleles resistant to antimalarial drugs, which prevents the return of WT parasites. However, it was observed in French Guiana that, despite the fixation of the K76T mutant allele, the prevalence of CQ resistant isolates (CQR) decreased progressively from over 90% to less than 30% after 17 years of interruption of the use of CQ in this country. Retrospective molecular investigation in isolates of French Guiana identified a single *pfcr* mutation that encoded a C350R substitution associated with recovery of susceptibility to CQ. As this phenomenon was verified in the populations of French Guiana, it is necessary to conduct molecular surveillance to observe the evolution of this phenomenon over time in other South American countries. This study was undertaken to identify the K76T and C350R mutations associated with the resistance evolution of *P. falciparum* to CQ in isolates from two localities (Goianésia do Pará e Itaituba) of Pará State, Brazilian Amazon Basin. For the retrospective cross-sectional study, only DNA aliquots of *P. falciparum* samples obtained during 2010 to 2012 from Goianésia do Pará and Itaituba (Pará State) were included. DNA quality was assessed using β -globin gene as an internal control and was confirmed by PCR amplification of the *Plasmodium* major surface protein 2 (MSP2) alleles. K76T and C350R mutations of *pfcr* gene were amplified using specific primers and PCR protocol, in accordance with Pelleau *et al.* (2015). A total of 75 samples were analyzed, 33 from Goianésia do Pará and 42 from Itaituba. All these samples were considered of good quality and further evaluated. Thus, Goianésia do Pará and Itaituba showed 90.9% (30/33) and 81.0% (34/42) for the K76T mutation presence, respectively. C350R mutation was presented in 97.0% (32/33) samples of Goianésia do Pará and 97.6% (41/42) from Itaituba. There was a predominance of the simultaneous presence of the K76T and C350R mutations in the analyzed sample from two localities in Pará State, while Goianésia do Pará reached an expressive frequency of 90.9%. In addition, there was no correlation between the combination profile of the presence of the K76T and C350R mutations associated with asexual parasitemia equal to or greater than 1,000 parasites/ μ L ($p=0.4397$), as well as for the association between absence of the K76T mutation and presence of C350R and parasitemia ranges of up to 499 parasites/ μ L ($p=0.9106$), both for Goianésia do Pará and Itaituba. These findings indicate the presence of *P. falciparum* populations with K76T and C350R mutations of *pfcr* gene in the Brazilian Amazon, particularly in Pará State. Therefore, it is critical to continue to monitor the distribution and prevalence of these mutations in this and other parts of the Amazon Basin.

Key words: *P. falciparum*, resistance, *pfcr*, K76T, C350R, Amazon Basin.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A malária é uma doença infecciosa parasitária, aguda, por vezes de evolução crônica, causada por parasitos do gênero *Plasmodium*, transmitida por vetores culicídeos do gênero *Anopheles* e que apresenta como principais manifestações clínicas febre, calafrio e cefaléia. Também é conhecida como paludismo, impaludismo, febre palustre, sezão ou tremedeira (BRUCE-CHWATT, 1988).

É considerada a doença infecciosa mais importante em regiões tropicais e subtropicais, e continua a ser um importante problema de saúde global, com mais de 40% da população do mundo exposta a diferentes graus de malária em cerca de 100 países (OLIVEIRA-FERREIRA, 2010; WHO, 2014).

No Brasil, o maior número de casos é registrado na região Amazônica, cujas condições ambientais e socioculturais favorecem a expansão de sua transmissão (BRASIL, 2017).

O Programa Nacional de Controle e Prevenção da Malária no Brasil – PNCM adota como principais estratégias para o controle efetivo desse agravo a combinação do diagnóstico rápido e eficaz e tratamento imediato dos casos, em vista disto é de extrema importância que as ferramentas utilizadas para o diagnóstico da malária não subestimem a real prevalência do parasita em regiões endêmicas (BRASIL, 2009a; WHO, 2010; 2014).

1.2 TRANSMISSÃO DA MALÁRIA

1.2.1 Vetores

A principal via de transmissão ao homem é por picada de fêmeas de insetos dípteros do gênero *Anopheles* durante seu repasto sanguíneo. No Brasil, as principais espécies transmissoras de malária pertencem ao subgênero *Nyssorhynchus*, destacando-se as espécies, *Anopheles (Nys.) aquasalis* e o complexo *Anopheles (Nys.) albitarsis*. Sendo que *Anopheles (Nys.) darlingi* é considerado o mais importante vetor da malária no Brasil, particularmente, na Região Amazônica brasileira (COX, 2010). Nessa área, a transmissão é instável e geralmente focal, alcançando picos principalmente após o período chuvoso do ano (BRASIL, 2009a; DUARTE *et al.*, 2014).

1.2.2 Agentes Etiológicos

Os parasitos da malária pertencem ao filo Apicomplexa, ordem Eucoccidiida, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*. Existem 120 espécies de plasmódios, sendo 22 parasitos de primatas, 19 de roedores, morcegos e outros mamíferos e 79 de outras espécies em aves e répteis (BRUCE-CHWATT, 1988; AYALA, 2009).

As espécies patógenicas para o homem são: *Plasmodium (Laverania) falciparum*, *Plasmodium (Plasmodium) vivax*, *Plasmodium (Plasmodium) ovale* e *Plasmodium (Plasmodium) malariae*, e recentemente *Plasmodium (Plasmodium) knowlesi*, um protozoário de primata que infectou esporadicamente o homem (SIGH *et al.*, 2004; BRONNER *et al.*, 2009). Destes, as espécies que estão presentes no território brasileiro são *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* (COX-SINGH & SINGH, 2008; LEE *et al.*, 2009; COX, 2010).

1.2.3 Ciclo Evolutivo

O ciclo evolutivo do parasito da malária é do tipo heteroxênico, com uma fase assexuada endógena (esquizogônica) com multiplicação no hospedeiro vertebrado e outra fase sexuada exógena (esporogônica) com multiplicação nos mosquitos. A fase esquizogônica compreende ainda duas etapas, sendo uma realizada nas células parenquimatosas do fígado (esquizogonia exoeritrocítica) e a outra de desenvolvimento do parasito nos eritrócitos (esquizogonia eritrocítica) (GILLES, 1993).

A infecção no hospedeiro vertebrado é iniciada pela picada do anofelino fêmea que durante o respasto sanguíneo libera, junto com a saliva, os esporozoítos (formas infectantes para o homem) na corrente sanguínea (MOTA, 2002). Após disseminação hematogênica, estes estágios penetram nos hepatócitos, onde sofrem diferenciação e passam a forma arredondada de criptozoítos, em seguida se multiplicam e se diferenciam em cerca de 10.000 merozoítos (VALE *et al.*, 2005). Esta fase pode perdurar cinco a quinze dias, dependendo da espécie de plasmódio, dentre outros fatores. Os merozoítos formados amadurecem, rompem os hepatócitos, caindo na circulação sanguínea e invadem as hemácias, dando início à segunda fase do ciclo, chamada de esquizogonia sanguínea (MÉNARD, 2000; GARCIA, 2010; NEVES *et al.*, 2011).

As espécies *P. vivax* e *P. ovale* têm estágios exoeritrocíticos persistentes, chamados hipnozoítos. Estes hipnozoítos são estágios unicelulares que permanecem latentes por anos e, quando reativados, levam a novas manifestações clínicas denominadas recaídas (FARID *et al.*, 1993; NOGUEIRA & ROSÁRIO, 2010). Na malária por *P. falciparum* podem existir

novas crises, as recrudescências, devido à persistência de formas eritrocitárias em níveis sanguíneos muito baixos, não detectáveis à microscopia óptica (BRUCE-CHWATT, 1988).

Após a penetração dos merozoítos nos eritrócitos do hospedeiro vertebrado, a maioria se transforma em trofozoítos jovens, que amadurecem dando origem aos esquizontes hemáticos ou secundários, que sofrem divisão nuclear e citoplasmática, posterior segmentação e originam um número variável de merozoítos. Os eritrócitos infectados e repletos de merozoítos se rompem, liberando estas formas evolutivas na corrente sanguínea. A grande parte dos merozoítos voltará a parasitar outras hemácias, repetindo o ciclo. Todavia, uma pequena população destes merozoítos se diferencia em gametócitos, a função destes é exclusivamente reprodutiva, isto é, garantir a perpetuação da espécie. Eles podem ser de dois tipos, diferenciados microscopicamente nos esfregaços sanguíneos: os microgametócitos (masculinos) e os macrogametócitos (femininos), que são os estágios infectantes para o vetor (BRUCE *et al.*, 1990; MÉNARD, 2000; BRASIL, 2009b).

A esquizogonia eritrocítica é caracterizada por elementos próprios de acordo com a espécie de plasmódio. Como exemplo, os plasmódios possuem particularidades quanto ao tipo de hemácia preferencial a ser invadida. Assim, o *P. malariae* invade hemácias maduras; o *P. vivax* e o *P. ovale* invadem, preferencialmente, hemácias jovens ou reticulócitos e os *P. falciparum* e *P. knowlesi*, hemácias em qualquer idade evolutiva. Também há diferenças quanto aos intervalos em que os ciclos eritrocíticos se repetem e caracterizam os paroxismos febris no indivíduo infectado nem sempre ocorrem, sendo de 72 horas para o *P. malariae*, 48 horas para *P. vivax* e *P. ovale*, 36 a 48 horas para o *P. falciparum* e somente 24 horas para o *P. knowlesi* (BRUCE *et al.*, 1990; GILLES, 1993; GARCIA, 2010).

Já o ciclo esporogônico se inicia quando a fêmea do mosquito anofelino ingere os gametócitos masculinos e femininos maduros (formas infectantes para o vetor) presentes no sangue circulante do hospedeiro vertebrado, durante o repasto sanguíneo (NOGUEIRA & ROSÁRIO, 2010). A primeira etapa deste ciclo é a diferenciação dos gametócitos em gametas e ocorre no estômago do mosquito. O macrogametócito ou gametócito feminino dá origem a um gameta feminino, enquanto o microgametócito ou gametócito masculino pode produzir até oito gametas masculinos por divisão nuclear, decorrentes do processo de exflagelação. Os microgametas se movimentam rapidamente e fertilizam os macrogametas no lúmen do estômago, formando o ovo ou zigoto (GAMA, 2011). Poucas horas após a fertilização, este se desenvolve e se transforma em uma forma móvel, o oocineto, que irá perfurar o epitélio do estômago para se alojar e transformar em oocisto, iniciando a segunda etapa do ciclo. Depois da maturação, o oocisto se rompe liberando os esporozoítos. Estas formas migram para as

glândulas salivares do mosquito, estando aptos a reiniciar o ciclo quando inoculados durante um novo repasto sanguíneo (PAULINO, 2004; REY, 2008).

1.3 MALÁRIA NA REGIÃO AMAZÔNICA

A região Amazônica brasileira é uma região tropical de 5,1 milhões de km² com baixa densidade populacional (2,7 habitantes/km²), e formada pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, totalizando 807 municípios (MARQUES & GUTIERREZ, 1994; PASSOS & FIALHO, 1998; BRASIL, 2016), muitos de difícil acesso. A associação de diversos fatores favorece a transmissão e a emergência de focos epidêmicos e endêmicos da doença nesta região. Dentre estes, a colonização de várias áreas por diferentes grupos populacionais é fator relevante, porém é necessário conhecer melhor como estes processos surgem e são estabelecidos (MARQUES, 1987; BARATA, 1995; TAUIL, 2011).

A Amazônia brasileira registra 99,7% das notificações dos casos de malária no Brasil (BRASIL, 2009a; 2016). As condições climáticas, hidrográficas e o desmatamento da floresta contribuem para a manutenção do ciclo de transmissão da malária. Outro fator importante é o grande número de portadores ou assintomáticos e o fluxo migratório em alguns municípios, condizendo com as altas incidências de casos de malária na região (BRADT, 2011).

Nessa região, observou-se que: 1) No ano de 2016, o número de casos de malária notificados sofreu uma redução de 11%, em comparação com o mesmo período de 2015, passando de 131.749 para 117.453 casos registrados; 2) Somente o estado do Pará apresentou um aumento de 5,0% no número de registros de malária no ano de 2016; e 3) Ainda em relação ao período de janeiro a novembro de 2016, o número de casos de malária por *P. falciparum* + *P. vivax* no estado do Pará sofreu uma redução de 12%, quando comparado com o mesmo período de 2015, passando de 1.760 para 1.127 casos autóctones e no estado do Acre houve um aumento de 9,0%, em comparação com o mesmo período de 2015, passando de 4.944 para 5.649 casos autóctones (BRASIL, 2016) (Figura 1).

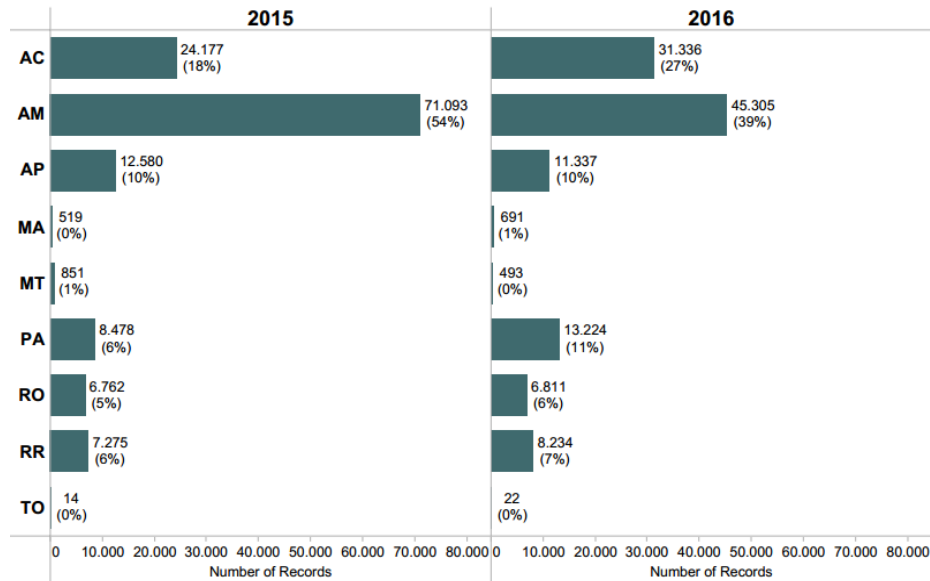


Figura 1- Casos de malária notificados por estado e percentual de participação no total de casos notificados na região Amazônia, 2015 e 2016 – Jan a Nov. (Fonte: Brasil, 2016).

Na Amazônia, onde a transmissão da malária não é completamente estável, o risco da ocorrência anual de casos em determinado espaço geográfico, é estimado pela Incidência Parasitária Anual (IPA), que é expressa pelo número de exames positivos de malária a cada mil habitantes. A IPA pode ser classificada como de alto risco ($IPA > 50/1.000$ hab.), médio risco (IPA entre $10-49/1.000$ hab.) e baixo risco ($IPA < 10/1.000$ hab.) (DUARTE *et al.*, 2014; BRASIL, 2017).

Desde 1999, o Governo Brasileiro adota estratégias para intensificar as ações e medidas de controle da malária, visando reduzir a incidência da malária, morbidade, mortalidade e eliminar a transmissão da malária em áreas urbanas da região Amazônica, a fim de alcançar a interrupção da transmissão da doença. Esta estratégia consiste em uma ação conjunta e permanente do governo e da sociedade, direcionada à eliminação ou redução do risco de adoecer ou morrer de malária, assim como redução das perdas sociais e econômicas decorrentes desse agravo (TAUIL, 2006; OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010; WHO, 2014).

Para alcançar os objetivos acima citados, as seguintes ações devem ser implementadas: adoção do diagnóstico precoce e preciso associado ao tratamento imediato e eficaz dos casos detectados; planejamento e implementação de medidas seletivas e sustentáveis de controle, adequadas às características peculiares da transmissão existentes em cada localidade; detecção oportuna e contenção ou prevenção de epidemias; monitoramento regular da situação da malária, principalmente quanto aos determinantes ecológicos, sociais e econômicos (BRASIL, 2009a; 2009b, WHO, 2014).

O PNCM adota o SIVEP - Malária (Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica – Malária) que é o sistema de informação implantado pelo Ministério da Saúde no ano de 2002, que funciona *on line* e é alimentado pelos municípios, com os dados coletados nos Postos de Notificação da Malária (PN) distribuídos em todos os municípios endêmicos (MOURÃO *et al.*, 2014). Contudo, este sistema apresenta limitações, como por exemplo, não identificar as epidemias, redução efetiva da doença, quais os municípios estão em situação de alerta, além de falhas humanas durante a inserção correta dos dados de notificação (BRAZ *et al.*, 2014). A continuidade da transmissão da malária na região, mesmo após todos esses esforços de controle, é consequência das particularidades da dinâmica populacional nessa região, onde, além dos fatores humanos, coexistem os fatores ambientais propícios para a proliferação dos mosquitos transmissores e para a manutenção da infecção (BRAZ *et al.*, 2014; WHO, 2014).

É importante ressaltar que as principais estratégias para o controle da malária adotadas pelo PNCM estão direcionadas para o diagnóstico laboratorial rápido e preciso associado ao tratamento imediato dos casos, estratégia que permite a eliminação da fonte de infecção para o mosquito transmissor (TAUIL, 2006; FRASSON *et al.*, 2009; BRASIL, 2009a; BRAZ *et al.*, 2014).

Embora não se tenha observado aumento no número de mortes causadas por malária, a morbidade ainda é alta, trazendo sérias consequências socioeconômicas. Assim, o desafio de manter o controle dessa infecção na Amazônia permanece, uma vez que as medidas tradicionais de controle não são eficazes o suficiente (CASTRO & SINGER, 2007; BRAZ *et al.*, 2014; DUARTE *et al.*, 2014).

1.3.1 Malária no Estado do Pará

Desde a década de 80, a população do estado do Pará vem aumentando drasticamente devido aos incentivos do governo com implantação de hidroelétricas e mineradoras (MARQUES, 1986; FEARNSSIDE, 2002). Assim, o número de pessoas provenientes de outras regiões fez com que houvesse mais indivíduos suscetíveis à infecção por não possuírem imunidade adquirida contra a infecção (CASTRO *et al.*, 2006).

No estado do Pará ainda há um grupo composto por oito municípios prioritários que são responsáveis por 90% dos casos neste estado, dentre eles estão: Goianésia do Pará, Jacareacanga, Itaituba, Novo Progresso, Rurópolis, São Caetano das Odivelas, Chaves e Oriximiná. A principal espécie responsável por causar malária no estado do Pará é o *P. vivax*

com percentual de 80% dos casos, enquanto, 17% são causadas por *P. falciparum* e o restante devido a infecções por *P. malariae* e/ou mistas (BRASIL, 2016).

