

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA
EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

DHÉLIO BATISTA PEREIRA

**ESTUDO DE EFICÁCIA E SEGURANÇA DE UM NOVO CO-
BLISTER DE CLOROQUINA E PRIMAQUINA PARA
TRATAMENTO DE MALÁRIA POR *Plasmodium vivax* NÃO
COMPLICADA**

RIO DE JANEIRO

2016

ESTUDO DE EFICÁCIA E SEGURANÇA DE UM NOVO CO-
BLISTER DE CLOROQUINA E PRIMAQUINA PARA
TRATAMENTO DE MALÁRIA POR *Plasmodium vivax* NÃO
COMPLICADA

DHÉLIO BATISTA PEREIRA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas
para obtenção do grau de Doutor.

Orientadora:

Profa. Dra. Graziela Maria Zanini

Rio de Janeiro
2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

P436 Pereira, Dhélio Batista

Estudo de eficácia e segurança de um novo co-blister de cloroquina e primaquina para tratamento de malária por *plasmodium vivax* não complicada / Dhélio Batista Pereira. – Rio de Janeiro, 2016.

xii, 129 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2016.

Bibliografia: f. 85-96

1. Plasmodium vivax. 2. Cloroquina. 3. Primaquina. 4. Ensaio clínico. 5. Tratamento. I. Título.

CDD 616.93620610724

Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas

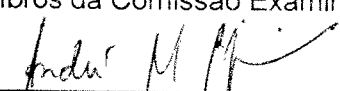
Ata da Sessão Pública de nº. 98 de Defesa de Tese de Doutorado

Nos 04 de julho de 2016, às 13 horas, realizou-se no Auditório do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas a sessão pública para defesa da tese intitulada “**Estudo de eficácia e segurança de um novo Co-blister de Cloroquina e Primaquina para tratamento de malária por *Plasmodium vivax* não complicada**”, apresentada por **Dhelio Batista Pereira**, sob a orientação da Dr.^a Graziela Maria Zanini. A Comissão Examinadora indicada para esta defesa foi constituída pelos seguintes membros: Dr. André Machado da Siqueira - INI/Fiocruz (Presidente e Revisor); Dr. Gilberto Marcelo Sperandio da Silva - INI/Fiocruz (Membro); Dr. Luiz Carlos da Silva Pinheiro – FAR/Fiocruz (Membro); Dr.^a Lusiele Guaraldo - INI/Fiocruz (Membro); Dr.^a Joseli de Oliveira Ferreira – IOC/Fiocruz (Membro) e do Dr. Leonardo José de Moura Carvalho - IOC/Fiocruz (Suplente). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, após a apresentação do (a) candidato (a) e arguição da Comissão Examinadora, os membros desta se pronunciaram, avaliando o (a) candidato (a) como aprovado (aprovado (a) ou reprovado (a)).

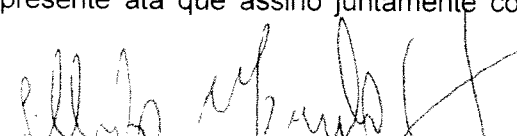
A Comissão Examinadora é:

- () Favorável à divulgação da dissertação em sua forma atual.
(X) Favorável à divulgação da dissertação após as modificações sugeridas pela Comissão*.

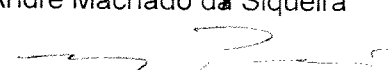
Uma vez encerrado o exame, eu Paulo Henrique da Costa Ferreira, Analista em Gestão de Saúde Pública do Programa de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas INI/Fiocruz, redigi a presente ata que assino juntamente com os membros da Comissão Examinadora.



Dr. André Machado da Siqueira



Dr. Gilberto Marcelo Sperandio da Silva



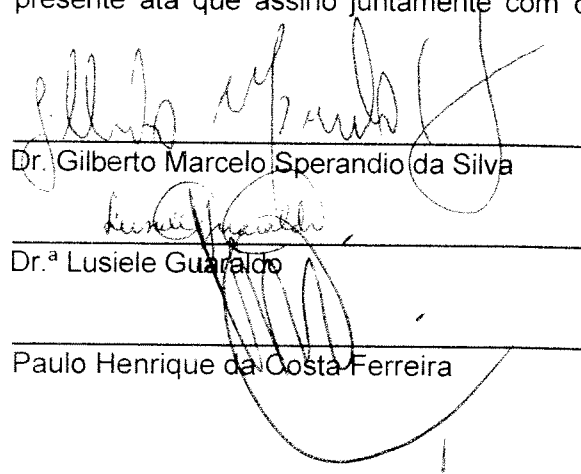
Dr. Luiz Carlos da Silva Pinheiro



Dr.^a Lusiele Guaraldo



Dr.^a Joseli de Oliveira Ferreira



Paulo Henrique da Costa Ferreira

* Preteritamente assinado em anexo.