Desde 2011, tem ocorrido redução brusca na notificação de novos casos de malária no estado do Pará. Em 2013, esse estado foi responsável por 24.674 dos 177.496 casos de malária registrados na região Amazônica. Em 2014, dos 137.970 casos registrados na Amazônia Legal, o estado do Pará foi responsável por 11.437 casos, com diferença percentual maior que 50% de redução em relação ao ano de 2013 (BRASIL, 2016). Em 2016, dos 117.453 casos registrados na Amazônia Legal, o estado do Pará foi responsável por 13.224 casos, sendo o *P. vivax* a espécie com maior prevalência, representando 11,259% do total de casos registrados no estado. Este cenário evidencia redução significativa dos casos da doença, entretanto, é necessário manter a efetividade das ações de controle e prevenção da malária, como objetiva o PNCM (DUARTE *et al.*, 2014; BRASIL, 2017).

1.4 TRATAMENTO DOS INDIVÍDUOS INFECTADOS PELOS PLASMÓDIOS HUMANOS

Em relação à terapêutica para malária humana, esta ação tem como objetivo principal interromper a esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da doença. No entanto, em consequência da diversidade de seu ciclo evolutivo, é também objetivo do tratamento eliminar as formas latentes (hipnozoítos) do parasito no ciclo tecidual do *P. vivax* e *P. ovale* evitando-se, assim, as recaídas tardias. Além disto, a abordagem terapêutica deste paciente deve também ser capaz de interromper a transmissão, pelo uso de drogas que eliminem as formas sexuadas dos parasitos (BRASIL, 2010; CAMARGO *et al.*, 2009).

Portanto, para o tratamento da malária humana, o ideal é utilizar medicamentos ou associações medicamentosas que atuem nas várias fases da cadeia de desenvolvimento do parasito, ou seja, drogas com diferentes mecanismos de ação, capazes de impedir o desenvolvimento do parasito no hospedeiro, bem como reduzir as fontes de infecção para o mosquito. O Ministério da Saúde (MS) disponibiliza gratuitamente essas drogas em todo o território nacional por meio das unidades do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2010; CAMARGO *et al.*, 2009).

Para o tratamento efetivo da malária por *P. vivax* ou *P. ovale*, as formas assexuadas, sexuadas e os hipnozoítos devem ser eliminados. Para tal, administra-se uma 4-

aminoquinoleína (Cloroquina para eliminar as duas primeiras formas) associada a uma 8-aminoquinoleína (Primaquina - destrói os hipnozoítos) (BRASIL, 2010; DUARTE *et al.*, 2001).

O tratamento para malária por *P. malariae* é feito com drogas do grupo das 4-aminoquinoleínas (Cloroquina) que destroem tanto as formas assexuadas quanto sexuadas, apresentando atividade esquizonticida e gametocitocida (BRASIL, 2006). No caso do *P. knowlesi*, os casos humanos observados utilizam o mesmo esquema empregado para o *P. malariae*, com sucesso terapêutico (LEE *et al.*, 2009; GARCIA, 2010; SABBATINI *et al.*, 2010).

No tratamento da malária por *P. falciparum* não-complicado devem ser utilizadas drogas esquizonticidas sanguíneas de ação rápida, tais como as lactonas sesquiterpênicas (derivados da Artemisina) em associação com drogas do grupo dos quinolinometanóis (Lumefantrina), esquizonticidas que promovem a digestão de produtos da hemoglobina, esquema de primeira escolha para o tratamento de malária por este plasmódio preconizado pelo MS desde 2006. Vale ressaltar que, em alguns casos (gestantes no primeiro trimestre gestacional e menores de seis anos), o tratamento deve ser feito pela associação de quinolinometanóis (Quinino) a antibióticos (Doxiciclina ou Clindamicina), que são esquizonticidas sanguíneos de ação lenta e têm o objetivo de evitar o aparecimento de recrudescências (BRASIL 2010; CAMARGO *et al.*, 2009; GARCIA, 2010).

Apesar das falhas no tratamento antimalárico geralmente serem resultado de interrupções terapêuticas, doses inadequadas, fatores farmacocinéticos ou resistência, algumas infecções podem recrudescer mesmo na ausência destes fatores. Desta maneira, é necessário que o paciente cumpra as orientações recebidas do profissional de saúde e siga rigorosamente a prescrição estabelecida para que a cura do doente seja completa (WHITE, 1998a; 1998b; BRASIL, 2010; CAMARGO *et al.*, 2009; GARCIA, 2010).

1.5 MECANISMO DE AÇÃO DA CLOROQUINA

A Cloroquina (CQ) foi descoberta e sintetizada na Alemanha em 1934 e, um ano depois, já utilizada em pacientes com malária por *P. vivax* durante a Segunda Guerra Mundial em consequência da ausência do Quinino. Esta droga rapidamente ganhou popularidade por ter alta eficácia, segurança devido sua baixa toxicidade, tolerância e ser uma droga de baixo custo para tratamento da malária por *Plasmodium sp.* (BAIRD, 2004; CAMARGO *et al.*, 2009). Esta droga é do grupo das 4-aminoquinoleínas, que tem como representantes a

Amodiaquina e a CQ, e tem ação esquizotocida sanguínea para as espécies *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi* e, no caso do *P. falciparum*, somente para as cepas ainda sensíveis a este antimalárico (RIDLEY, 1998).

Embora ainda não haja consenso sobre o real mecanismo de ação da CQ, as hipóteses mais prováveis são: 1- ligação ao DNA do parasito, 2- inibição de enzimas transportadoras de membrana e/ou acúmulo da droga no vacúolo digestivo do parasito. E, dentre essas, a segunda encontra amparo no fato do vacúolo digestivo ser o sítio de metabolização da hemoglobina pelo parasito. Pois, o parasito depende do metabolismo da hemoglobina, proteína abundante na célula hospedeira, para manter seu ciclo metabólico. Essa molécula é capturada do citoplasma do eritrócito pela invaginação da membrana, constituindo uma vesícula de transporte e, após reação de catalização no vacúolo digestivo, libera peptídeos, que são fonte de nutrientes (aminoácidos) para o parasito, além de também serem precursores (aminoácidos) de moléculas azotadas, como ácidos nucléicos, ATP (Adenosina Trifosfato), NADH (Dinucleótido de nicotinamida e adenina) (PAGOLA *et al.*, 2000).

Portanto, o parasito realiza a digestão da hemoglobina por ação de proteases (falcipaina e plasmopsinas I e II), para obtenção de nutrientes e desenvolvimento parasitário (HAWLEY *et al.*, 1998). O grupamento heme (II ferroprotoporfirina IX) formado, que é altamente tóxico, é liberado como produto dessa atividade. Este grupamento é imediatamente oxidado em hematina (III ferroprotoporfirina IX), dando origem à hemozoína ou pigmento malárico por meio de uma reação de polimerização (SULLIVAN *et al.*, 1996; RIDLEY, 1998) (Figura 2).

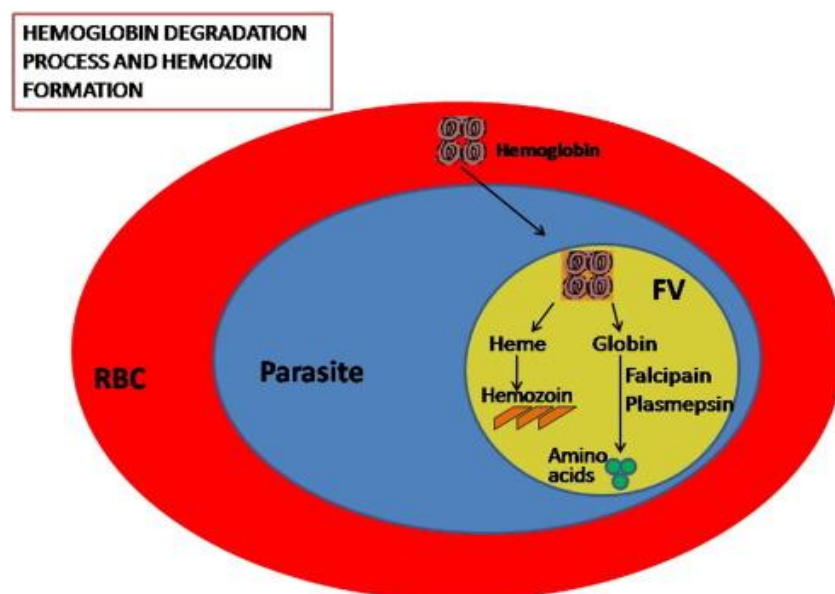


Figura 2 – Processo metabólico de digestão da hemoglobina, em que o grupo heme (Ferro protoporfirina IX) é oxidado a ferro protoporfirina – Fe(III)PP, estrutura tóxica ao parasita.

Diante disso, o plasmódio realiza o mecanismo de detoxificação, onde a membrana da vesícula fagocitária (FV) ou transportadora cria um ambiente lipofílico, possibilitando a polimerização dos grupos heme, formando um composto inerte, insolúvel e não tóxico ao parasito, denominado de hemozoína ou pigmento malárico (Fonte: PAGOLA *et al.*, 2000).

Dessa maneira, a CQ atua sobre os plasmódios ligando-se à hematina, evitando sua polimerização e mantendo a atividade tóxica do metabólito formado. Assim, desestrutura membranas e proteínas celulares o que resulta na morte do parasito, ou seja, a ação antimalárica da CQ está relacionada ao acúmulo de altas concentrações desta droga no vacúolo digestivo do parasito (BRAY *et al.*, 1998; ZALIS, 2000; CAMARGO *et al.*, 2009) (Figura 3).

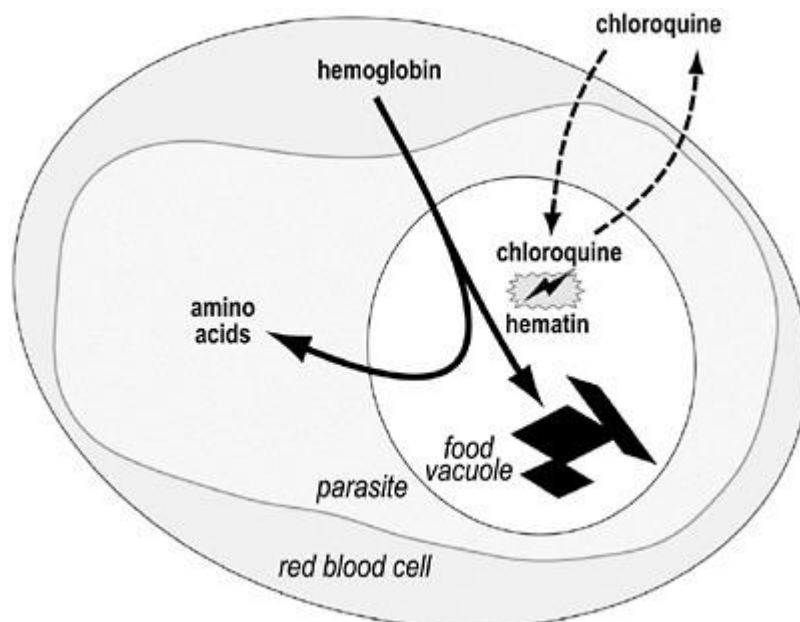


Figura 3 – Mecanismo de ação da CQ no vacúolo digestivo do *P. falciparum*, pela ligação à hematina, impedindo sua polimerização e destruindo o parasito (Fonte: PAGOLA *et al.*, 2000).

1.6 GENOMA DO *Plasmodium falciparum*

A organização do material genético do *Plasmodium spp.* é constituída por três genomas: 1- genoma mitocondrial que possui 6 Kb (quilobases) e contém os genes que codificam as proteínas responsáveis pelo transporte de elétrons, 2- genoma circular plasmidial que possui 35 Kb e compreende os genes que codificam RNAr, RNAt e as proteínas ribossomais e 3- genoma nuclear, que abriga a maioria dos genes, muitos deles envolvidos na resistência aos antimaláricos (Figura 4).

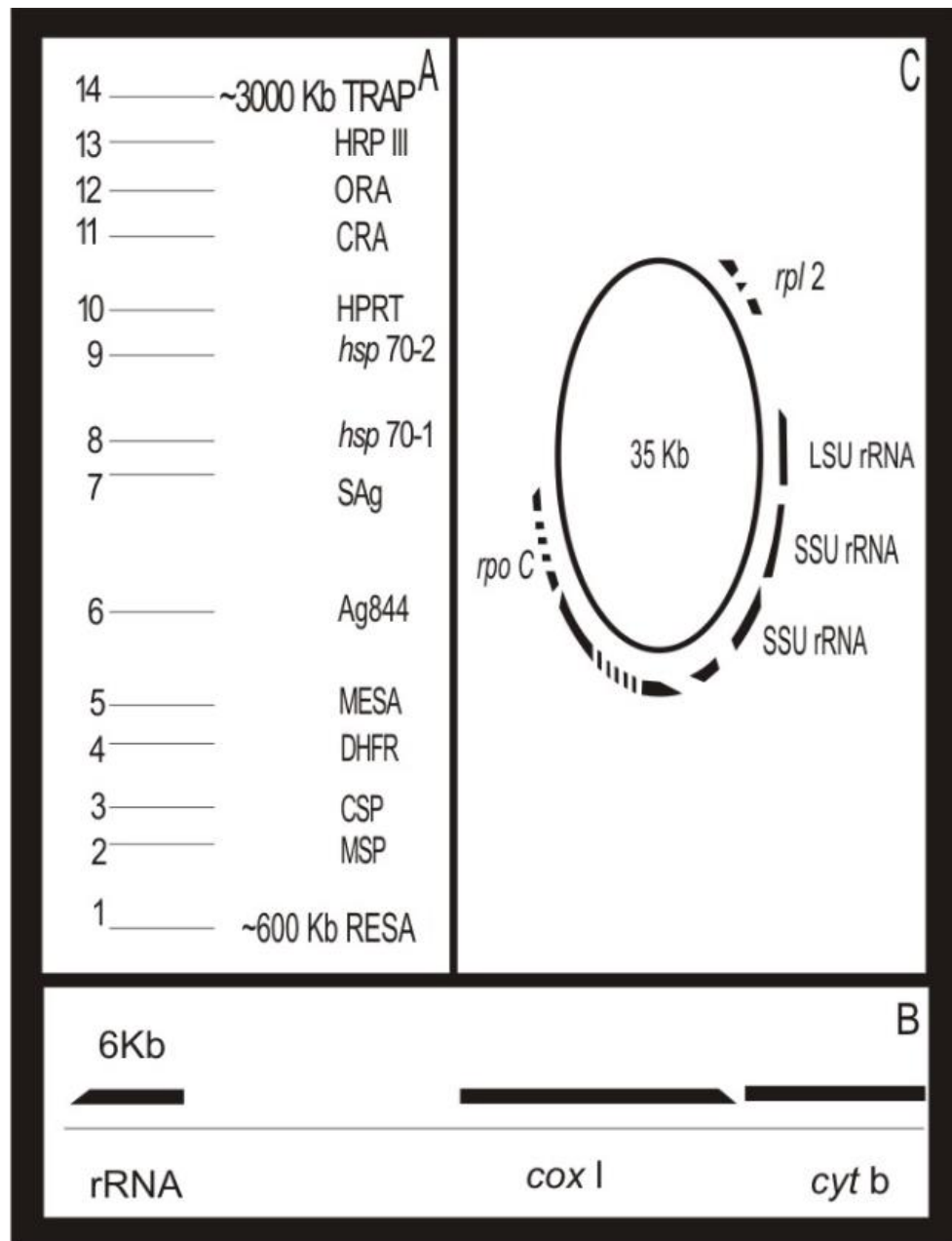


Figura 4 - Esquema ilustrativo do genoma do *P. falciparum*: A- 14 cromossomos nucleares, B- DNA extracromossômico de 6 Kb e C- DNA extracromossômico de 35 Kb (Fonte: WILSON *et al.*, 1989).

Os plasmódios são eucariontes inferiores, haplóides na grande parte de ciclo evolutivo e com uma fase diplóide no vetor anofelino (KEMP *et al.*, 1990; GARDNER *et al.*, 2002).

Um consórcio denominado de Projeto Genoma da Malária (MGP) foi criado em 1995 para sequenciar o genoma do *P. falciparum* (clone 3D7 – sensível à Cloroquina e Pirimetamina). Ainda nesse mesmo ano, o genoma da mitocôndria do parasito foi divulgado e, no ano seguinte, o do plastídeo, bem como a sequência do primeiro cromossomo nuclear (cromossomo 2), que contém aproximadamente 223 genes. Já a sequência do cromossomo 3

contendo 239 genes foi relatada no ano de 1999 e todo o genoma em 2002 (BOWMAN *et al.*, 1999).

O cariótipo do *P. falciparum* é constituído por 14 cromossomos de 2.5 a 3.0×10^7 pares de bases de DNA (Ácido Desoxiribonucleico). O genoma nuclear haplóide do *P. falciparum* possui 23 Mb (megabases) e aproximadamente 5.400 genes localizados e distribuídos nestes 14 cromossomos lineares que variam de 0.65 a 3.4 Mb. Geralmente, um gene está localizado e é encontrado a cada 3 a 5 Kb dentro de um cromossomo de *P. falciparum*. Embora a grande parte destes genes seja contínua, os íntrons possuem sítios de *splicing* característicos de eucariontos e comprimento ≤ 1 Kb, enquanto os éxons podem apresentar tamanhos variáveis (GARDNER *et al.*, 2002).

Em relação aos cromossomos 2 e 3, os primeiros a serem sequenciados e que juntos correspondem a 7% do genoma do *P. falciparum*, observou-se que há muitos genes no cromossomo 2 que codificam proteínas encontradas na superfície dos merozoítos e antígenos ricos em sequências com repetições de Serina. Além disso, há genes codificadores de antígenos da superfície do eritrócito infectado, como os das famílias *var* e *rifin*, que são encontrados próximos aos telômeros em ambos os cromossomos, onde cada telômero é flanqueado por um gene *var* e muitos membros da família *rifin*. Como os genes *var* e *rifin* estão localizados próximo um do outro, sugere-se que eles sejam co-expressos e co-regulados. Estima-se que os genes *var*, os quais representam uma família poligênica com 40 a 50 elementos que codificam a proteína PfEMP-1 (Proteína 1 da Membrana do Eritrócito), estejam distribuídos nos 14 cromossomos do parasito. No entanto, os genes *var* não estão distribuídos de forma uniforme no genoma, pois os cromossomos 4, 7 e 12 abrigam maior quantidade desses genes do que os outros. Em relação ao *rifin*, há 200 genes desta família no genoma, o que a torna a maior família genética em *P. falciparum* (GARDNER *et al.*, 2002; HALL *et al.*, 2002).

Além dessas famílias, Bowman *et al.* (1999) também relataram a presença dos genes *clag* (gene assexuado associado à citoaderência) e *CTP* (Proteína Conservada do Telômero) localizados em regiões subteloméricas no cromossomo 3. A função dos genes *clag* ainda é discutível. Sabe-se, todavia, que os produtos desse gene devem ser expressos na superfície da hemácia infectada e teriam função biológica.

Quanto às sequências dos cromossomos 1, 3 a 9 e 13, estas equivalem a mais de 50% do genoma do *P. falciparum* e possuem elementos altamente conservados nas regiões intergênicas. Em relação ao número de genes encontrados, observou-se 143 no cromossomo 1, em torno de 290 em cada um dos cromossomos 3 a 9 e 672 no cromossomo 13. Com

exceção do cromossomo 4, pequena proporção desses genes está relacionada com os processos de invasão ou adesão à célula hospedeira. A importância da localização física e função desses genes necessita de estudos para avaliar os padrões de expressão bem como a localização celular (HALL *et al.*, 2002).

Já em relação aos cromossomos 10, 11 e 14, estes correspondem a aproximadamente 30% do genoma de *P. falciparum* e apresentam estrutura semelhante à observada nos outros onze cromossomos, exemplo disso é o conteúdo nucleotídico rico em A+T. Sequências subteloméricas conservadas foram também observadas nos cromossomos 10 e 11. Porém, muitos desses elementos foram deletados em ambas as extremidades do cromossomo 14. Nessa região deste cromossomo, observou-se a presença de elementos repetidos ligados diretamente aos genes *var*, além de outros elementos como os *TARE-2* e *3* (Elementos Repetidos Associados ao Telômero). Anotações gênicas desses cromossomos revelaram quatro proteínas (PF10_0047, PF10_0217, PF11_0200, PF14_0656) com similaridade às proteínas SR, uma família de fatores de *splicing* que contém domínios de ligação ao RNA e ricos em resíduos de Serina e Arginina. Vale ressaltar que três proteínas SR também foram identificadas nos cromossomos 5 e 13 (PFE0160c, PFE0865c, MAL13PL120) (GARDNER *et al.*, 2002).

Como citado anteriormente, além dessas estruturas nucleares há um genoma linear de seis Kb que é formado por sequências repetidas em *tandem*. Esse genoma é responsável por codificar os genes da subunidade I da enzima citocromo oxidase, do citocromo *b* e também de fragmentos de rRNA (Ácido Ribonucléico) nas espécies *P. yoelli*, Landau & Killick-Kendrick, 1966 e *P. gallinaceum*, Brumpt, 1935, o que sugere a origem mitocondrial desse elemento de DNA presente no citoplasma do parasito. Outro elemento extracromossômico se refere a um genoma circular de 35 Kb de comprimento, baixo número de cópias e origem exclusivamente materna. Este elemento está presente em todas as espécies de plasmódios. Quanto às suas funções e localização, esses aspectos ainda não estão completamente esclarecidos. Todavia, sabe-se que esse elemento codifica duas subunidades da enzima RNA polimerase semelhante às encontradas em outros eucariotos, *rpoB* e *rpoC* (genes B e C da RNA polimerase relacionados ao cloroplasto). Além disso, a semelhança com o material genético do cloroplasto sugere que esse elemento é oriundo dessa organela vegetal, apesar do tamanho reduzido (WILSON *et al.*, 1989).

Portanto, o genoma do *P. falciparum* é altamente polimórfico, o conteúdo nucleotídico é rico em A+T (82%) nas regiões intergênicas, além de Polimorfismos de Base Única (SNPs) e Microssatélites de DNA (MEYER *et al.*, 2002).

Os SNPs são mutações de um único nucleotídeo ou base nitrogenada que correspondem às alterações mais elementares da molécula de DNA. O tipo de mutação mais comum é representado pelas transições, onde acontecem as trocas de uma base púrica por outra púrica (exemplo: A → G) ou de uma pirimídica por outra pirimídica (exemplo: C → T). Já as transversões, caracterizadas por trocas de uma purina por pirimidina e vice-versa (exemplos: C/T → A/G), são eventos menos frequentes. Geralmente, os SNPs são marcadores bi-alélicos, isto é, são encontrados apenas dois variantes e a maioria é encontrada em regiões intergênicas ou sem função ainda definida, embora possam ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória (MEYER *et al.*, 2002).

Já os Microssatélites são repetições aleatórias de bases de DNA distribuídos por todo o genoma e fisicamente próximos de genes, como os que conferem resistência a medicamentos. Esses marcadores contêm repetições em série de motivos (conservados ou degenerados) que variam de 2 a 6 nucleotídeos, cujos alelos se diferenciam por variações no tamanho total do Microssatélite. A variação alélica é em consequência de *crossing over* desigual durante a meiose e, sobretudo, pelo deslizamento da enzima DNA polimerase durante a replicação do DNA (ANDERSON & ROPER, 2005).

Os Microssatélites constituem regiões instáveis do genoma que estão sob impacto de alterações mutacionais, com frequência maior que a observada nas sequências de cópia única. Esta instabilidade característica desses marcadores faz com que sejam regiões altamente polimórficas, além de serem polialélicos, neutros em termos evolutivos e de distribuição ampla no genoma. Estes fatos fazem com que os Microssatélites sejam amplamente utilizados como marcadores em estudos de populações e mapeamento genético. Assim, por meio do estudo de *loci* de Microssatélites que estão fisicamente próximos de genes que conferem resistência a drogas é possível se investigar a origem e propagação dos fenômenos de resistência. No genoma do *P. falciparum*, encontra-se um Microssatélite a cada 1.000 pb (pares de bases), em média, com distribuição heterogênea ao longo do genoma, totalizando 507 marcadores (ANDERSON *et al.*, 1999).

Identificar as funções de genes individuais e suas interações representa um grande desafio. Em relação às regiões subteloméricas dos cromossomos, sabe-se que estas concentram os genes envolvidos na variação antigênica. Já quando comparadas as informações do genoma do *P. falciparum* com as de outros eucariontes, nota-se que codifica poucas enzimas e proteínas transportadoras. No entanto, grande percentual dos genes desse agente biológico está envolvido nos processos de escape da resposta imune e na interação parasito-hospedeiro, que poderão fornecer informações sobre as principais vias metabólicas

do parasito para que novos medicamentos eficazes e vacinas possam ser desenvolvidos (MU *et al.*, 2003).

Quanto aos genes relacionados ao fenótipo de resistência aos antimaláricos, a identificação de alelos específicos como causa do fenótipo de resistência pode fornecer dados sobre marcadores moleculares cruciais para determinar a frequência de parasitos resistentes aos antimaláricos em muitas áreas. Porém, enquanto alelos de alguns genes têm sido correlacionados diretamente ao fenômeno da resistência, o papel de outros genes candidatos ainda precisa ser esclarecido, o que torna a vigilância molecular da resistência do *P. falciparum* aos antimaláricos imprescindível para assegurar a eficácia e sustentabilidade das estratégias de controle da malária (MACHADO, 2001; ANDERSON & ROPER, 2005).

1.7 RESISTÊNCIA DOS PLASMÓDIOS AOS ANTIMALÁRICOS

A resistência *in vivo* é definida pela Organização Mundial de Saúde – OMS como: “Capacidade que uma dada população de parasitos tem para se multiplicar ou sobreviver, na presença de concentrações de fármaco que, habitualmente, destruiriam os parasitos da mesma espécie ou impediriam a sua multiplicação”. Quando esta definição foi elaborada, ainda não havia os ensaios para cultivo *in vitro* de *P. falciparum* nem a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC), e os conhecimentos advindos da área da Biologia Molecular estavam iniciando como ciência. Por estes fatores, o conceito de resistência foi baseado em evidências clínicas (WHO, 1973).

A confirmação da existência de resistência do *Plasmodium* sp. a um antimalárico é necessária a demonstração de que os parasitos são recrudescentes em um paciente que, comprovadamente, fez uso de tratamento recente e que a concentração sanguínea eficaz do fármaco ou de seus metabólitos biologicamente ativos foi mantida por, ao menos, quatro ciclos parasitários (WHITE, 1998b; WHO, 2005; LAUFER, 2009). Desta maneira, os resultados de testes *in vitro* e a presença de mutações em genes relacionados a resistência a um antimalárico representam indicadores adicionais ou complementares de resistência (WHO, 2005).

A resistência e falha terapêutica são consideradas fenômenos distintos. Falha terapêutica representa ausência da resolução de manifestações clínicas após tratamento com um dado antimalárico. Vários elementos podem influenciar este fenômeno, como: dosagem incorreta, não aderência do indivíduo ao tratamento (posologia, duração do tratamento, etc.), qualidade do fármaco, interações farmacológicas, variações interindividuais na

farmacocinética do medicamento (exemplo: baixa absorção ou rápida eliminação) e insuficiente ou fraca biotransformação das pró-drogas devido a características farmacogenéticas (WHO, 2005).

Em relação à resistência, definida como a capacidade do parasito em resistir aos efeitos de um medicamento que normalmente é eficaz contra esse agente etiológico, constitui um fenômeno de maior complexidade que falha terapêutica, no qual o surgimento é influenciado por fatores relacionados ao parasito, ao hospedeiro, ao vetor e ao fármaco (WHO, 2001). Diante deste contexto, a multiresistência a antimaláricos faz referência ao fenótipo de resistência a dois ou mais fármacos, fato que tem sido observado, em especial, em *P. falciparum*. Este fenótipo pode acontecer em simultâneo ou como resultado de resistência cruzada. A resistência a vários antimaláricos em simultâneo resulta da utilização frequente e simultânea dos mesmos, causando uma pressão seletiva que resulta no aparecimento de multiresistência. Já a resistência cruzada entre antimaláricos está relacionada aos aspectos comuns de seus mecanismos de ação (fatores farmacodinâmicos), bem como aos mecanismos de resistência que estão correlacionados (LE BRAS & DURAND, 2003).

1.8 MÉTODOS PARA DETECÇÃO E VIGILÂNCIA DA RESISTÊNCIA DO *P. falciparum* AOS ANTIMALÁRICOS

A partir da detecção e vigilância da resistência do *P. falciparum* aos antimaláricos, certos métodos foram adotados, tais como: i) avaliar uma resposta *in vivo*; posteriormente ii) introdução dos ensaios *in vitro*; e, por fim; iii) a inclusão de marcadores moleculares de resistência. Com isso, tornou-se capaz de detectar e monitorar a resistência aos antimaláricos e, assim, constituir ferramentas cruciais para avaliar a prevalência e distribuição de malária resistente a drogas (NOEDL *et al.*, 2002; NOGUEIRA & ROSÁRIO, 2010). Em seguida, será feita uma explanação mais criteriosa sobre cada um deles.

1.8.1 Ensaios *in vivo*

O método *in vivo* é um teste de avaliação da eficácia terapêutica, ou seja, faz uma análise da resposta do *P. falciparum* aos antimaláricos no indivíduo infectado. Em 1965, após a descoberta dos primeiros casos de resistência desta espécie a CQ, foram feitos os primeiros testes *in vivo*. A Organização Mundial de Saúde definiu a seguinte classificação de resistência *in vivo*: RI (Resistência nível I), RII (Resistência nível II), RIII (Resistência nível III) e S

(Sensibilidade), de acordo com o período de tempo entre o desaparecimento dos parasitos após a intervenção terapêutica e a recrudescência (WHO, 1973).

Em 2003, tal classificação foi modificada e reagrupada pela OMS (2006) nos seguintes perfis de resposta:

- 1) ETF (Falha Terapêutica Precoce) – agravamento ou persistência de manifestações clínicas com parasitemia no período de 3 (três) dias depois do tratamento;
- 2) LTF (Falha Terapêutica Tardia) – reaparecimento das manifestações clínicas com parasitemia detectada no intervalo entre o 4º dia e o 28º dia após o tratamento; e,
- 3) ACR (Resposta Clínica Adequada) – ausência de parasitemia ou de manifestações clínicas no 28º dia após o início do tratamento. (WHO, 2006)

O teste *in vivo* não é por si só suficiente para confirmar a resistência, pois necessitam de métodos adequados para diferenciar reinfecções de falhas clínicas e possuem a desvantagem de serem caros e laboriosos (NOEDL *et al.*, 2002; WHO, 2006).

1.8.2 Ensaio *in vitro*

Os testes *in vitro* são bastante utilizados para medir a suscetibilidade intrínseca do *P. falciparum* aos antimaláricos, onde fornecem informações complementares aos testes de suscetibilidade à droga *in vivo*, sobretudo, quando comparam variações temporais e espaciais da suscetibilidade do *Plasmodium* sp. aos antimaláricos (LABBÉ *et al.*, 2001; NOEDL *et al.*, 2002).

Quatro são os métodos possíveis de avaliações *in vitro* para determinação da suscetibilidade aos antimaláricos.

- 1) microteste – desenvolvido pela OMS, baseia-se na avaliação do crescimento parasitário pela maturação de trofozoíto jovem a esquizonte viável e leitura por microscopia óptica. É muito útil em inquéritos epidemiológicos, porém é um método laborioso e não é útil para avaliações de antimaláricos em larga escala (WHO, 1997);

- 2) isotópicos - avaliam os processos metabólicos do parasito em cultivo de curto ou longo tempo e tem como princípio a incorporação pelos parasitos de hipoxantina marcada radioativamente. Contudo, a principal limitação se deve a utilização de radioisótopos, o que eleva o custo deste método e dificulta a utilização no campo, devido necessitar de equipamentos e reagentes específicos (DESJARDINS *et al.*, 1979);

- 3) colorimétricos – baseia-se na detecção e aferição de proteínas do parasito, como por exemplo as HRP2 (Protéina 2 Rica em Histidina de *P. falciparum*) e LDH (Lactato

Desidrogenase de *Plasmodium* sp.). No entanto, a principal limitação se deve ao custo desse método e dificuldade para uso em campo, devido necessitar de equipamentos e reagentes específicos (NOEDL *et al.*, 2002);

4) o *SYBR Green I* – baseia-se na fluorescência que esta molécula emite quando se intercala nas cadeias de DNA dos parasitos. Porém, é um procedimento molecular de custo elevado e inviável para adoção na realidade de campo, devido a necessidade de assegurar infraestrutura laboratorial, além de equipamentos e insumos específicos (BENNETT *et al.*, 2004).

Dentre esses testes, os mais usados são os ensaios de maturação de esquizontes da OMS e o Isotópico. Porém, outros testes de avaliação da sensibilidade *in vitro* dos plasmódios aos antimaláricos têm emergido. Como exemplo, há os ensaios baseados na produção da HRP2¹ ou da enzima pLDH² (DRUILHE *et al.*, 2001; NOEDL *et al.*, 2002; NOGUEIRA & DO ROSÁRIO, 2010).

A importância da utilização dos ensaios *in vitro* para a vigilância fundamenta-se na possibilidade de realizar análises de variações temporais e espaciais da suscetibilidade dos plasmódios a diferentes antimaláricos, baseadas na comparação das concentrações do fármaco capazes de inibir o crescimento do parasito³. Assim, usando esta ferramenta, é possível monitorar a emergência e/ou as variações da resistência, independente da correlação precisa com as respostas de eficácia terapêutica (NOEDL *et al.*, 2002; BASCO, 2007).

1.8.3 Marcadores Moleculares

¹ A HRP2 é uma proteína rica em histidina e alanina, expressa por trofozoítas e gametócitos imaturos de *P. falciparum*. Esta proteína é secretada ativamente no sangue, como antígeno solúvel em água, mesmo durante o desaparecimento das hemácias infectadas nos vasos sanguíneos. Este longo tempo de meia-vida associado à persistência desta proteína mesmo em pacientes tratados com sucesso, limitam a utilização da HRP2 para monitoramento da eficácia terapêutica. Entretanto, para testes de suscetibilidade *in vitro*, a estabilidade desta proteína é uma grande vantagem. Porém, o fator limitador é que se trata de proteína secretada e liberada especificamente pelo *P. falciparum* (NOEDL *et al.*, 2002; NOGUEIRA & DO ROSÁRIO, 2010).

² A pLDH é uma enzima glicolítica produzida pelas formas sexuadas e assexuadas do parasito e é expressa em níveis elevados no estágio eritrocítico, sendo uma das primeiras enzimas plasmodiais relatadas como distintas eletroforicamente, imunologicamente e cineticamente daquelas do hospedeiro, podendo ser usada como indicador da presença do plasmódio e do crescimento parasitário (SHERMAN, 1961). Produzida apenas por parasitos vivos, onde, os níveis de pLDH estão associados à densidade parasitária e demonstra um rápido decréscimo com o início da terapêutica, o que a torna um bom marcador para seguimento de infecção ativa. Diferencia *P. falciparum* de outras espécies de *Plasmodium* devido às diferenças antigênicas entre as isoformas da pLDH (PIPER *et al.*, 1999; DRUILHE *et al.*, 2001; NOEDL *et al.*, 2003; NOGUEIRA & DO ROSÁRIO, 2010).

³ Determinação do IC50 - Concentração Inibitória para o crescimento de 50% dos parasitos ou IC90 - Concentração Inibitória para o crescimento de 90% dos parasitos.

Os marcadores moleculares permitem uma abordagem racional do genótipo de resistência a multidrogas em áreas endêmicas (MAGUIRE *et al.*, 2001). Como exemplo: a) *pfdhfr* e *pfdhps*, onde mutações pontuais conferem resistência a inibidores da dihidrofolato redutase e a dihidropteroato sintetase, relacionados às drogas Pirimetamina e Sulfadoxina, respectivamente (COWMAN *et al.*, 1988; BROOKS *et al.*, 1994; OSMAN *et al.*, 2006); b) o gene citocromo *b*, no qual a mutação pontual Y268S pode ser rapidamente selecionada pela monoterapia com Atavaquona (KORSINCZKY *et al.*, 2000); c) os homólogos do gene de resistência múltipla a drogas (*mdr*) denominados de *pfmdr1* e *pfmdr2*, os quais codificam P-glicoproteínas da família de transportadores ABC (FOOTE *et al.*, 1989; WILSON *et al.*, 1989; ZALIS *et al.*, 1993; PÓVOA *et al.*, 1998); d) o *pfcr1*, que possui mutações pontuais específicas associadas com resistência à CQ (FIDOCK *et al.*, 2000; OSMAN *et al.*, 2006); além de outros transportadores que podem estar envolvidos no genótipo de resistência desta espécie de plasmódio aos compostos quinolólicos (MU *et al.*, 2003).

Genes ortólogos ao *pfdhfr*, *pfcr1* e ao *pfmdr1* vem sendo descritos em *P. vivax* denominados de *pvdhfr*, *pvcg10* e *pvmr1* respectivamente. Em relação ao primeiro, mutações pontuais foram também associadas com resistência a inibidores da dihidrofolato redutase, porém no caso do *pvcg10* e *pvmr1*, nenhuma mutação específica foi associada com resistência a CQ (CQR) (ELDIN DE PECOULAS *et al.*, 1998; NOMURA *et al.*, 2001; SÁ *et al.*, 2005).

Os mecanismos moleculares de resistência parasitária é ferramenta importante para o controle da malária, pois: a) viabiliza a identificação racional de novos alvos terapêuticos; e também, b) permitir o desenvolvimento de novos métodos de detecção e identificação da resistência aos antimaláricos por indivíduo, considerando-se que há correlação entre uma determinada mutação ou mutações devidamente caracterizadas e a resistência a um determinado antimalárico (MAGUIRE *et al.*, 2001; WINZELER, 2008).