À minha esposa, Christiane, por seu constante amor e por sempre acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

Quando se realiza grandes feitos, já em idade madura, entende-se que o esforço e mérito pessoal são claramente menos importantes do que a soma das pequenas e grandes contribuições, sendo esta a verdadeira força construtora que desnuda os maravilhosos resultados revelados ao fim.

À minha esposa, que durante estes 4 anos suportou ausências, tensão, ansiedade, com muita compreensão e incentivo, crendo na minha capacidade e proporcionando-me tempos de muita paz e conforto, tudo com muito amor e alegria. Aos familiares e amigos de perto ou de longe, dos quais tive o prazer de receber a torcida sempre encorajadora.

In memoria: Ao grande e excêntrico Prof. Luiz Hildebrando Pereira da Silva. Chamado por todos nós de O Professor, foi o forjador de vários elos que hoje constitui a massa pensante científica da Região Norte do Brasil, sobre tudo em Rondônia. Aqui, somos todos eternos alunos, quando se refere à Luiz Hildebrando.

Aos professores e equipe administrativa do Programas de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Infectologia Evandro Chagas – INI e do Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental da Fundação Universidade Federal de Rondônia – UNIR e também aos colegas das disciplinas cursadas.

Agradecimento especial a Prof. Dr. José Cor Jesus por impulsionar-me em direção ao doutorado, mantendo minha carreira acadêmica e profissional em direção a alvos mais elevados. Meu colega e sempre diretor do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia - CEPEM, Dr. Mauro Shugiro Tada, constante no apoio e suporte nos desafios da pesquisa e nos momentos quando o peso dos compromissos profissionais, acadêmicos e pessoais se somaram sobre mim.

Aos colegas do CEPEM e da Fiocruz-RO, com os quais aprendemos todos os dias, labutamos em um ambiente desafiador e avançamos sempre. Aos meus amigos e mais próximos executores deste estudo, Rosilene Ruffato, Adriana Gleisa, André Ramalho, Francisco Ludervanhe, Eduardo Garbin e outros que estiveram por algum tempo neste grupo, extremamente capaz e eficaz. Meus mais sinceros agradecimentos e gratidão.

Ainda, ao seletto grupo da Plataforma de Pesquisa Clínica da VPPPLR da Fiocruz, representado pelo Dr. André Daher, que também inspirou este projeto, manifesto minha gratidão pelo apoio constantemente com a monitorização e controle de qualidade até o final, participando de toda a análise dos dados finais, mantendo a excelente qualidade dos dados colhidos. A Farmanguinhos, pela confiança que nos permitiu conduzir os estudos de um novo produto de sua indústria e suporte financeiro para tanto.

Aos participantes da pesquisa e a seus familiares, que suportaram com paciência e altruísmo os constantes questionamentos e visitas impostos pela arte da ciência e pelo rigor

da metodologia dos ensaios clínicos.

Não posso deixar de agradecer aos colegas/amigos do o Rene Rachou, a Fiocruz em Belo Horizonte, que durante a execução deste e de tantos outros projetos paralelos me proporcionaram aprendizado, direção, consolo e belos trabalhos apresentados em vários meios durante este período de aperfeiçoamento.

Sobre tudo, muito grato a minha orientadora, Profa. Dra. Graziela Maria Zanini, ao receber-me como aluno, também votou, confiantemente, em um médico atuando em um campo de trabalho tão distante da sede do curso, que lhe trouxe muitos desafios extras. Suportou meus momentos de dúvida, encruzilhadas, dando tempo e apoio aos rompantes de criatividade alternativa, apontou para a luz da boa ciência, aguardando que tudo entrasse no eixo, deixando que o resultado de intenso labor se revelasse no momento certo. Muito obrigado por sempre acreditar em mim.