A detecção de mutações dos parasitos diretamente associados à resistência, possui vantagens como:

- 1º - necessidade de apenas uma alíquota da amostra de sangue infectado do paciente para o estudo molecular;
- 2º - não sofre influências de fatores ambientais e do hospedeiro;
- 3º - permite que vários testes sejam realizados em menos tempo (MEYER *et al.*, 2002; FIDOCK *et al.*, 2008).

A implementação de marcadores moleculares como métodos de avaliação da resistência depende do conhecimento prévio e adequado dos mecanismos genéticos de resistência para cada fármaco em análise.

Diante desse panorama da resistência dos plasmódios aos antimaláricos, em 1998, os países que compõe a região Amazônica (Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela), com o apoio da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), iniciaram um trabalho para padronizar as metodologias para registrar a magnitude deste problema, promover mudanças nas políticas de medicamentos e, assim, integrar ações conjuntas entre os países. Esta iniciativa culminou com a criação da Rede de Vigilância da Resistência aos Antimaláricos – Iniciativa Amazônia (RAVREDA - AMI) em 2001, que tem como objetivo principal juntar esforços para retroceder a malária na região das Américas (SIBLEY *et al.*, 2007).

1.9 MECANISMOS MOLECULARES ASSOCIADOS À EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA DO *P. falciparum* À CLOROQUINA

O fenótipo de resistência ocorre, em geral, em consequência de mutações espontâneas que contribuem para uma diminuição na sensibilidade à um determinado fármaco. Como estas mutações não são deletérias à sobrevivência do parasito, a pressão seletiva devido à utilização de certa droga leva à eliminação das populações sensíveis e favorece a sobrevivência de parasitos resistentes (THAITHONG *et al.*, 1992; ANDERSON & ROPER, 2005). Dentre os mecanismos básicos de resistência, ao menos dois já foram descritos em populações de *P. falciparum*, são eles a modificação na afinidade de ligação de enzimas dos parasitos e o transporte alterado das drogas aos seus sítios de ação (FLUECK *et al.*, 2000; ANDERSON *et al.*, 2011).

Embora os mecanismos moleculares de desenvolvimento de resistência aos compostos quinolólicos, em especial à Cloroquina (CQ), o medicamento menos dispendioso e o mais seguro contra a malária, ainda não estejam completamente esclarecidos, muitos genes candidatos têm sido identificados como associados ao genótipo de resistência do *P. falciparum* (BRAY *et al.*, 2005; COOPER *et al.*, 2005; OSMAN *et al.*, 2006). No entanto, apenas alguns polimorfismos desses genes são capazes de fornecer dados informativos sobre resistência às drogas antimaláricas.

Em relação a esse fármaco, é de conhecimento que os parasitos resistentes acumulam menor quantidade de CQ no vacúolo digestivo que as sensíveis, indicando que a resistência

pode ser consequência de uma diminuição deste acúmulo (GEARY *et al.*, 1986a; 1986b; SANCHEZ *et al.*, 1997; WÜNSCH *et al.*, 1998) ou ao aumento do seu efluxo (KROGSTAD *et al.*, 1987; WELLEMS *et al.*, 1990). Dois genes, *pfmdr1* e *pfcr1*, têm sido propostos como os principais moduladores da resistência à CQ no *P. falciparum*, ambos codificam produtos (as proteínas PfCRT e Pgh1, respectivamente) localizados na membrana do vacúolo digestivo do parasito (MEYER *et al.*, 2002; CRAVO *et al.*, 2006; ROEPE, 2009).

Em 1989, dois homólogos do gene de resistência múltipla a drogas (*mdr*) foram identificados e denominados de *pfmdr1* e *pfmdr2* localizados, respectivamente, nos cromossomos 5 e 14 do *P. falciparum* (WILSON *et al.*, 1989; GÓMEZ-SALADÍN *et al.*, 1999). As proteínas codificadas por estes homólogos são designadas de: P-glicoproteína homóloga 1 (Pgh1) que está localizada na membrana do vacúolo digestivo do parasito e encontrada nos estágios sanguíneos do *P. falciparum* (RUBIO & COWMAN, 1994) e P-glicoproteína homóloga 2 (*Pgh-2*), também situada nesta mesma membrana do protozoário, expressa somente por trofozoítos (WILSON *et al.*, 1989; ZALIS *et al.*, 1993).

Apesar de alguns estudos demonstrarem que não há associação entre fenótipo de resistência à CQ e pontos de mutação no gene *pfmdr1* (HARUKI *et al.*, 1994; BASCO & RINGWALD, 1997; MCCUTCHEON *et al.*, 1999; FLUECK *et al.*, 2000), há evidências do papel do gene *pfmdr1* e resistência do *P. falciparum* à CQ (ZALIS *et al.*, 1998; REED *et al.*, 2000; PRICE *et al.*, 2004; VIANA *et al.*, 2006). Polimorfismo no códon ^{Asn}86^{Tyr} tem sido relacionado com resistência à CQ em isolados de *P. falciparum* na Nigéria (ADAGU *et al.*, 1995), Guiné Bissau (ADAGU *et al.*, 1996) e Malásia (COX-SINGH *et al.*, 1995). Por outro lado, tem sido demonstrada a associação de polimorfismo nos códons ^{Asn}1042^{Asp} e ^{Asp}1246^{Tyr} do gene *pfmdr1* com resistência *in vitro* à CQ e a ausência de mutação no códon ^{Asn}86^{Tyr} em amostras da América do Sul (ADAGU & WARHURST; 1999a; 1999b; LOPES *et al.*, 2002; VIANA *et al.*, 2006).

Desse modo, os estudos citados acima sugerem que o *pfmdr1* pode desempenhar um papel importante, porém secundário na resistência à CQ, sendo esta determinada por outro gene ou genes, vez que, a análise detalhada da progene do cruzamento entre HB3 (clone sensível à CQ) X Dd2 (clone resistente à CQ) mostrou que o principal gene associado à resistência se encontrava no cromossomo 7 (WELLEMS *et al.*, 1991).

Diante disso, o estudo de marcadores moleculares de resistência do *P. falciparum* à CQ se direcionou para o polimorfismo da proteína codificada pelo gene *pfcr1* (*P. falciparum* resistente à CQ relacionado ao transporte da droga) que contém 13 éxons e está localizado no cromossomo 7 do parasito (ROEPE, 2009; BHARTI *et al.*, 2010; GAMA *et al.*, 2011).

O gene *pfcr*t apresenta entre seis a oito mutações pontuais que podem modular os níveis de suscetibilidade à CQ e já foram associadas com resistência *in vitro* a esta droga em isolados de *P. falciparum* da África, sudeste da Ásia e América do Sul. Em termos de marcadores moleculares de resistência, ressalta-se que uma mutação, a substituição de lisina (K) por treonina (T) na posição 76 (K76T) foi encontrada em todas as amostras resistentes à CQ analisadas em ensaios *in vitro* e *in vivo* (VIANA *et al.*, 2006; BHARTI *et al.*, 2010; GAMA *et al.*, 2011) (Figura 5).

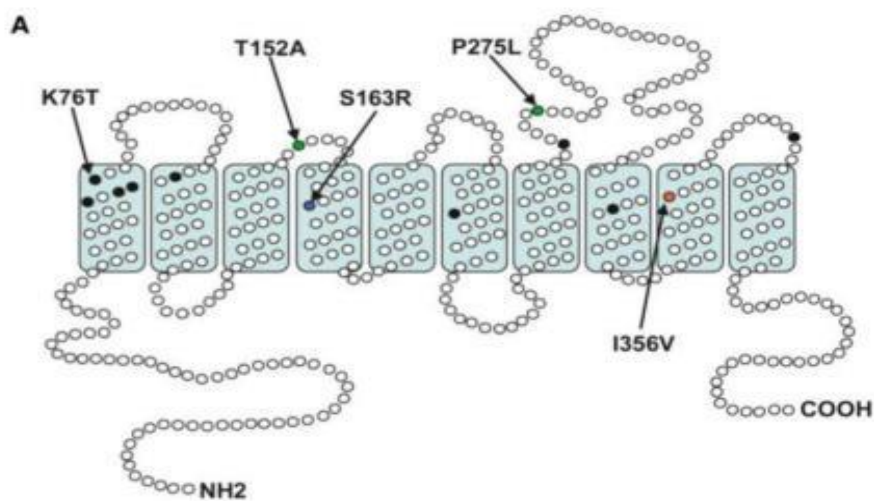


Figura 5 - Estrutura predita da proteína PFCRT, com ênfase as dez alfa-hélices transmembranas e citações em negrito das posições de mutações frequentemente associadas à resistência do *P. falciparum* à CQ (Fonte: Adaptado de Adagu & Warhurst, 2001).

Investigações realizadas para monitorar as frequências de alelos resistentes à CQ ao longo do tempo demonstraram que após um período de dez anos de retirada ou substituição da droga, os genótipos resistentes à CQ em Malawi e na China (KUBLIN *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2005; LAUFER *et al.*, 2006), bem como aqueles resistentes à Sulfadoxina-Pirimetamina (SP) na Amazônia Peruana (ZHOU *et al.*, 2008) declinaram. Razão plausível para a redução na frequência de parasitos resistentes observada pelos estudos acima citados pode estar relacionada ao fato de que populações de parasitos resistentes estavam em desvantagem seletiva na ausência de pressão da droga. Apesar desse declínio observado nas áreas acima citadas, alelos do gene *pfcr*t relacionados à resistência à CQ, assim como os associados à resistência do *P. falciparum* à SP, permaneceram fixados após longo tempo de retirada desses esquemas terapêuticos em estudos conduzidos no Cambódia (KHIM *et al.*, 2005) e na Venezuela (CONTRERAS *et al.*, 2002; MCCOLLUM *et al.*, 2007).

Por outro lado, estudos desenvolvidos por Pelleau *et al.* (2015) e Petersen *et al.* (2015) com amostras oriundas da Guiana Francesa demonstrou que, após um período 17 anos de ausência de uso de CQ para tratamento da malária nesse país, os parasitos perderam a resistência a esta droga, embora a mutação K76T no gene *pfprt* permanecesse fixada na população de parasitos circulantes. Este fenômeno foi atribuído, exclusivamente, à aquisição de uma substituição de cisteína (C) por uma arginina (R) na posição 350 (C350R) no gene *pfprt*. Ademais, esta mesma substituição adicional gerou resistência à Piperaquina, uma bisquinolina que tem um tempo de meia-vida prolongado e vem demonstrando ser altamente ativa frente às cepas de *P. falciparum* e *P. vivax* resistentes à CQ no continente asiático, além de eficácia, segurança, tolerabilidade e baixo custo comparado com a combinação de Artesunato – Mefloquina. (SMITHUIS *et al.*, 2006; KATRAK *et al.*, 2009)

A análise da sequência de todo o genoma (*whole genome sequence*) e estudo de associação genômica em isolados coletados de pacientes infectados com malária comprovou que a mutação C350R foi o único achado associado com a suscetibilidade à CQ. Ademais, a cepa de referência 7G8 (clone de *P. falciparum* resistente à CQ procedente do Brasil) clonada para incorporar a mutação C350R demonstrou uma redução de 24 vezes de resistência à CQ ($P < 0,0001$). Outras análises demonstraram que a mutação C350R surgiu em 2002 e rapidamente aumentou de 2,7% para 58% em 2012 na população *P. falciparum* procedente da Guiana Francesa. (PELLEAU *et al.*, 2015)

Portanto, esta reversão fenotípica foi causada pela aquisição de uma única mutação que aboliu a resistência, ao contrário da situação alternativa em que o gene de tipo selvagem original reemerge na população de parasitos. Na realidade, os estudos na Guiana Francesa revelaram que o alelo selvagem do gene *pfprt* foi drasticamente reduzido da população de parasitos, e que a pequena percentagem de parasitos remanescentes com o haplótipo original importado de outras regiões não foi suficiente para ganhar uma posição na Guiana Francesa durante o período em que o tratamento com CQ tratamento foi abandonado nessa área (PELLEAU *et al.*, 2015).

Os achados observados em populações de *P. falciparum* da Guiana Francesa tem reflexos diretos para a compreensão da evolução da resistência a drogas em áreas de baixa endemicidade, como é a situação do Brasil, onde alelos de resistência a multidrogas já estão alcançando a fixação, um cenário que vai se tornar cada vez mais evidente em decorrência, sobretudo, das estratégias de controle efetivo da malária no país, o que vem reduzindo gradualmente o número de casos de malária ao longo dos últimos cinco anos (PELLEAU *et al.*, 2015; BRASIL, 2016).

Dessa forma, é de extrema importância a vigilância dos genótipos relacionados à resistência do *P. falciparum* às drogas antimaláricas em determinada área para observação da evolução desse fenômeno ao longo do tempo. Pois, na ausência de tal vigilância, torna-se difícil compreender se as mudanças adotadas na política de tratamento para malária em determinado país, realmente alteraram o perfil de parasitos resistentes aos medicamentos empregados para fins terapêuticos.

1.10 ORIGEM E DISPERSÃO DA RESISTÊNCIA DO *P. falciparum* À CLOROQUINA

O fato do aparecimento simultâneo da resistência à CQ no sudeste Asiático e na América do Sul sugeriu, ao menos, duas origens ou *foci* independentes para a resistência a esta droga (PAYNE, 1987; FIDOCK *et al.*, 2000; ZALIS, 2000).

Após esses primeiros indícios, transcorreram 17 anos entre a ocorrência da resistência na Ásia e o aparecimento dos primeiros casos na África. Em seguida, a resistência à CQ se propagou rapidamente em cada um desses continentes, de forma ininterrupta (PAYNE, 1987; FIDOCK *et al.*, 2000; ZALIS, 2000; WHITE, 2004; GREENWOLD *et al.*, 2008; CAMPBELL, 2009).

Análises de mutações pontuais associadas aos marcadores de microssatélites próximos ao gene *pfcr* no cromossomo 7 do *P. falciparum* vêm possibilitando um cenário pormenorizado da evolução da resistência. As mutações pontuais neste gene já demonstraram, ao menos, seis origens independentes dos alelos de resistência. Estas incluem uma origem única para o sudeste da Ásia e África, duas independentes na América do Sul, uma em Papua Nova Guiné, outra na região do Pacífico Sul e origem adicional na Melanésia. Todas as amostras analisadas apresentavam alelos com a mutação K76T, sugerida como crucial para a resistência a CQ (FIDOCK *et al.*, 2000; ANDERSON & ROPER, 2005; HAYTON & SU, 2008; ZHOU *et al.*, 2008; BACON *et al.*, 2009; SÁ *et al.*, 2009; VALDERRAMOS *et al.*, 2010).

Os dados do gene *pfcr* de amostras oriundas dessas áreas também forneceram evidências diretas do papel da migração de populações do parasito na disseminação dos alelos resistentes. Este dado é corroborado por estudos que observaram que a substituição da CQ como medicamento de primeira escolha na África foi resultado da propagação de alelos resistentes do sudeste da Ásia para o continente africano (PAYNE, 1987; SU *et al.*, 1997; MAIGA *et al.*, 2007; SÁ *et al.*, 2009). Outros estudos relataram que estes mesmos alelos também migraram para a América do Sul (PLUMMER *et al.*, 2004; VIEIRA *et al.*, 2004; SÁ *et al.*, 2009) e Filipinas (CHEN *et al.*, 2003).

Alelos resistentes na Ásia e na África tinham sete a oito modificações de aminoácidos adicionais, enquanto aqueles provenientes da América do Sul apresentaram quatro a cinco outras mudanças de aminoácidos e as de Papua Nova Guiné, Pacífico sul e Melanésia possuíam até cinco mudanças. Além disso, os dados de microssatélites provenientes dessas regiões também indicaram as seis origens independentes (WOOTTON *et al.*, 2002; MEHLOTRA *et al.*, 2009; SÁ *et al.*, 2009). Enquanto alelos com combinações únicas de mutações pontuais têm sido localizados no Cambódia (LIM *et al.*, 2003) e nas Filipinas (CHEN *et al.*, 2003).

É importante citar que outros estudos estão sendo conduzidos e poderão revelar origens adicionais da resistência do *P. falciparum* à CQ. Todavia, as rotas para explicar este fenômeno não deverão ultrapassar oito a dez origens prováveis no mundo (PLUMMER *et al.*, 2004; ANDERSON & ROPER, 2005; HAYTON & SU, 2008; MEHLOTRA *et al.*, 2009; VALDERRAMOS *et al.*, 2010; AWASTHI & DAS, 2013).

2 JUSTIFICATIVA

Resistência do *P. falciparum* à CQ está fortemente associada a mutações no gene *P. falciparum* resistente à CQ relacionado ao transportador (*pfcr*), com a mutação K76T considerada o evento crítico, enquanto mutações adicionais (códon 72-75) aumentariam a resistência (ELDIN DE PECOULAS *et al.*, 1998; NOMURA *et al.*, 2001; SÁ *et al.*, 2005). Em regiões com elevada endemicidade, a interrupção do uso de CQ tem conduzido para a restauração do perfil de suscetibilidade à droga, decorrente da reexpansão do alelo selvagem (WT) K76 do gene *pfcr*. Razão plausível para esse evento pode estar associada ao fato que populações de parasitos resistentes estavam em desvantagem seletiva na ausência de pressão da droga.

Já em áreas de baixa transmissão, como é o caso dos países da América do Sul, as mutações de resistência aos medicamentos podem atingir prevalência de 100%, isto é, há fixação de alelos resistentes aos medicamentos antimaláricos, o que impede o retorno de parasitos WT após a remoção completa da droga. No entanto, observou-se na Guiana Francesa que, apesar da fixação do alelo mutante K76T, a prevalência de isolados resistentes à CQ (CQR) (ELDIN DE PECOULAS *et al.*, 1998; NOMURA *et al.*, 2001; SÁ *et al.*, 2005), caiu progressivamente de mais de 90% para menos de 30% após 17 anos de interrupção do uso de CQ no país (PELLEAU *et al.*, 2015; PETERSEN *et al.*, 2015).

Inquérito molecular retrospectivo em isolados da Guiana Francesa identificou uma única mutação em *pfcr* que codificava uma substituição C350R associada com a recuperação da suscetibilidade à CQ nos isolados investigados (PELLEAU *et al.*, 2015). Ademais, o experimento de clonagem da cepa de referência 7G8 (clone de *P. falciparum* resistente à CQ procedente do Brasil) para incorporar a mutação C350R causou uma perda completa do perfil CQR (PELLEAU *et al.*, 2015). Verificou-se que a mutação C350R surgiu em 2002 no país, após sete anos de interrupção do uso da CQ, e rapidamente se espalhou por toda a população de *P. falciparum* (MOURÃO *et al.*, 2014). Além disso, o alelo C350R também está associado com diminuição na susceptibilidade *in vitro* à Piperaquina, medicamento que tem um tempo de meia-vida prolongado e vem demonstrando ser altamente ativo frente às cepas de *P. falciparum* e *P. vivax* resistentes à CQ no continente asiático, sugerindo que a pressão da Piperaquina possa ter selecionado essa mutação (SMITHUIS *et al.*, 2006; KATRAK *et al.*, 2009).

Os dados supramencionados têm implicações importantes para a compreensão da dinâmica evolutiva de resistência às drogas antimaláricas. Como foi verificado esse fenômeno nas populações da Guiana Francesa, torna-se necessário conduzir vigilância molecular para

observação da evolução desse fenômeno ao longo do tempo em outros países da América do Sul e, dessa forma, poder auxiliar os programas de controle da malária na compreensão, prevenção e controle da disseminação da resistência do *P. falciparum* aos antimaláricos (PELLEAU *et al.*, 2015; BRASIL, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar as mutações K76T e C350R associadas à evolução da resistência do *Plasmodium falciparum* à Cloroquina em isolados do estado do Pará, região Amazônica brasileira.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a frequência de parasitos com as mutações K76T e C350R do gene *pfcr* nas amostras investigadas;
- Determinar o perfil da distribuição geográfica das mutações K76T e C350R do gene *pfcr* nos dois municípios do estado do Pará selecionados para o estudo.

4 METODOLOGIA

4.1 AMOSTRA

Para a realização do estudo do tipo transversal retrospectivo, foram analisadas apenas amostras de DNA da espécie *P. falciparum*, obtidas durante o período de 2010 a 2012, que fazem parte do biorrepositório do Laboratório de Pesquisas Básicas em Malária e provenientes dos municípios de Goianésia do Pará e Itaituba, estado do Pará, que foram avaliados somente para a identificação de marcador molecular de resistência à CQ. Ressalta-se que a amostragem que foi utilizada nesse projeto foi oriunda do projeto de pesquisa intitulado “Vigilância da Expressão dos Genes para HRP2 e HRP3 (Proteínas 2 e 3 Ricas em Histidina) em *Plasmodium falciparum* na América do Sul: Uma Avaliação Prospectiva no Brasil”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos (CONEP N° 434/2011, CAAE 0011.1.072.000-10). Além disso, a amostragem proposta será capaz de avaliar a evolução do fenômeno da resistência, com intervalo de confiança de 95%.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS E BIOSSEGURANÇA

Essa pesquisa foi do tipo retrospectivo que, de certo modo, não trouxe qualquer mal aos pacientes/sujeitos da pesquisa, ou seja, não houve riscos físicos e/ou biológicos para os mesmos, uma vez, que o estudo foi meramente descritivo. De outro modo, foi garantido o anonimato de todos os sujeitos/pacientes e, principalmente, mantido a confidencialidade de todo e qualquer resultado obtido pelo pesquisador principal e pelos demais técnicos de levantamento (códigos de identificação de isolados) que serviram apenas para validar a individualidade da informação. Após, foi automatizada uma difusão de conhecimento que auxiliou na compreensão preliminar da evolução da resistência do *P. falciparum* à CQ em área de baixa endemicidade, como é o caso do Brasil. Todo o procedimento envolvendo a manipulação de alíquotas de DNA foi realizado em Laboratório NB2 (Nível de Biossegurança 2), segundo os parâmetros estabelecidos pelas normas de Biossegurança das Comissões Interna de Biossegurança e, também, de Gestão da Qualidade do Instituto Evandro Chagas (CIBIO/IEC e CGQ/IEC).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas (CAAE N° 57903616.2.0000.0019/CEP/IEC/SVS/MS) (Anexo I).

4.3 MÉTODOS LABORATORIAIS

4.3.1 Controle Interno Endógeno

A qualidade do DNA foi avaliada utilizando a β -globina (*Homo sapiens*) como um gene de controle interno. Os isolados foram submetidos a reações de Nested-PCR, seguindo protocolo de Resnick *et al* (1990), produzindo um fragmento ou *amplicon* de 260 pb (pares de bases), o que indicou que o DNA genômico foi extraído adequadamente e ainda factível como fonte de DNA, além de não haver ação de inibidores da reação de PCR. O uso de controle interno endógeno permite também assegurar a qualidade do DNA genômico (RESNICK *et al.*, 1990).

4.3.2 Controle de Qualidade

Foi usado para amplificação do gene *mSP2* (Proteína 2 de Superfície do Merozoíto), uma alíquota do DNA previamente extraído e armazenado por um longo período à uma temperatura de -80°C , bem como, controles positivos e negativos utilizando os *primers* ou iniciadores descritos no Apêndice 1 e de acordo com protocolos padronizados citados por Snounou (2002), González *et al.* (2005) e WHO (2007), para confirmação da presença de DNA específico de plasmódio.

Os produtos amplificados, controles (positivos e negativos) e marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb), foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0% para *mSP2* (Ultra pure agarose, BRL 155517-014) e corados com *GelRed* 10.000x em água (GelRed Nucleic Acid Gel Stain, Biotium®, Uniscience LTDA.). Posteriormente, os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em sistema de fotodocumentação, produzindo *amplicon* de 450 pb nas amostras positivas para *mSP2* - família IC/3D7.

4.3.3 Caracterização Molecular do Gene *pfCRT*

O gene *pfCRT* foi caracterizado através de reações de PCR em duplicata para amplificação das mutações K76T e C350R usando protocolo e iniciadores preconizados por Pelleau *et al.* (2015) (Apêndice 2).

As reações de PCR foram feitas para um volume final de 25 μL contendo, 1 μL de DNA, 0,5 μL de cada oligonucleotídeo iniciador (10 μM), 2,5 μL de tampão 10 X (200mM de Tris-HCl e 500mM de KCl), 2,0 μL de mix de dNTP (10mM), 3,0 μL de MgCl_2 (50mM) e 0,2 μL de AmpliTaq Gold DNA polimerase (5U/ μL).

Para amplificação dos alvos de interesse (K76T e C350R), a mistura de reação foi inicialmente incubada a 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos cada um composto por

etapas de desnaturação 95° por 30 segundos, hibridização dos oligonucleotídeos iniciadores a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. A etapa de extensão final foi feita a 72°C por 5 minutos.

Todas as etapas de PCR foram realizadas em termociclador automático Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific®).

Os produtos da PCR, controles (positivos e negativos) e marcador de peso molecular de 50 pb, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2.0% (Ultra pure agarose, BRL 155517-014) e corados com *GelRed* 10.000x em água (GelRed Nucleic Acid Gel Stain, Biotium®, Uniscience LTDA.).

Por fim, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado em sistema de fotodocumentação, produzindo *amplicon* de 194 pb para a mutação K76T e 121 pb para a C350R nas amostras positivas.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados laboratoriais obtidos referentes ao gene *pfcr*t foram inseridos e guardados em um banco de dados eletrônico no programa Microsoft Access, Biostat® versão 3.5.2 ou equivalente, para em seguida serem analisados sobre a presença ou ausência das mutações K76T e C350R desse gene, utilizando o algoritmo citado no Apêndice 3, para confirmação da ausência ou presença dessas mutações na amostra investigada.

Para análise do banco de dados e elaboração de gráficos e tabelas, foi utilizado o programa *Tableau*® (*Tableau Software Inc.*) ou equivalente.

Para avaliar a possível correlação entre os intervalos de parasitemia e os perfis observados para as combinações dos marcadores K76T e C350R do gene *pfcr*t, utilizou-se o teste G (*Bioestat*® versão 5.0). O nível de significância adotado foi de 0,05 ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

Do total de 75 amostras incluídas na pesquisa coletadas no período de 2010 a 2012 provenientes do estado do Pará, 44,0% (33/75) foram provenientes do município de Goianésia do Pará e 56,0% (42/75) de Itaituba, a média de idade foi de 35 anos (intervalo de 8 – 62 anos), predominando o gênero masculino, com 70,7% de contribuição no estudo. Quanto à existência de deslocamento para outro município no momento da admissão do paciente, nos últimos trinta dias que precederam à época da participação do paciente, 21,3% (16/75) relataram ter viajado. A média geométrica da parasitemia assexuada de todos os pacientes foi 525,4 parasitos/uL (intervalo: 0–62.500), enquanto a média aritmética simples para a parasitemia sexuada foi 108,3 parasitos/uL (intervalo: 0–7.500).

Da amostragem supramencionada, 100,0% (75/75) apresentaram amplificação para o gene da β -globina (*Homo sapiens*), bem como foi observada a amplificação da proteína MSP2, confirmando a presença de DNA de plasmódio em todas as amostras selecionadas para o estudo. Em seguida, estes isolados foram submetidos aos ensaios para caracterização molecular da presença ou ausência das mutações K76T e C350R do gene *pfprt* nas amostras investigadas. Os resultados observados em relação a frequência da distribuição geográfica das mutações K76T, C350R, assim como dos possíveis perfis observados nos isolados analisados, de acordo com a procedência destes isolados, podem ser visualizados nas tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1- Frequência da distribuição geográfica do marcador K76T do gene *pfprt* observado nos municípios de Goianésia do Pará e Itaituba no estado do Pará, no período de 2010 a 2012

Local	K76T presença		K76T ausência		Total
	N (%)	IC (95%)	N (%)	IC (95%)	
Goianésia do Pará	30 (90,9%)	89.6–98.1	3 (9,1%)	7.3–10.6	33
Itaituba	34 (81,0%)	69.6–90.3	8 (19,0%)	12.5–24.1	42

N: Número de amostras relacionadas ao evento, %: Percentual, IC: Intervalo de confiança, Total: número total de amostras dos municípios investigados.

Tabela 2- Frequência da distribuição geográfica do marcador C350R do gene *pfprt* observado nos municípios de Goianésia do Pará e Itaituba no estado do Pará, no período de 2010 a 2012.

Local	C350R presença		C350R ausência		Total
	N (%)	IC (95%)	N (%)	IC (95%)	
Goianésia do Pará	32 (97,0%)	90.6–100	1 (3,0%)	2.1–5.2	33
Itaituba	41 (97,6%)	92.4–100	1 (2,4%)	1.5–4.1	42

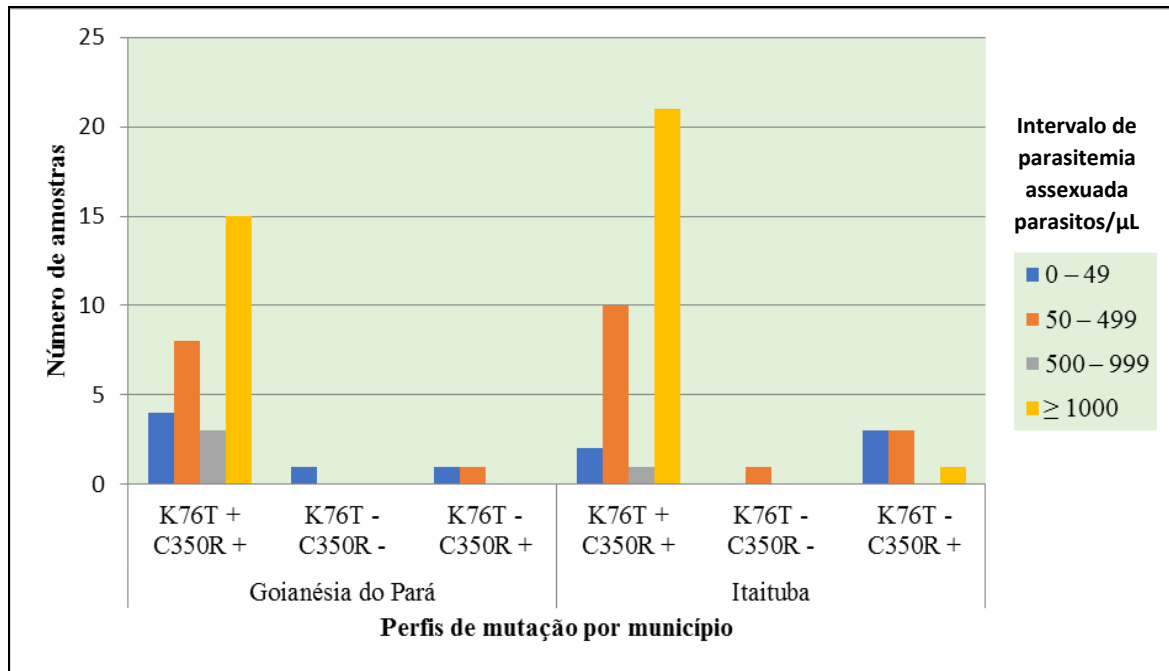
N: Número de amostras relacionadas ao evento, %: Percentual, IC: Intervalo de confiança, Total: número total de amostras dos municípios investigados.

Tabela 3- Perfis observados para as combinações dos marcadores K76T e C350R do gene *pfprt*, em amostras procedentes dos municípios de Goianésia do Pará e Itaituba no estado do Pará, no período de 2010 a 2012.

Local	Marcadores	K76T+	K76T-	K76T+	K76T-	Total
		C350R+	C350R-	C350R-	C350R+	
		N (%), IC (95%)	N (%), IC (95%)	N (%), IC (95%)	N (%), IC (95%)	
Goianésia do Pará		30 (90,9%) (87.6–97.1)	1 (3,0%) (2.4–4.9)	-	2 (6,1%) (4.5–8.9)	33
Itaituba		34 (81,0%) (80.1–93.2)	1 (2,3%) (1.5–3.9)	-	7 (16,7%) (12.4–19.8)	42

+: Presença, -: Ausência, N: Número de amostras relacionadas ao evento, %: Percentual, IC: Intervalo de confiança, -: Não observado, Total: número total de amostras dos municípios investigados.

Quanto à possibilidade de associação entre os intervalos de parasitemia assexuada detectados pelo estudo e os perfis observados para as possíveis combinações dos marcadores K76T e C350R do gene *pfprt* nos municípios investigados, os achados estão demonstrados no gráfico 1. No caso da parasitemia sexuada, considerando que em mais de 50,0% da amostragem analisada não foi detectada a presença de gametócitos, essa abordagem não foi realizada.



+: Presença, -: Ausência, μL : Microlitro.

Gráfico 1- Correlação entre intervalo de parasitemia assexuada e os perfis observados para as combinações dos marcadores K76T e C350R do gene *pfrct*, nos municípios de Goianésia do Pará e Itaituba no estado do Pará, no período de 2010 a 2012.

Ressalta-se que a análise da correlação entre os intervalos de parasitemia detectados e os perfis observados para as combinações dos marcadores K76T e C350R do gene *pfrct* obtiveram valores de p não significativos pelo teste G, tanto para a correlação entre o perfil da presença de ambas as mutações (K76T e C350R) associadas à parasitemia assexuada igual ou maior que 1.000 parasitos/ μL ($p= 0,4397$), como para a associação entre ausência da mutação K76T e presença da C350R e intervalos de parasitemia de até 499 parasitos/ μL ($p= 0,9106$), tanto para Goianésia do Pará como para Itaituba, demonstrando ausência de correlação entre esses parâmetros avaliados por esse projeto-piloto.

6 DISCUSSÃO

Esse projeto-piloto foi proposto para identificar as mutações K76T e C350R associadas à evolução da resistência do *P. falciparum* à CQ em isolados do estado do Pará, região Amazônica brasileira. Diante disso, essa investigação contribuiu para aprimorar a compreensão da dinâmica evolutiva de resistência às drogas antimaláricas, bem como para auxiliar o programa nacional da malária na compreensão, prevenção e controle da disseminação da resistência do *P. falciparum* aos antimaláricos.

Em relação aos dados sócio-demográficos e epidemiológicos da amostragem analisada, observou-se média de idade de 35 anos (intervalo de 8 – 62 anos), preponderância de indivíduos do gênero masculino (53 pacientes, 70,7%) e que 21,3% dos sujeitos da pesquisa relataram viagem para outro município ou cidade nos trinta dias que antecederam a admissão no estudo. Esses achados corroboram os achados observados por Oliveira-Ferreira *et al.* (2010) e Marques (2014), bem como são também visualizados pelos relatórios gerados pelo sistema SIVEP-Malária, que evidenciam indivíduos do gênero masculino na faixa etária de 30 – 45 anos e com estória de fluxo populacional intra e inter-municípios de áreas endêmicas na Amazônia brasileira, como os mais vulneráveis à infecção, sobretudo em áreas de fronteiras, extrativismo vegetal e mineral.

Quanto à densidade parasitária observada na amostragem selecionada para o estudo, identificou-se média geométrica da parasitemia assexuada de 525,4 parasitos/uL (intervalo: 0–62.500) e média aritmética simples para a parasitemia sexuada de 108,3 parasitos/uL (intervalo: 0–7.5000). Considerando que essa amostragem se trata de infecções por *P. falciparum*, bem como o intervalo das parasitemias assexuadas e sexuadas, esses dados estão de acordo com aqueles já relatados por Garcia *et al.* (2010), Oliveira-Ferreira *et al.* (2010), Braz *et al.* (2014) e Mourão *et al.* (2014), sugerindo que as infecções por *P. falciparum*, espécie que infecta hemácias de qualquer idade evolutiva e responsável por quadros clínicos severos, normalmente cursam com densidades parasitárias assexuadas da ordem de 100 – 1.000 parasitos/uL e sexuadas de 50 – 200 parasitos/uL.

Os achados desse estudo demonstram a circulação de populações de *P. falciparum* albergando a mutação K76T em 90,9% da amostragem analisada oriunda de Goianésia do Pará e 81,0% no município de Itaituba. Essa percentagem elevada de isolados com essa mutação, que tem sido reportada como associada a altos níveis de resistência à CQ nos países da América do Sul, corrobora os achados de Vieira *et al.* (2004), Viana *et al.* (2006), Sá *et al.* (2009) e Gama *et al.* (2011), que encontraram frequência de até 100,0 % para esta mutação em amostras da região Amazônica brasileira coletadas nas décadas de 1990 e 2000.

Portanto, há indícios que a mutação K76T esteja fixada nessa área, como consequência da forte pressão seletiva da droga. Quanto à fixação dessa mutação na área investigada, algumas explicações são possíveis para explicar esse fato. Inicialmente, mesmo que a CQ não seja mais empregada para o tratamento da malária não-complicada causada por *P. falciparum* desde o final da década de 70 no Brasil, este fármaco ainda é amplamente utilizado no país como esquema de primeira escolha para o tratamento da malária por *P. vivax*, espécie responsável por 80,0% das notificações no Brasil (DUARTE *et al.*, 2001; BRASIL, 2017), além de ser empregado no tratamento de doenças reumáticas, dentre outras. Consequentemente, pode-se prever que o uso contínuo dessa droga durante todas essas décadas nessa população possa ter conduzido para a fixação desse marcador de resistência à CQ no Brasil, como também foi observado em outros países da América do Sul, como Peru e Venezuela (BACON *et al.*, 2009; GRIFFING *et al.*, 2010).

Outra hipótese possível para explicar essa fixação seria a de que o alelo do gene *pfcr* que circula no Brasil parece ter pouca ou nenhuma desvantagem de *fitness* na ausência de pressão de droga, como sugerido por Sá *et al.* (2005) ou ainda que não haja circulação de populações sensíveis à CQ remanescentes nessa área, para poder competir e substituir os genótipos resistentes. Quanto a esta última explicação parece não ser o caso, devido à presença de alelo relacionado à sensibilidade do *P. falciparum* à CQ em uma única amostra proveniente de Paragominas (Pará) coletada em 2000 (GAMA *et al.*, 2009).