Meu obrigado ainda a todos membros das bancas, tanto a de qualificação quanto a de defesa. Por, em jugando, fazer dessa peça algo de muito maior valor.

Por fim, a Deus, inspirador, do inicio ao fim, de toda boa obra.

RESUMO

Introdução: O tratamento inadequado e os esquemas terapêuticos de difícil adesão tem efeitos deletérios à efetividade das drogas em uso, favorecendo a transmissão da malária e o surgimento de cepas resistentes. Melhorias na formulação farmacológica e na apresentação do produto, como alteração do sabor pelo revestimento do comprimido e do empacotamento conjunto, em doses adequadas para peso e idade, podem resultar em incremento da adesão, e logo, ampliar a efetividade terapêutica do tratamento da malária causada pelo *Plasmodium vivax*. Este estudo é proposto para avaliação e registro de um co-blister de antimaláricos.

Objetivo: O objetivo geral deste estudo foi avaliar a eficácia terapêutica e segurança de uma nova formulação de cloroquina 150 mg com revestimento administrada em associação com primaquina 15 mg para o tratamento de malária não complicada causada por *Plasmodium vivax*.

Métodos: Este é um estudo de fase II, aberto, realizado em um único centro, localizado em Porto Velho, Brasil, contando com 88 participantes, desenhado para provar taxa de cura superior a 90% em pacientes com malária vivax não complicada. A medida de efeito primária foi definida como a proporção de pacientes com ausência de parasita no dia 28. Para determinar a tolerabilidade deste produto foi considerada como medida de efeito secundária a proporção de pacientes com eventos adversos (EA) clínicos ou laboratoriais. Os dados foram coletados nos dias 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21 e 28. A farmacocinética do medicamento teste foi avaliada por níveis séricos de cloroquina em papel de filtro.

Resultados: A avaliação de cura na população por protocolo (PP) indica resposta clínica e parasitológica adequada em 98,8% (IC 95% 93,4 - 100,0) dos 82 pacientes avaliados. Um total de 74 (84%) pacientes apresentaram 296 EA, classificados, com relações de causalidade com a droga, como possíveis ou prováveis. Cerca de 97,7% dos EA foram classificados como leves, grau I e II. Os EA, com relação provável, com maiores incidências foram prurido (51,1%), erupções cutâneas (8,0%), tosse (6,8%), cefaleia (3,4%), diarreia (2,3%), zumbido (2,3%), desordem do sono (2,3%), dor abdominal (1,1%) e náusea (1,1%). Todos participantes alcançaram a concentração terapêutica efetiva de cloroquina sanguínea.

Conclusão: O tratamento é seguro e eficaz na terapêutica da malária vivax não complicada para a população estudada e atende aos objetivos principais propostos no protocolo e às recomendações da OMS para uso de esquema antimalárico no país.

Palavras Chaves: *Plasmodium vivax*, cloroquina, primaquina, ensaio clínico, tratamento.

ABSTRACT

Introduction: The inappropriate treatment and therapeutic schemes of difficult adherence favor the maintenance of malaria transmission, collaborating with high rates of disease prevalence. In an environment of incorrect use of the recommended treatments, drug resistance also is more likely to emerge. Given this panorama and considering the interest of public health policies, we designed this study to collect robust data to support the health record of an incremental innovation: a coated chloroquine (Cq) and primaquine (Pq) co-blister that can help in the therapeutic effectiveness for malaria treatment caused by *Plasmodium vivax*. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the therapeutic efficacy and safety of a coated new formulation of Cq 150 mg coated administered in combination with Pq 15 mg for the treatment of uncomplicated malaria caused by *Plasmodium vivax*. **Methods:** This was a phase II, open label trial, performed at a single center, designed to prove higher cure rate to 90% in patients with uncomplicated vivax malaria. The primary outcome measured was defined as the proportion of patients with adequate clinical and parasitological response (patients with therapeutic success) at day 28. To determine the tolerability of the product was considered as a secondary effect the proportion of patients with clinical or laboratory adverse events. Data were collected on days 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21 and 28. The pharmacokinetics of the test drug was assessed by serum levels of chloroquine on filter paper. **Results:** The per protocol (PP) evaluation in the population indicates cure, clinical and parasitological response adequate in 98.8% (95% CI 93.4 to 100.0) of the 82 patients evaluated. A total of 74 (84%) patients had 296 EA, ranked by causal relationships with the drug as possible or probable. About 97.7% of EA were classified as mild, grade I and II. The EA, ranked probable relationship, with higher incidences were: pruritus (51.1%), rash (8.0%), cough (6.8%), headache (3.4%), diarrhea (2.3%), tinnitus (2.3%), sleep disorder (2.3%), abdominal pain (1.1%) and nausea (1.1%). All participants achieved the effective therapeutic concentration of blood chloroquine. **Conclusion:** The treatment is safe and effective in the treatment of vivax malaria uncomplicated and meets the main objectives proposed in the protocol and the WHO recommendations for the use of antimalarial regimen in the country.