Assim, há preocupação de que a fixação desse marcador molecular tenderia a permanecer na região Amazônica, em consequência desse fenômeno também ser observado em países Amazônicos vizinhos, como Peru (BACON *et al.*, 2009), Suriname (MCCOLLUM *et al.*, 2007), Venezuela (GRIFFING *et al.*, 2010) e Guiana Francesa (PELLEAU *et al.*, 2015).

Diante disso, estudos desenvolvidos em Malawi e na China para monitorar as frequências de alelos resistentes à CQ ao longo do tempo relataram que, após um período de dez anos de retirada ou substituição dessa droga, os genótipos resistentes à CQ declinaram nessas áreas, devido ao fato de que populações de parasitos resistentes estavam em desvantagem seletiva na ausência de pressão da droga (KUBLIN *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2005; LAUFER *et al.*, 2006).

Por outro lado, investigações conduzidas no Cambódia por Khim *et al.* (2005), na Venezuela por Contreras *et al.* (2002) e McCollum *et al.* (2007) e, mais recentemente, por Pelleau *et al.* (2015) na Guiana Francesa, demonstraram que os alelos do gene *pfcr*

relacionados com a resistência à CQ ainda permanecem fixados nessas áreas, mesmo após longo tempo de retirada desse medicamento.

No entanto, a prevalência de isolados resistentes à CQ (CQR) na Guiana Francesa diminuiu progressivamente de mais de 90,0% para menos de 30,0% após 17 anos de interrupção do uso de CQ no país (PELLEAU *et al.*, 2015; PETERSEN *et al.*, 2015). E, de acordo com Pelleau *et al.* (2015), esse evento foi decorrente de reversão fenotípica causada pela aquisição de uma única mutação no gene *pfprt*, que eliminou completamente o efeito da mutação de resistência K76T, em oposição ao cenário alternativo do ressurgimento de alelos selvagens sensíveis à CQ.

Isso significa dizer que o retorno da susceptibilidade à CQ na Guiana Francesa não foi tão direto como observado no Malawi e na China, onde CQR desapareceu completamente, culminando com a recomendação de reintrodução do tratamento de *P. falciparum* com o uso da CQ nesses países (FROSCH *et al.*, 2014). Na realidade, houve o aparecimento e disseminação de mutação de único nucleotídeo (SNP) adicional na Guiana Francesa. Ressalta-se que a taxa diferencial de reversão da CQR na Guiana Francesa, em oposição ao observado em Malawi, pode estar relacionada às diferenças na intensidade da transmissão, dinâmica populacional e história do uso de drogas entre esses dois contextos epidemiológicos. Ademais, mesmo após 18 anos de retirada da CQ na Guiana Francesa, ainda há 25% dos isolados com perfil de CQR *in vitro*, fato este que compromete a reintrodução da CQ como droga de escolha para tratamento de *P. falciparum* nessa área (PELLEAU *et al.*, 2015; PETERSEN *et al.*, 2015).

Quanto ao surgimento do SNP supramencionado, trata-se de polimorfismos nas proximidades de C350R no gene *pfprt*, observado após experiências *in vitro* de seleção de medicamentos em cepas de CQR, que geraram linhagens mutantes com perfil de resistência ao Quinino e recuperação da susceptibilidade à CQ (COOPER *et al.*, 2007).

Dessa forma, é de extrema importância a condução de ações de vigilância da resistência do *P. falciparum* às drogas antimaláricas em determinada área, para análise da evolução desse fenômeno ao longo do tempo. Pois, na ausência de tal monitoramento, torna-se difícil avaliar o efeito das políticas de tratamento para malária em determinado país, bem como conter ou evitar a disseminação, emergência ou mesmo reemergência dessa resistência a médio e longo prazo (ZALIS, 2000; PETERSEN *et al.*, 2015).

Quanto à emergência e propagação da resistência do *P. falciparum* aos antimaláricos, um dos principais fatores que contribuem para esses fenômenos está relacionado à pressão da droga. Pois, a própria CQ foi utilizada nas diferentes localidades da região Amazônica

brasileira em dosagens subcurativas. Isto é, utilizava-se uma quantidade da substância ativa desse fármaco em concentração abaixo da preconizada pelo Ministério da Saúde, mantendo a pressão da droga com dosagem insuficiente para alcançar o total clareamento parasitário e cura clínica e parasitológica do paciente (COUTO *et al.*, 1993).

Outro fenômeno que também ocorre nessa região, principalmente em áreas de extrativismo vegetal e mineral, como é o caso do município de Itaituba (Pará), é a automedicação. Essa ação conduz ao insucesso terapêutico, uma vez que na população de parasitos remanescentes podem ser selecionados aqueles parasitos resistentes, já que as mutações relacionadas à resistência não são deletérias à sobrevivência do parasito e, dessa forma, a pressão seletiva devido à utilização de certa droga levaria à eliminação das populações sensíveis e favoreceria a sobrevivência de parasitos resistentes (THAITHONG *et al.*, 1992; ANDERSON & ROPER, 2005).

Portanto, a tríade composta pela pressão da droga, dosagem sub-terapêutica e automedicação deve ter cooperado para a perda da eficácia terapêutica da CQ como droga de escolha para tratamento de malária causada por *P. falciparum* em localidades da região Amazônica brasileira (ZALIS, 2000).

Nesse projeto-piloto, analisou-se também a frequência de parasitos com a mutação C350R do gene *pfcr1* nas amostras investigadas ao longo de dois anos, o que possibilitou o alcance de achados relevantes em termos da vigilância da resistência aos antimaláricos em área da Amazônia brasileira, como pode ser observado nas explicações a seguir.

No estado do Pará, foi detectada a presença de parasitos com a mutação C350R em 97,0% e 97,6% da população investigada nos municípios de Goianésia do Pará e Itaituba, respectivamente. Além disso, a avaliação das possíveis combinações de perfis observados para os marcadores K76T e C350R do gene *pfcr1*, em amostras procedentes dos municípios analisados, demonstrou que a combinação da presença simultânea das mutações K76T e C350R predominou na amostragem analisada, alcançando frequência de até 90,9%, como observado no município de Goianésia do Pará.

Considerando o intenso fluxo migratório, sobretudo de população de garimpeiros, entre as áreas de fronteiras que compreendem o Brasil, a Guiana Francesa e o Suriname, assim como o achado da mutação C350R em amostras de *P. falciparum* oriundas da Guiana Francesa (PELLEAU *et al.*, 2015), a presença da mutação C350R em área da Amazônia brasileira era evento esperado, conforme observado em nosso estudo. No entanto, os resultados do nosso estudo são limitados às amostras coletadas em apenas dois municípios de um único estado da região Amazônica brasileira e em período relativamente curto (dois anos).

Sendo assim, nossos achados não devem ser generalizados para o estado do Pará, tampouco para outras áreas da Amazônia brasileira. Dessa maneira, para que esse tipo de estudo possa fornecer informações representativas sobre a distribuição ou prevalência desse marcador molecular para todo o território que compreende a Amazônia brasileira, deve-se conduzir investigação mais abrangente e representativa para avaliar a emergência e prevalência das mutações K76T e C350R no estado do Pará, assim como em áreas estratégicas dos estados do Acre, Amazonas, Roraima e Amapá, por também fazerem fronteira com outros países amazônicos.

Nesse estudo, nós não adotamos a realização de controle interno das reações de PCR para caracterização molecular do gene *pfcr*, embora tenhamos inserido o controle interno endógeno, assim como realizado a amplificação do gene *msh2* (Proteína 2 de Superfície do Merozoíto), para confirmação da presença de DNA de plasmódio. Contudo, diante do fato do algoritmo proposto para o estudo só confirmar um resultado diante de dois testes consecutivos concordantes, esse fato não comprometeu o alcance dos objetivos estabelecidos para o nosso estudo e, dessa forma, não incluímos esse ensaio.

Ademais, é necessário citar outra limitação importante, como a ausência de reação de sequenciamento e análise das sequências obtidas, que restringiu os nossos resultados à análise descritiva da presença ou ausência de mutações pontuais relacionadas ao fenômeno da evolução da resistência do *P. falciparum* à CQ em área da Amazônia brasileira.

Outro achado observado nesse estudo se refere à ausência de correlação entre o perfil de combinação da presença das mutações K76T e C350R associado à parasitemia assexuada igual ou maior que 1.000 parasitos/ μ L ($p= 0,4397$), como para a associação entre ausência da mutação K76T e presença da C350R e intervalos de parasitemia de até 499 parasitos/ μ L ($p= 0,9106$), tanto para Goianésia do Pará como para Itaituba. Esse fato sugere que, ao menos para a amostragem analisada nesse projeto-piloto, não houve correlação significativa entre os marcadores moleculares investigados e determinado limiar de parasitemia assexuada, embora tenhamos observado que diante de parasitemias menores ou iguais a 499 parasitos/ μ L, uma ou mesmo as duas mutações podem estar ausentes. Porém, nesse momento, não temos uma compreensão precisa do real papel da associação entre as duas mutações no cromossomo 7 do gene *pfcr* e níveis ou intervalos de parasitemia. Estudos sobre a evolução dessas mutações em outras áreas e com amostragem mais expressiva serão fundamentais para determinar se há, realmente, alguma ligação entre os parâmetros analisados ou trata-se de achado pontual.

Entretanto, deve-se ressaltar que esse estudo representa o primeiro indício do processo evolutivo relacionado ao gene *pfcr* no estado do Pará, região Amazônica brasileira.

Nesse cenário epidemiológico de área de baixo nível de transmissão da malária associado à ausência de alelo do gene *pfcr* sensível à CQ, há indícios que a susceptibilidade às drogas evoluiu por meio da aquisição de uma substituição adicional de aminoácidos, ao invés de reversão de uma mutação previamente existente (PELLEAU *et al.*, 2015; PETERSEN *et al.*, 2015).

Torna-se importante também comentar que, provavelmente, os fatores que estimulam a aquisição de susceptibilidade à CQ seriam, portanto, um processo de múltiplas etapas, que se processam por um acúmulo de mudanças adaptativas, incluindo mutações adquiridas em outros *loci* do gene *pfcr*, sendo a mutação C350R o passo final e/ou crucial de uma inversão do fenótipo de CQR. A implementação sucessiva, ao longo do tempo, de vários esquemas de tratamento de primeira escolha para malária por *P. falciparum*, deve ter ocasionado um cenário de seleção natural que foi atuando continuamente no gene *pfcr* e, conseqüentemente, impactando na eficácia do *P. falciparum* a multidrogas, dentre elas à CQ (COOPER *et al.*, 2007; PELLEAU *et al.*, 2015).

A presença dessa mutação específica (C350R) relacionada a um mecanismo particular de reversão da CQR, observada pela primeira vez em amostras do estado do Pará, deve ser avaliada com cautela, mas também com a devida atenção para determinar se esse achado reflete um evento evolutivo local ou se já está propagado para outros estados da região Amazônica brasileira. Enfatiza-se também que esse projeto-piloto forneceu evidências que endossam a necessidade de serem implementados sistemas de monitoramento e vigilância, apropriados e representativos para identificar e monitorar a emergência, propagação e prevalência das mutações relacionadas ao fenômeno de resistência do *P. falciparum* aos antimaláricos na região Amazônica brasileira, assim com em outras áreas da América do Sul.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que:

- Os municípios de Goianésia do Pará e Itaituba no estado do Pará apresentaram frequências de 90,9% (30/33) e 81,0% (34/42) para a mutação K76T, respectivamente. Por outro lado, a mutação C350R apresentou percentuais de 97,0% (32/33) no município de Goianésia do Pará e 97,6% (41/42) em Itaituba.

- Houve predominância da presença simultânea das mutações K76T e C350R na amostragem analisada oriunda de dois municípios do estado do Pará, sendo que o município de Goianésia do Pará alcançou frequência expressiva de 90,9%.

- Observou-se ausência de correlação entre o perfil de combinação da presença das mutações K76T e C350R associado à parasitemia assexuada igual ou maior que 1.000 parasitos/ μ L ($p= 0,4397$), assim como para a associação entre ausência da mutação K76T e presença da C350R e intervalos de parasitemia de até 499 parasitos/ μ L ($p= 0,9106$), tanto para Goianésia do Pará como para Itaituba.

- É necessário manter o monitoramento da identificação e prevalência dessas mutações nessa área e outros locais da região Amazônica brasileira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAGU, I.S.; DIAS, F.; PINHEIRO, L.; ROMBO, L.; ROSARIO, V.; WARHURST, D.C. Guinea Bissau: associations of chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* with Tyr86 allele of the multiple drug-resistance gene *Pfmdr1*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 90:90, 1996.
- ADAGU, I. S.; WARHURST, D. C. Allele-specific, nested, one tube PCR: application to *Pfmdr 1* polymorphisms in *Plasmodium falciparum*. **Parasitology**, **119**: 1-6, 1999b.
- ADAGU, I. S.; WARHURST, D. C. Association of *cg2* and *pfmdr1* genotype with chloroquine resistance in field samples of *Plasmodium falciparum* from Nigeria. **Parasitology**, **119**: 343-348, 1999a.
- ADAGU, I.S.; WARHURST, D. C. *Plasmodium falciparum*: Linkage disequilibrium between loci in chromosomes 7 and 5 and chloroquine selective pressure in Northern Nigeria. **Parasitology**, **123**: 219-224, 2001.
- ADAGU, I.S.; WARHURST, D. C.; CARUCCI, D. J.; DURAISINGH, M. T. *Pfmdr1* mutations and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Zaria, Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **89**: 132-139, 1995.
- ANDERSON, T. J. C.; NKHOMA, S.; ECKER, A.; FIDOCK, D. How can we identify parasite genes that underlie antimalarial drug resistance? **Pharmacogenomics**, **12 (1)**: 59-85, 2011.
- ANDERSON, T. J. C.; ROPER C. The origins and spread of antimalarial drug resistance: Lessons for policy makers. **Acta Tropica**, **94**: 269-280, 2005.
- ANDERSON, T. J. C.; SU, X. Z.; BOCKAIRE, M.; LAGOG, M.; DAY, K. P. Twelve microsatellite markers for characterisation of *Plasmodium falciparum* from finger prick blood samples. **Parasitology**, **119**: 113-125, 1999.
- AWASTHI, G; DAS, A. Genetics of chloroquine-resistant malaria: a haplotypic view. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **108 (8)**: 947-961, 2013.
- AYALA, F.J. Darwin and the scientific method. **Proceedings of Nature Academy of Science of United States of America**, **106**: 10033-10039, 2009.
- BACON, D. J.; MCCOLLUM, A. M. ; GRIFFING, S. M.; SALAS, C.; SOBERON, V.; SANTOLALLA, M.; HALEY, R.; TSUKAYAMA, P.; LUCAS, C.; ESCALANTE, A. A.; UDHAYAKUMAR, V. Dynamics of malaria drug resistance patterns in the Amazon Basin Region following changes in Peruvian National Treatment Policy for uncomplicated malaria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **35 (5)**: 2042-2051, 2009.
- WHITE, N. J. Drug resistance in malaria. **British Medical Bulletin**, **54 (3)**: 703-715, 1998a.
- BARATA, R. C. B. Malaria in Brazil: Trends in the Last Ten Years. **Cadernos de Saúde Pública**, 1995.

BASCO, L. K. Field application of *in vitro* assays for the sensitivity of human malaria parasites to antimalarial drugs. **World Health Organization/WHO**: 202, 2007.

BASCO, L.K.; RINGWALD, P. *Pfmdr1* gene mutation and clinical response to chloroquine in Yaoundé, Cameroon. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **91**:210-211, 1997.

BENNETT, T. N.; PAGUIO, M.; GLIGORIJEVIC, B.; SEUDIEU, C.; KOSAR, A.D.; DAVIDSON, E.; ROEPE, P. D. Novel, Rapid, and Inexpensive Cell-Based Quantification of Antimalarial Drug Efficacy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **48** (5): 1807-1810, 2004.

BHARTI, P. K.; ALAM, M. T. ; BOXER, R.; SHUKLA, M. M.; GAUTAM, S. P.; SHARMA, Y. D.; SINGH, N. Therapeutic efficacy of chloroquine and sequence variation in *pfprt* gene among patients with *falciparum* malaria in central India. **Tropical Medicine & International Health**, **15** (1): 33-40, 2010.

BOWMAN, S.; CHURCHER, C.; LAWSON, D.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLIGWORTH, T.; CHURCHER, C. M.; CRAIG, A.; DAVIES, R. M.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; GWILLIAM, R.; HAMLIN, N.; HARRIS, D.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; HORROCKS, P.; JAGELS, K.; JASSAL, B.; KYES, S.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MUNGALL, K.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; RUTTER, S.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J. E.; WHITEHEAD, S.; WOODWARD, J. R.; NEWBOLD, C.; BARRELL, B. G. The complete nucleotide sequence of chromosome 3 of *Plasmodium falciparum*. **Nature**, **400** (6744): 532-538, 1999.

BRADT, S. Managing Malaria, Beating the Mosquito in the Amazon Jungle. **Harvard University Center for the Environment**, **3** (3): 13-15, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde – SVS. **Esquemas recomendados para o tratamento da malária não complicada no Brasil – Nota Técnica PNCM**. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde-SVS. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malaria**. 2ª ed., 2009a.

BRASIL. Ministério da Saúde-SVS. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária**. 2ª ed., 2009b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia Prático de Tratamento da Malária no Brasil**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Serie A. Normas e Manuais Técnicos. 2ª Edição. 36p. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informação e Vigilância Epidemiológica da Malária. SIVEP/Malária**. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informação e Vigilância Epidemiológica da Malária. SIVEP/Malária**. Disponível em <http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/default.asp>. Acesso em: 20 mai. 2017.

BRAY, P. G.; MUNGTHIN, M.; RIDLEY, R. G.; WARD, S. A. Access to hematin: the basis of chloroquine resistance. **Molecular Pharmacology**, **54**:170-179, 1998.

BRAY, P.G.; MARTIN, R.E.; TILLEY, L.; WARD, S.A.; KIRK, K.; FIDOCK, D. A. Defining the role of PFCRT in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance. **Molecular Microbiology**, **56**: 323-333, 2005.

BRAZ, R.M.; DUARTE, E.C.; TAUIL, P.L. Algoritmo para monitoramento da incidência da malária na Amazônia brasileira, 2003 a 2010. **Revista Panamericana de Salud Publica**, **35** (3): 186-92, 2014.

BRONNER, U.; DIVIS, P.C.; FARNERT, A.; SIGH, B. Swedish traveler with *Plasmodium knowlesi* malaria after visiting Malaysian Borneo. **Malaria Journal**, **8**: 15, 2009.

BROOKS, D. R.; WANG, P.; READ, M.; WETKINS, W. M.; SIMS, P. F.; HYDE, J. E. Sequence variation of the hydroxymethyl dihydropterin pyrophosphate kinase: dihydropteroyl synthase gene in lines of the human malaria parasites, *Plasmodium falciparum*, which differing resistance to sulfadoxine. **European Journal of Biochemistry**, **224**: 397-405, 1994.

BRUCE, M. C.; ALANO, P.; DUTHIE, S.; CARTER, R. Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. **Parasitology**, **100**: 191-200, 1990.

BRUCE-CHWATT, L. J. History of malaria from prehistory to eradication. In: **Malaria: Principles and Practice of Malariology**. McGregor, I. A. (ed.). Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne and New York, 1988. p. 1-60.

CAMARGO, L. M.; OLIVEIRA, S.; BASANO, S.; GARCIA, C. R. S. Antimalarials and the fight against malaria in Brazil. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, **5**: 311-317, 2009.

CAMPBELL, C. C. Malaria Control — Addressing Challenges to Ambitious Goals. **The New England Journal of Medicine**, **361** (5): 522-523, 2009.

CASTRO, M.C.; MONTE-MOR, R.L.; SAWYER D.O.; SINGER, B.H. Malaria risk on the Amazon frontier. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of American**, **103**: 2452-2457, 2006.

CASTRO, SINGER, B.H. Meio ambiente e saúde: metodologia para análise espacial da ocorrência de malária em projetos de assentamento. **Revista Brasileira de estudos de populações**, **24** (2): 247-262, 2007.

CHEN, N.; KYLE, D. E.; PASAY, C.; FOWLER, E.V.; BAKER, J.; PETERS, J. M.; CHENG, Q. pfcrt allelic types with two novel amino acid mutations in chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from the Philippines. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, **47**: 3500–3505, 2003.

CONTRERAS, C. E.; CORTESE, J. F.; CARABALLO, A.; PLOWE, C. V. Genetics of drug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in the Venezuelan state of Bolívar. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **67**: 400-405, 2002.

COOPER, R. A.; HARTWIG, C. L.; FERDIG, M. T. *Pfcr* is more than *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance gene: a functional and evolutionary perspective. **Acta Tropica**, **94**: 170-180, 2005.

COOPER, R. A.; LANE, K. D.; DENG, B.; MU, J.; PATEL, J. J.; WELLEMS, T. E.; SU, X.; FERDIG, M. T. Mutations in transmembrane domains 1, 4 and 9 of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter alter susceptibility to chloroquine, quinine and quinidine. **Molecular Microbiology**, **63** (1): 270–282, 2007.

COUTO, A. A., CALVOSA, V. S.; LIMA, J. E.; SOUZA, J. M. Evolução da resistência *in vitro* do *Plasmodium falciparum* a antimaláricos em área de prospecção de ouro no Estado do Amapá, entre 1983 e 1990. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **26**: 215-220, 1993.

COWMAN, A. F.; MORRY, M. J.; BIGGS, B. A.; CROSS, G. A. FOOTE, S. J. Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, **85**: 9109-9113, 1988.

COX, F.E.G. History of the discover of the malaria parasites and their vectors. **Parasites & Vectors**, **3** (5): 1-9, 2010.

COX-SINGH J.; SINGH, B. *Knowlesi* malaria: newly emergent and of public health importance? **Trends in Parasitology**, **24** (9): 406-410, 2008.

COX-SINGH, J.; SINGH, B.; ALIAS, A.; ABDULLAH, M. S. Assessment of the association between three *pfmdr1* point mutations and chloroquine resistance *in vitro* of Malaysia *Plasmodium falciparum* isolates. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **89**: 436-437, 1995.

CRAVO, P.; CULLETON, R.; AFONSO, A.; FERREIRA, I. D.; DO ROSÁRIO, V. E. Mechanisms of drug resistance in malaria: Current and new challenges. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry**, **5** (5): 63-73, 2006.

DESJARDINS, R. E.; CANFIELD, C. J.; HAYNES, J. D.; CHULAY, J. D. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **16**: 710-718, 1979.

DRUILHE, P.; MORENO, A.; BLANC, C.; BRASSEUR, P. H.; JACQUIER, P. A colorimetric *in vitro* drug sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **64** (6): 233-241, 2001.

DUARTE, E. C.; PANG, L. W.; RIBEIRO, L. C.; FONTES, C. J. Association of subtherapeutic dosages of a standard drug regimen with failures in preventing relapses of *vivax* malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **65** (5): 471-476, 2001.

DUARTE, E.C.; RAMALHO, W.M.; TAUIL, P.L.; FONTES, C.J.F.; PANG, L. The changing distribution of malaria in the Brazilian Amazon, 2003-2004 and 2008-2009. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **47 (6)**: 763-769, 2014.

ELDIN de PECOULAS, P.; BASCO, L. K.; TAHAR, R.; OUATAS, T.; MAZABRAUD, A. Analysis of *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene sequence. **Gene**, **211**: 177-185, 1998.

FARID, Z.; KILPATRICK, M. E.; CHIODINI, P. L. Parasitic Diseases of the Liver. In: **Diseases of the Liver**. Schiff, L. & Schiff, E. R. (eds.). Philadelphia, Lipincott Company, 1993. p. 1338-1355.

FEARNSIDE, P.M. Social impacts of Brazil's Tucuruí Dam. **Environmental Management**, **24 (4)**: 483-495, 2002.

FIDOCK, D. A.; EASTMAN, R. T.; WARD, S. A.; MESHNICK, S. R. Recent highlights in antimalarial drug resistance and chemotherapy research. **Trends in Parasitology**, **24 (12)**: 537-544, 2008.

FIDOCK, D. A.; NOMURA, T.; TALLEY, K. A.; COOPER, A. R.; DZECUNOV, M. S.; FERDIG, T. M.; URSOS, M. L.; SIDHU, A. B.; NAUDE, B.; DEITSCH, W. K.; SU, X.; WOOTTON, C. J.; ROEPE, D. P.; WELLEMS, E. T. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein *PfCRT* and evidence for their role in chloroquine resistance. **Molecular Cell**, **6**: 861-871, 2000.

FLUECK, T. P.; JELINEK, T.; KILIAN, A. H. D.; ADAGU, I. S.; KABAGAMBE, G.; von SONNENBURG, F.; WARHURST, D. C. Correlation of *in vivo*-resistance to chloroquine and allelic polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Uganda. **Tropical Medicine and International Health**, **5 (3)**: 174-178, 2000.

FOOTE, S. J.; THOMPSON, J. K.; COWMAN, A. F.; KEMP, D. J. Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P. falciparum*. **Cell**, **57**: 921-930, 1989.

FRASSON, A. P.; BARLETTE, A. G.; DALPIZOLO, C.; SAUTER, I. P.; MACEDO, A. J.; TASCA, T. Estratégias e desafios no combate à malária. **Revista Liberato**, **10 (14)**: 201-208, 2009.

FROSCHE, A. E.; LAUFER, M. K.; MATHANGA, D. P.; TAKALA-HARRISON, S.; SKARBINSKI, J.; CLAASSEN, C. W.; DZINJALAMALA, F. K.; PLOWE, C. V. Return of widespread chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* to Malawi. **Journal of Infection Disease**, **210 (7)**: 1110-1114, 2014.

GAMA, B. E.; OLIVEIRA, N. K. A.; ZALIS, M. G.; SOUZA, J. M.; SANTOS, F.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; FERREIRA-DA-CRUZ, M. F. Chloroquine and sulphadoxine-pyrimethamine sensitivity of *Plasmodium falciparum* parasites in a Brazilian endemic area. **Malaria Journal**, **8**: 1-5, 2009.

GAMA, B. E.; LACERDA, M. V. G.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; FERREIRA-DA-CRUZ, M. F. Chemoresistance of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasites in Brazil:

consequences on disease morbidity and control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 106 (Suppl. I):** 159-166, 2011.

GARCIA, L. S. Malária. **Clinics in Laboratory Medicine, 30:** 93-129, 2010.

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. A.; 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, S. W.; FRASER, C. M.; BARRELL, B. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Nature, 419:** 498-511, 2002.

GEARY, T. G.; BONANNI, L. C.; JENSEN, J. B.; GINSBURG, H. Effects of combinations of quinoline-containing antimalarials on *Plasmodium falciparum* in culture. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 80 (3):** 285-291, 1986a.

GEARY, T. G.; BONANNI, L. C.; JENSEN, J. B.; GINSBURG, H. Uptake of [3H] chloroquine by drug-sensitive and -resistant strains of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Biochemical Pharmacology, 35 (21):** 3805-3812, 1986b.

GILLES, H. M. The malaria parasite. In: **Essential Malariology**. Gilles, H. M.; Warrell, D. A. (eds.). London, Edward Arnold, 1993. p. 12-34.

GÓMEZ-SALADÍN, E., FRYAUFF, D.J.; TAYLOR, W. R. J.; LAKSANA, B. S.; SUSANTI, A. I.; PURNAMO; SUBIANTO, B.; RICHIE, T. L. *Plasmodium falciparum*, *mdr1* mutations and *in vivo* chloroquine resistance in Indonesia. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene, 61 (2):** 240-244, 1999.

GONZÁLEZ, L.; OCHO, J.; FRANCO, L.; ARROYAVE, M.; RESTREPO, E.; BLAIR, S.; MAESTRE, A. Nosocomial *Plasmodium falciparum* infections confirmed by molecular typing in Medellín, Colômbia. **Malaria Journal, 4:** 1-5, 2005.

GREENWOOD, B.M.; FIDOCK, D.A.; KYLE, D.E.; KAPPE, S.H.I.; ALONSO, P.L.; COLLINS, F.H.; DUFFY, P.E. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. **The Journal of Clinical Investigation, 118 (4):** 1266-1276, 2008.

GRIFFING, S.; SYPHARD, L.; SRIDARAN, S.; MCCOLLUM, A. M.; MIXSON-HAYDEN, T. VINAYAK, S.; et al. *pfmdr1* Amplification and Fixation of *pfcr1* Chloroquine Resistance Alleles in *Plasmodium falciparum* in Venezuela. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 54:** 1572-1579, 2010.

HALL, N.; PAIN, A.; BERRIMAN, M.; CHURCHER, C.; HARRIS, B.; HARRIS, D.; MUNGALL, K.; ET AL. Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 1, 3-9 e 13. **Nature, 419:** 527-531, 2002.

HARUKI, K.; BRAY, P.G.; WARD, S. A.; HOMMEL, M.; RITCHIE, G. Y. Chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum*: further evidence for a lack of association with

mutations of the *pfmdr1* gene. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **88**: 694, 1994.

HAWLEY, S.R.; BRAY, P.G.; MUNGTHIN, M.; ATKINSON, J. D.; O'NEILL, P. M.; WARD, S. A. Relationship between antimalarial drug activity, accumulation and inhibition of heme polymerization in *Plasmodium falciparum* *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **42**: 682-686, 1998.

HAYTON, K.; SU, X. Drug resistance and genetic mapping in *Plasmodium falciparum*. **Current Genetics**, **54**: 223–239, 2008.

KATRAKI, S.; GASASIRA, A.; ARINAITWE, E.; KAKURU, A.; WANZIRA, H.; BIGIRA, V.; et al. Safety and tolerability of artemether-lumefantrine versus hydroartemisinin-piperaquine for malaria in young HIV-infected and uninfected children. **Malaria Journal**, **8** (272): 1-8, 2009.

KEMP, D. J.; COWMAN, A. F.; WALLIKER, D. Genetic diversity in *Plasmodium falciparum*. **Advances in Parasitology**, **29**: 75-149, 1990.

KHIM, N.; BOUCHIER, C.; EKALA, M. T.; INCARDONA, S.; LIM, P.; LEGRAND, E.; JAMBOU, R.; DOUNG, S.; PUIJALON, O. M.; FANDEUR., T. Countrywide survey shows very high prevalence of *Plasmodium falciparum* multilocus resistance genotypes in Cambodia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **49**: 3147–3152, 2005.

KORSINCZKY, M.; CHEN, N.; KOTECKA, B.; SAUL, A.; RIECKMANN, K.; CHENG, Q. Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome *b* that are associated with atovaquone resistance are located at putative drug-binding site. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **44**: 2100-2108, 2000.

KROGSTAD, D. J.; GLUZMAN, I.Y.; KYLE, D. E.; ODUOLA, A. M.; MARTIN, S. K., MILHOUS, W. K.; SCHLESINGER, P. H. Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. **Science**, **238** (4831): 1283-1285, 1987.

KUBLIN, J. G.; CORTESE, J. F.; NJUNJU, E. M.; MUKADAM, R. A. G.; WIRIMA, J. J.; KAZEMBE, P. N.; DJIMDE, A. A.; KOURIBA, B.; TAYLOR, T. E.; PLOWE, C. V. Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. **Journal of Infectious Diseases**, **187**: 1870-1875, 2003.

LABBÉ, A. C.; BUALOMBALAI, P.; PILLAI, D. R.; ZHONG, K. J. Y.; VANISAVETH, V.; HONGVANTHONG, B.; LOOAREESUWAN, S.; KAIN, K. C. Molecular markers for chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Thailand and Laos. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, **95** (8): 781-788, 2001.

LAUFER, M. K. Monitoring Antimalarial Drug Efficacy: Current Challenges. **Current Infectious Diseases Reporter**, **11** (1): 59-65, 2009.

LAUFER, M. K.; THESING, P. C.; EDDINGTON, N. D.; MASONGA, R.; DZINJALAMALA, F. K.; TAKALA, S. L.; TAYLOR, T. E.; PLOWE, C. V. Return of Chloroquine Antimalarial Efficacy in Malawi. **The New England Journal of Medicine**, **355** (19): 1959-1966, 2006.

- LE BRAS, J. ; DURAND, R.. The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, **17 (2)**: 147-153, 2003.
- LEE, KIM-SUNG.; COX-SINGH, J.; BROOKE, G.; MATUSOP, A. & SINGH, B. *Plasmodium knowlesi* from archival blood films: Further evidence that human infections are widely distributed and not newly emergent in Malaysian Borneo. **Intrational Journal of Parasitology**, **39 (10)**: 1125-1128, 2009a.
- LIM, P. ; CHY, S. ; ARIEY, F. ; INCARDONA, S. ; CHIM, P. ; SEM, R. ; et al. *pfprt* polymorphism and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* strains isolated in Cambodia. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, **47**: 87–94, 2003.
- LOPES D.; NOGUEIRA F.; GIL J. P.; FERREIRA C.; DO ROSARIO, V. E.; CRAVO P. *pfprt* and *pfmdr1* mutations and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* from Sao Tome and Principe, West Africa. **Annals of Tropical Medicine in Parasitology**, **96**: 831-834, 2002.
- MACHADO, R. L. D. **Dinâmica de Populações do *Plasmodium falciparum* Welch, 1897 da Região Amazônica Brasileira**. Tese de Doutorado, Belém, Universidade Federal do Pará, Museu Paraense Emílio Goeldi e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2001. 141p.
- MAGUIRE, J. D.; SUSANTI, A. I.; KRISIN. The T76 mutation in the *Pfprt* gene of *Plasmodium falciparum* and clinical chloroquine resistance phenotypes in Papua, Indonesia. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, **95 (6)**: 559-572, 2001.
- MAIGA, O.; DJIMDE, A. A.; HUBERT, V.; RENARD, E.; AUBOUY, A. ; KIRONDE, F.; et al. A shared Asian origin of the triple-mutant dhfr allele in *Plasmodium falciparum* from sites across Africa. **Journal of Infectious Diseases**, **196**: 165–172, 2007.
- MARQUES, A. C. Human migration and the spread of malaria in Brazil. **Parasitology Today**, **3 (6)**: 166-170, 1987.
- MARQUES, A. C. Migrations and dissemination of malaria in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **81 (Supl. II)**: 39-41, 1986.
- MARQUES, R.D. A Geografia da Malária na Faixa de Fronteira Brasileira. In: Fronteiras: Um constante desafio territorial. **REBRAGEO. Rio de Janeiro**. p. 977-984, 2014.
- MARQUES, A. C.; GUTIERREZ, H. C. Combate à malária no Brasil: evolução, situação atual e perspectivas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **27 (Supl. III)**: 91-108, 1994.
- MCCOLLUM, A. M. ; MUELLER, K. ; VILLEGAS, L.; UDHAYAKUMAR, V.; ESCALANTE, A. A. Common Origin and Fixation of *Plasmodium falciparum* dhfr and dhpS Mutations Associated with Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistance in a Low-Transmission Area in South America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **51**: 2085-2091, 2007.
- MCCUTCHEON, K. R.; VEALE, R.B.; FREAN, J. A.; MARKUS, M. B. Rapid detection of *cg2* polymorphisms in chloroquine-resistant and -sensitive isolates of

Plasmodium falciparum. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**, **93** (3): 326-328, 1999.

MEHLOTRA, R. K.; HENRY-HALLDIN, C. N.; ZIMMERMAN, P. A. Application of pharmacogenomics to malaria: a holistic approach for successful chemotherapy. **Pharmacogenomics**, **10** (3): 435–449, 2009.

MÉNARD, R. The journey of the malaria sporozoite through its hosts: two parasite proteins lead the way. **Microbes and Infection**, **2**: 633-642, 2000.

MEYER, C. G.; MAY, J.; AREZ, A. P.; GIL, J. P.; DO ROSARIO, V. Review: Genetic diversity of *Plasmodium falciparum*: asexual stages. **Tropical Medicine and International Health**, **7** (5): 395-408, 2002.

MOTA, M.M.; RODRIGUEZ, A. Invasion of mammalian host cells by *Plasmodium* sporozoites. **Bioessay**. **24** (2): 149-156, 2002.

MOURÃO, F.R.; CUNHA, A.C.; SILVA, R.A.; SOUZA, E.B. A vigilância da malária na Amazônia Brasileira. **Biota Amazônia**. **4** (2): 161-168, 2014.

MU, J.; FERDIG, M. T.; FENG, X.; JOY, D. A.; DUAN, J.; FURUYA, T.; SUBRAMANIAN, G.; ARAVIND, L.; COOPER, R. A.; WOOTTON, J. C.; XIONG, M.; SU, X. Z. Multiple transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine. **Molecular Microbiology**. **49**: 977-989, 2003.

NEVES, D. P.; MELO, I.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia Humana**. 12^a Ed. Editora Atheneu. Rio de Janeiro. 2011, p. 143-161.

NOEDL, H.; WERNSDORFER, W. H.; MILLRT, R. S.; WONGSRICHANALAI, C. Histidine-rich protein II: a novel approach to malaria drug sensitivity testing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **46**: 1658-1664, 2002.

NOGUEIRA, F.; ROSARIO, V.E. Métodos para avaliação da atividade antimalárica nas diferentes fases do ciclo de vida do *Plasmodium*. **Revista Pan-Amazonica de Saúde**, **1** (3): 109-124, 2010.