Keywords: *Plasmodium vivax*, chloroquine, primaquine, clinical trial, treatment.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-1 - CARACTERÍSTICAS DA INFECÇÃO DAS CINCO ESPÉCIES DE MALÁRIA NO HOMEM.....	9
TABELA 1-2 TRATAMENTO DAS INFECÇÕES PELO <i>P. VIVAX</i> COM CLOROQUINA EM 3 DIAS E PRIMAQUINA EM 7 DIAS (ESQUEMA CURTO). EXTRAÍDO DO GUIA PRÁTICO DE TRATAMENTO DE MALÁRIA NO BRASIL, 2010.....	16
TABELA 1-3 TRATAMENTO DAS INFECÇÕES POR <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> COM A COMBINAÇÃO FIXA DE ARTEMETER+LUMEFANTRINA EM 3 DIAS. EXTRAÍDO DO GUIA PRÁTICO DE TRATAMENTO DE MALÁRIA NO BRASIL, 2010. .	17
TABELA 1-4 TRATAMENTO DAS INFECÇÕES POR <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> COM A COMBINAÇÃO FIXA DE ARTESUNATO+MEFLOQUINA EM 3 DIAS E PRIMAQUINA EM DOSE ÚNICA. EXTRAÍDO DO GUIA PRÁTICO DE TRATAMENTO DE MALÁRIA NO BRASIL, 2010.	18
TABELA 3-1 - POSOLOGIA DOS MEDICAMENTOS DO ESTUDO.....	35
TABELA 3-2 - INFORMAÇÕES SOBRE OS PRODUTOS INVESTIGADOS.....	36
TABELA 3-3. CRONOGRAMA DE ACOMPANHAMENTO E ESQUEMA DE EXAMES DOS PACIENTES DO ESTUDO PARA AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA, SEGURANÇA E PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS CO-BLISTER DE COMPRIMIDOS REVESTIDOS DE CLOROQUINA 150 MG E PRIMAQUINA 15 MG PRODUZIDOS POR FARMANGUINHOS/FIOCRUZ.	39
TABELA 3-4 CLASSIFICAÇÃO DA GRAVIDADE DE SINTOMAS.....	41
TABELA 4-1 - MOTIVO DE RETIRADA DO ESTUDO E DA ANÁLISE PP.....	48
TABELA 4-2 - DADOS DE CARACTERÍSTICAS GERAIS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO EM D0, DISCRIMINADOS POR TIPO DE ANÁLISE PROPOSTA - POR INTENSÃO DE TRATAR (IT) E POR PROTOCOLO (PP).....	54
TABELA 4-3 - DADOS REFERIDOS PELA POPULAÇÃO IT DE CONDIÇÕES E PATOLOGIAS PREEEXISTENTES	55
TABELA 4-4 - SINAIS APRESENTADOS PELOS PACIENTES COM MALÁRIA POR <i>P. VIVAX</i> PRESENTES NO MOMENTO DA INCLUSÃO POR IT.	56
TABELA 4-5 - SINTOMAS APRESENTADOS PELOS PACIENTES COM MALÁRIA POR <i>P. VIVAX</i> PRESENTES NO ATÉ O MOMENTO DA INCLUSÃO POR IT.	58
TABELA 4-6 - PROPORÇÃO DE SUCESSO E FALHA NA POPULAÇÃO PP EM NÚMERO TOTAL E PERCENTAGENS COM IC 95% VÁLIDO EM D28.....	59
TABELA 4-7 - NÚMERO ABSOLUTO E PERCENTAGENS DE CAUSAS DE FALHA TERAPÊUTICA NA POPULAÇÃO IT EM D28.	59
TABELA 4-8 - NÚMERO ABSOLUTO E PROPORÇÃO DE CURA E DE FALHA TERAPÊUTICA NA POPULAÇÃO POR PROTOCOLO (PP) EM D3.....	60
TABELA 4-9 - NÚMERO ABSOLUTO E PROPORÇÃO DE CURA E DE CAUSAS DE FALHA TERAPÊUTICA NA POPULAÇÃO POR INTENÇÃO DE TRATAR (IT) EM D3.	60
TABELA 4-10 - A TAXA DE SUCESSO TERAPÊUTICO CUMULATIVA ATÉ DIA 28 (ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA KAPLAN-MEIER).....	60
TABELA 4-11 - PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DA AMOSTRA (N=86)	63
TABELA 4-12 - NÚMERO DE PACIENTES (%) POR NÚMERO DE EVENTOS, CLASSIFICADOS POR GRAU E CAUSALIDADE.....	64
TABELA 4-13 - NÚMERO DE EVENTOS ADVERSOS POR GRAU E RELAÇÃO DE CAUSALIDADE.....	65
TABELA 4-14 - NÚMERO (%) DE PACIENTES (N=88) COM EVENTOS ADVERSOS COM FREQUÊNCIA ACIMA DE 5%, POR GRAVIDADE E CAUSALIDADE.....	67