NOMURA, T.; CARLTON, J. M.; BAIRD, J. K.; DEL PORTILLO, H. A.; FRYAUFF, D. J.; RATHORE, D.; FIDOCK, D. A.; SU, X.; COLLINS, W. E.; MCCUTCHAN, T. F.; WOOTTON, J. C.; WELLEMS, T. E. Evidence for different mechanisms of chloroquine resistance in 2 *Plasmodium* species that cause human malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, **183** (11): 1653-1661, 2001.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M.V.G.; BRASIL, P.; LADISLAU, J.L.B.; TAUIL, P.L.; DANIEL-RIBEIRO, C.T.R. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, **115** (9): 115-128, 2010.

OSMAN, M. E.; MOCKENHAUPT, F. P.; BIENZLE, U.; ELBASHIR, M. I.; GIHA, H. A. Field based evidence for linkage of mutations associated with chloroquine (pfcrt/pfmdr1) and sulfadoxine-pyrimethamine (pfdhfr/pfdhps) resistance and for the fitness cost of multiple mutations in *P. falciparum*. **Infectious Genetic Evolutionary**, **6**: 110-116, 2006.

PAGOLA, S.; STEPHENS, P. W.; BOHLE, D. S.; KOSAR, A. D.; MADSEN, S. K. The structure of malaria pigment beta-haematin. **Nature**, **16**; 404(6775):307-10. 2000.

PASSOS, A. D. C.; FIALHO, R. R. Malaria: aspectos epidemiológicos e de controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **31**: 93-105, 1998.

PAULINO, W. R. **Biologia atual: seres vivos e fisiologia**. São Paulo: Ática, v. 2, 2004.

PAYNE, D. Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. **Parasitology Today**, **3**: 241–246, 1987.

PELLEAU, S.; MOSS, E. L.; DHINGRA, S. K.; VOLNEY, B.; CASTERAS, J.; GABRYSZEWSKI, S. W. J.; VOLKMAN, S. K.; WIRTH, D. F.; LEGRAND, E. FIDOCK, D. A.; NEAFSEY, D. E; MUSSET, L. Adaptive evolution of malaria parasites in French Guiana: Reversal of chloroquine resistance by acquisition of a mutation in *pfcr1*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **112 (37)**: 11672–11677, 2015.

PETERSEN, I.; GABRYSZEWSKI, S. J.; JOHNSTON, G. L.; DHINGRA, S. K.; ECKER, A.; LEWIS, R. E.; ALMEIDA, M. J.; STRAIMER, J.; HENRICH, P. H.; PALATULAN, E.; JOHNSON, D. J.; COBURNFLYNN, O.; SANCHEZ, C.; LEHANE, A. M.; LANZER, M.; FIDOCK, D. A. Balancing drug resistance and growth rates via compensatory mutations in the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter. **Molecular Microbiology**, **97 (2)**: 381–395, 2015.

PIPER, R.; LE BRAS, J.; WENTWORTH, L.; HUNT-COOKE, A.; HOUZE, S.; CHIODINI, P.; MACKLER, M. Immunocapture diagnostic assays for malaria using *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **6**: 109-118, 1999.

PLUMMER, W. B.; PEREIRA, L. M. P.; CARRINGTON, C. V. F. Pfcrt and pfmdr1 Alleles Associated with Chloroquine Resistance in *Plasmodium falciparum* from Guyana, South America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, **99 (4)**: 389-392, 2004.

PÓVOA, M.M., ADAGU, I.S., OLIVEIRA, S. G.; MACHADO, R. L. D.; MILES, M. A.; WARHURST, D. C. *Pfmdr1*^{Asn1042Asp} and *Pfmdr1*^{Asp1246Tyr} polymorphisms, thought to be associated with chloroquine resistance, are present in chloroquine-resistant and -sensitive Brazilian field isolates of *Plasmodium falciparum*. **Experimental Parasitology**, **88**: 64-68, 1998.

PRICE RN, UHLEMANN AC, BROCKMAN A, MCGREADY R, ASHLEY E, PHAIPUN L, et al. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased pfmdr1 gene copy number. **Lancet**, **364**: 438-447, 2004.

RACHOU, R. G. Anofelinos no Brasil. Comportamento das Espécies Vetoras da Malária. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, **33**: 129-138, 1958.

REED, M.B.; SALIBA, K.J.; CARUANA, S. R.; KIRK, K.; COWMAN, A. F. *Pgh1* modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. **Nature**, **403**: 906-909, 2000.

RESNICK, R.M.; CORNELISSEN, M.T.; WRIGHT, D.K.; EICHINGER, G.H.; FOX, H.S. Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. **Journal Natl Cancer Institute** **82 (18)**: 1477–1484,1990.

REY, L. **Parasitologia**. 4 ed., Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2008. p. 385-395.

RIDLEY, R.G. Malaria: dissecting chloroquine resistance. **Current Biology**, **8 (10)**: 346-349, 1998.

ROEPE, P. D. The Molecular and Physiologic Basis of Quinoline Drug Resistance in *P. falciparum* Malaria. **Future Microbiology**, **4 (4)**: 441-455, 2009.

RUBIO, J.P.; COWMAN, A. *Plasmodium falciparum*: The *pfmdr2* protein is not overexpressed in chloroquine-resistant isolate of the malaria parasite. **Experimental Parasitology**, **79**: 137-147, 1994.

SÁ, J. M.; NOMURA, T.; NEVES, J.; BAIRD J. K.; WELLEMS, T. E.; DEL PORTILLO, H. A. *Plasmodium vivax*: allele variants of the *mdr1* gene do not associate with chloroquine resistance among isolates from Brazil, Papua, and monkey-adapted strains. **Experimental Parasitology**, **109 (4)**: 256-259, 2005.

SA, J. M.; TWUA, O.; HAYTONA, K.; REYESA, S.; FAYB, M. P.; RINGWALD, P.; WELLEMS, T. E. Geographic patterns of *Plasmodium falciparum* drug resistance distinguished by differential responses to amodiaquine and chloroquine. **Proceedings of National Academy of Sciences**, **106 (45)**: 18883–18889, 2009.

SABBATINI, S., FIORINO, S., MANFREDI, R. The emerging of fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*). A public concern? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, **14 (3)**: 299-309, 2010.

SANCHEZ, C. P.; WUNSH, S.; LANZER, M. Identification of a chloroquine importer in *Plasmodium falciparum* differences in import kinetics are genetically linked with the chloroquine resistant phenotype. **Journal of Biological Chemistry**, **272**: 2652-2658, 1997.

SHERMAN, I. W. Heterogeneity of lactic dehydrogenase in avian malaria (*Plasmodium lophurae*). **Journal of Experimental Medicine**, **114**: 1049-1062, 1961.

SIBLEY, C. H.; BARNES, K. I.; PLOWE, C. V. The rationale and plan for creating a World Antimalarial Resistance Network (WARN). **Malaria Journal**, **6**: 1-3, 2007.

SIGH, B.; KIM, S.L.; MATUSOP, A.; RADHAKRISHNAN, A.; SHAMSUL, S.S.; COX-SINGH, J. THOMAS, A.; CONWAY, D.J. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. **Lancet**, **363**: 1017-1024, 2004.

SMITHUIS, F.; KYAW, M. K.; PHE, O. Efficacy and effectiveness of dihydroartemisinin-piperaquine versus artesunate-mefloquine in *falciparum* malaria: an open-label randomized comparison. **Lancet**, **367**: 2075-2085, 2006.

SNOUNOU, G.; VIRIYAKOSOL, S.; JARRA, W.; THAITHONG, S.; BROWN, K. N. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase

chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. **Molecular Biochemical Parasitology**, **58**: 283-292, 2002.

SU, X.; KIRKMAN, L.A.; FUJIOKA, H.; WELLEMS, T. E. Complex polymorphisms in an approximately 330 kDa protein are linked to chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in Southeast Asia and Africa. **Cell**, **91 (5)**: 593-603, 1997.

SULLIVAN, D. J.; GLUZMAN, I. Y.; GOLDBERG, D. E. *Plasmodium* hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. **Science**, **271**: 219-222, 1996.

TAUIL, P. L. Perspectives of vector borne diseases control in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **39 (3)**: 275-277, 2006.

TAUIL, P. L. The prospect of eliminating malaria transmission in some regions of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **106**: 105-106, 2011.

THAITHONG, S.; CHAN, S.W.; SONGSOMBOON, S.; WILAIRAT, P.; SEESOD, N.; SUEBLINWONG, T.; GOMAN, M.; RIDLEY, R.; BEALE, G. Pyrimethamine resistant mutations in *Plasmodium falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **52 (2)**: 149-158, 1992.

VALDERRAMOS, S. G.; VALDERRAMOS, J. C.; MUSSET, L. ; PURCELL, L. A. ; MERCEREAU-PUIJALON, O. ; LEGRAND, E. ; FIDOCK, D. A. Identification of a Mutant PfCRT-Mediated Chloroquine Tolerance Phenotype in *Plasmodium falciparum*. **Plos Pathogens**, **6**: 1-14, 2010.

VALE, N.; MOREIRA, R.; GOMES, P. Quimioterapia da Malária um Século de Desenvolvimento de antimaláricos. **Revista Química**, **99**: 57-69, 2005.

VIANA, G.M.R., MACHADO, R.L.D., CALVOSA, V.S.P., PÓVOA, M.M. Mutations in the *pfmdr1*, *cg2*, and *pfprt* genes in *Plasmodium falciparum* samples from endemic malaria areas in Rondonia and Pará State, Brazilian Amazon Region. **Cadernos de Saúde Pública**, **Rio de Janeiro**, **22 (12)**: 2703-2711, 2006.

VIEIRA, P. P.; FERREIRA, M. U.; ALECRIM, M. G.; ALECRIM, W. D.; DA SILVA, L. H.; SIHUINCHA, M.M.; JOY, D. A.; MU, J.; SU, X. Z.; ZALIS, M.G. *Pfprt* polymorphism and the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* populations across the Amazon Basin. **Journal of Infectious Diseases**, **183**: 1832-1833, 2004.

WANG, X.; MU, J.; LI, G.; CHEN, P.; GUO, X.; FU, L.; CHEN, L. I. N.; SU, X.; WELLEMS, T. E. Decreased prevalence of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter 76T marker associated with cessation of chloroquine use against *P. falciparum* malaria in Hainan, People's Republic of China. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **72**: 410-414, 2005.

WELLEMS, T. E.; PANTON, L. J.; GLUZMAN, I. Y.; DO ROSARIO, V. E.; GWADZ, R.W.; WALKER-JONAH, A.; KROGSTAD, D.J. Chloroquine resistance not linked to *mdr*-like genes in a *Plasmodium falciparum* cross. **Nature**, **345 (6272)**: 253-255. 1990.

WELLEMS, T.E., WALKER-JONAH, A., PANTON, L.J. Genetic mapping of the chloroquine-resistance locus on *Plasmodium falciparum* chromosome 7. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **88 (8)**: 3382-3386, 1991.

WHITE, N. J. Drug resistance in malaria. **British Medical Bulletin**, **54 (3)**: 703-715, 1998a.

WHITE, N. J. Why is that antimalarial drug treatments do not always work? **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, **92**: 449-458, 1998b.

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

WHO. World Health Organization. Chemotherapy of Malaria and Resistance to Antimalarials. Report of a WHO scientific group. **WHO Technical Report Series**, **529**. Geneva: WHO. 1973.

WHO. World Health Organization. **Instructions for the use of the *in vitro* 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: 1997.

WHO. World Health Organization. **The use of antimalarial drugs.** Report of an Informal Consultation. WHO/CDS/RBM/2001.33. Geneva. 2001.

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

WHO. World Health Organization. **Malaria vector control and personal protection: report of a WHO study group.** WHO technical report series, 936. Geneva. 2006.

WHO. World Health Organization. **Methods and techniques for clinical trials on antimalarial drug efficacy: genotyping to identify parasite populations.** Informal consultation organized by the Medicines for Malaria Venture and cosponsored by the World Health Organization. 2007

WHO. World Health Organization. **Malaria microscopy quality assurance manual.** Version 1. (ed) Regional Office for the Western Pacific. Manila, 2010.

WHO. World Health Organization. **Global Malaria Programme. Policy brief on malaria diagnostics in low-transmission settings.** WHO/HTM/GMP/2014.7. Geneva. 2014.

WILSON, C.M., SERRANO, A.E.; WASLEY, A.; BOGENSCHUTZ, M. P.; SHANKAR, A. H.; WIRTH, D. F. Amplification of a gene related to mammalian *mldr* genes in drug-resistant *Plasmodium falciparum*. **Science**, **244**: 1184-1186, 1989.

WINZELER, E. A. Malaria research in the post-genomic era. **Nature**, **455**: 751-755, 2008.

WOOTTON, J.C.; ENG, X.; FERDIG, M. T.; COOPER, R. A.; MU, J.; BARUCH, D.I., MAGILL, A. J.; SU, X. Z. Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. **Nature**, **418**: 320-323, 2002.

WÜNSCH, S., SANCHEZ, C.P., GEKLE, M., GROSSE-WORTMANN, L., WIESNER, J., LANZER, M. Differential stimulation of the Na⁺/H⁺ exchanger determines chloroquine uptake in *Plasmodium falciparum*. **The Journal of Cell Biology**, **140 (2)**: 335-345, 1998.

ZALIS, M G. Malaria drug resistance. **Ciência e Cultura: Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, 2000.

ZALIS, M, G.; WILSON, C.M.; ZHANG, Y.; WIRTH, D. F. Characterization of the *pfmdr2* gene from *Plasmodium falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **62**: 82-83, 1993.

ZALIS, M. G.; PANG, L.; SILVEIRA, M. S.; MILHOUS, W. K.; WIRTH, D. F. Characterization of *Plasmodium falciparum* isolated from the Amazon region of Brazil: evidence for quinine resistance. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **52**: 213-219, 1998.

ZHOU, Z.; GRIFFING, S. M.; OLIVEIRA, A. M.; MCCOLLUM, A. M.; QUEZADA, W. M.; ARROSPIDE, N.; et al. Decline in Sulfadoxine-Pyrimethamine-Resistant Alleles after Change in Drug Policy in the Amazon Region of Peru. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **52**: 739-741, 2008.

ANEXO I

INSTITUTO EVANDRO
CHAGAS/IEC/SVS/MS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação de Marcador Molecular Associado à Evolução da Resistência do Plasmodium falciparum à Cloroquina em Isolados da Região Amazônica Brasileira.

Pesquisador: Giselle Maria Rachid Viana

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 57903616.2.0000.0019

Instituição Proponente: Instituto Evandro Chagas/SVS/MS

Patrocinador Principal: Instituto Evandro Chagas

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.825.267

Apresentação do Projeto:

O presente estudo tem como finalidade identificar mutações associadas à evolução da resistência do Plasmodium falciparum à Cloroquina em isolados do estado do Pará, região Amazônica brasileira, analisando a frequência de parasitos com as mutações K76T e C350R do gene pfcrt em isolados de DNA e determinar a distribuição geográfica das mutações investigadas na amostragem analisada. Este estudo é do tipo transversal retrospectivo e observacional, sem intervenção clínica, em que serão analisadas apenas amostras de DNA da espécie Plasmodium falciparum, obtidas durante o período de 2011 a 2013, que fazem parte do biorepositório do Laboratório de Pesquisas Básicas em Malária e provenientes dos municípios de Goianésia do Pará e Itaituba, estado do Pará, que serão avaliados somente para a identificação de marcador molecular de resistência à Cloroquina.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivos:

- Identificar a mutação C350R associada à evolução da resistência do Plasmodium falciparum à

Endereço: Rodovia BR-316, Km 07, S/N

Bairro: Levilândia

CEP: 67.030-000

UF: PA

Município: ANANINDEUA

Telefone: (91)3214-2237

Fax: (91)3214-2233

E-mail: seac@iec.pa.gov.br

ANEXO I (Continuação)

INSTITUTO EVANDRO
CHAGAS/IEC/SVS/MS



Continuação do Parecer: 1.825.267

6. Encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e
7. Justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_760054.pdf	06/10/2016 14:33:20		Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartadeAnuenciaNathaliaChamma.pdf	06/10/2016 14:26:29	Giselle Maria Rachid Viana	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartadeAnuencialzisSucupira.pdf	06/10/2016 14:26:10	Giselle Maria Rachid Viana	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartadeAnuenciaEduardoSantos.pdf	06/10/2016 14:25:23	Giselle Maria Rachid Viana	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPilotoPropostaGMRVFinal05102016.pdf	06/10/2016 14:23:11	Giselle Maria Rachid Viana	Aceito
Declaração de Pesquisadores	GiselleAnuenciaMarinetePovoa_13072016.pdf	15/07/2016 12:24:11	Giselle Maria Rachid Viana	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Giselle20151208InvitationLetterIEC.pdf	15/07/2016 12:22:15	Giselle Maria Rachid Viana	Aceito
Declaração de Pesquisadores	GiselleDeclaracaodeAnuenciaChefiaeLaboratorio.pdf	15/07/2016 12:21:39	Giselle Maria Rachid Viana	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	GiselleAnuencialInstituicao.pdf	15/07/2016 12:20:28	Giselle Maria Rachid Viana	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	GiselleDeclaracaodelsencaoTCLE.pdf	15/07/2016 12:19:03	Giselle Maria Rachid Viana	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPiloto_PropostaGMRV_Final13072016.pdf	15/07/2016 12:14:38	Giselle Maria Rachid Viana	Aceito
Folha de Rosto	GiselleFolhad RostoPlataformaBrasil.pdf	15/07/2016 12:14:02	Giselle Maria Rachid Viana	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rodovia BR-316, Km 07, S/N
 Bairro: Levilândia CEP: 67.030-000
 UF: PA Município: ANANINDEUA
 Telefone: (91)3214-2237 Fax: (91)3214-2233 E-mail: seac@iec.pa.gov.br

APÊNDICE I

Pares de *primers* ou iniciadores para amplificação do gene *msp2*, descritos por Snounou (2002), González *et al.* (2005) e WHO (2007).

1) PRIMEIRA REAÇÃO

MSP-2:

M2-OF 5'- ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATA-3'

M2-OR 5'- CTTTGTTACCATCGGTACATTCTT-3'

2) SEGUNDA REAÇÃO

MSP-2:

IC/3D7-type

M2-ICF 5'-AGAAGTATGGCAGAAAGTAAKCCTYCTACT-3'

M2-ICR 5'- GATTGTAATTCGGGGGATTCAGTTTGTTCG-3'

APÊNDICE II

Tabela de pares de *primers* ou iniciadores para reações de PCR para identificação das mutações K76T e C350R do gene *pfert* de *P. falciparum* descritos por Pelleau *et al.* (2015).

Sequência do nucleotídeo			
Nome do <i>Primer</i>	(5' → 3')	Mutação	Comprimento do <i>amplicon</i> (pb)
A033 (F)	GGTGGAGGTTCTTGCTTG	K76T	194
A034 (R)	ATAAAGTTGTGAGTTTCGGATG		
A410 (F)	GCTTTTTATAGATTATCGAC	C350R	121
A411 (R)	CTTTTAATTCTTACGGCTA		

pb: Pares de bases.

APÊNDICE III

Algoritmo para análise dos dados referente à identificação de mutações K76T e C350R do gene *pfcr*t na amostra estudada.