TABELA 4-15 - DISTRIBUIÇÃO DE NÚMERO DE PACIENTES COM EA MAIS INCIDENTES POR DIA DE OCORRÊNCIA	67
TABELA 4-16 - PARTICIPANTES COM EA - PRURIDO POR DIA DE VISITA.	69
TABELA 4-17 - MÉDIAS DO HEMATÓCRITO E HEMOGLOBINA DOS PACIENTES NOS DIAS 0, 14 E 28.	70
TABELA 4-18 - PARASITEMIA DOS PARTICIPANTES ENTRE D0 E D28.	71
TABELA 5-1 - EFICÁCIA DE ESQUEMAS DE TRATAMENTO COM CLOROQUINA - 14 ESTUDOS (JAN 2015-JUN 2016)	82

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-1 - CASOS DE MALÁRIA NO BRASIL DE 1958 À 2013 (FONTE: SIVEP-MALARIA)	2
FIGURA 1-2 ILUSTRAÇÃO DE PRODUTO A SER PRODUZIDO - CO-BLISTER DE CLOROQUINA REVESTIDA E PRIMAQUINA, PRODUZIDO POR FARMANGUINHOS.	4
FIGURA 1-3 - CICLO DE VIDA DOS PLASMÓDIOS NO CORPO HUMANO E NO MOSQUITO ANÓFELES, ADAPTADO DE WHITE AT AL. 2014 (15).	7
FIGURA 1-4 - QUADROS COM CICLOS TÍPICOS DE PERÍODOS DE MATURAÇÃO DENTRO DE ERITRÓCITOS, SEGUNDO TIPO DE MALÁRIA. ADAPTADO DE BRUCE-CHWATT LJ: ESSENTIAL MALARIOLOGY. 2ND ED. JOHN WILEY AND SONS, NEW YORK, 1985, P. 52.	8
FIGURA 1-5 ÁRVORE DE TORTI,	14
FIGURA 4-1 - DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO E RAZÕES PARA NÃO INCLUSÃO OU RETIRADA DO ESTUDO OU DA ANÁLISE PP.	49
FIGURA 4-2 – GRÁFICO DA CURVA DE SOBREVIVÊNCIA KAPLAN-MEIER PARA OS DADOS AVALIADOS POR PROTOCOLO (N=82).....	61
FIGURA 4-3 – APRESENTAÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS PRINCIPAIS SINAIS E SINTOMAS RELATADOS PELOS PACIENTES POR DIA DE VISITA.	62
FIGURA 4-4 - CURVA DAS MÉDIAS DA CONCENTRAÇÃO DA CLOROQUINA NOS DIAS DE AVALIAÇÃO D0-D28 DOS PACIENTES.	63
FIGURA 4-5 - DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE EA TOTAL E EA COM USO DE MEDICAMENTO ESPECÍFICO POR DIA DE VISITA.	66
FIGURA 4-6 - MEDIANA DO HEMATÓCRITO DOS PACIENTES AVALIADA EM D0, D14 E D28.....	70
FIGURA 4-7 - MEDIANA DA HEMOGLOBINA DOS PACIENTES EM AVALIADA EM D0, D14 E D28.	71

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACT	Tratamentos com combinações contendo derivados de artemisinina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPC	Boas Práticas Clínicas
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CDC	Center of Disease Control
CEMETRON	Hospital Centro de Medicina Tropical de Rondônia
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEPEM	Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia
Cq	Cloroquina
CRF-e	Ficha de Pesquisa Clínica eletrônica (em Inglês)
DEC	Desetilcloroquina
DP	Desvio Padrão
EA	Eventos adversos
Farmanguinhos	Instituto de Tecnologia em Fármacos Farmanguinhos - FIOCRUZ
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FIOTEC	Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Saúde
Hg	Hemoglobina
ICH	International Conference on Harmonization
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia
IC	Intervalo de Confiança
IT	Intenção de Tratar
LVC	Lâmina de Verificação de Cura
MedDRA	Medical Dictionary for Regulatory Activities
mmHg	Milímetros de mercúrio
MS	Ministério da Saúde do Brasil
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
PA	Pressão arterial
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PNCM	Programa Nacional de Controle de Malária
POP	Procedimentos operacionais padrões
PP	Por Protocolo
Pq	Primaquina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
RAVREDA	Rede Amazônica de Vigilância de Resistência de Drogas Antimalárica
SISNEP	Sistema Nacional de Ética em Pesquisa
SIVEP-malária	Sistema de Vigilância Epidemiológica em Malária
SEFAR	Serviço de Farmacocinética- FIOCRUZ
SNC	Sistema Nervoso Central

SUS Sistema Único de Saúde
RCPA Resposta Clínica e Parasitológica Adequada
VPPLR Vice Presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência -
FIOCRUZ

SUMÁRIO

1 SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	REVISÃO DA LITERATURA	4
1.1.1	<i>Malária – Doença Infecto parasitária</i>	4
1.1.2	<i>Malária - doença</i>	6
1.1.3	<i>Diagnóstico da malária</i>	12
1.1.4	<i>Terapia e resistência medicamentosa</i>	13
1.1.5	<i>Planos de controle, eliminação e erradicação</i>	23
2	OBJETIVO	30
2.1	OBJETIVO PRIMÁRIO	30
2.2	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	30
2.2.1	<i>Segurança</i>	30
2.2.2	<i>Farmacocinética</i>	30
3	MÉTODOS	31
3.1	LOCAL E POPULAÇÃO DO ESTUDO	31
3.2	DESCRIÇÃO GERAL DO DESENHO DO ESTUDO E PLANO	31
3.2.1	<i>Discussão do desenho do estudo incluindo ausência de grupo controle</i>	32
3.2.2	<i>Critério de inclusão</i>	33
3.2.3	<i>Critérios de exclusão</i>	33
3.2.4	<i>Retirada de Pacientes e suspensão do tratamento</i>	34
3.3	TRATAMENTOS	35
3.3.1	<i>Tratamentos administrados</i>	35
3.3.2	<i>Identificação dos produtos investigacionais</i>	35
3.3.3	<i>Seleção das doses do estudo</i>	36
3.3.4	<i>Seleção do horário de administração</i>	37
3.3.5	<i>Terapia prévia ou concomitante</i>	37
3.3.6	<i>Adesão ao tratamento</i>	38
3.4	AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA, SEGURANÇA E FARMACOCINÉTICA	38
3.4.1	<i>Medidas de efeito de Eficácia</i>	39
3.4.2	<i>Medidas de efeito de Segurança</i>	40
3.4.3	<i>Medidas de efeito de farmacocinética</i>	41
3.4.4	<i>Aferição da concentração das drogas</i>	41

	xii	
3.5	ADEQUAÇÃO DESTAS MEDIDAS	42
3.6	GARANTIA DA QUALIDADE DOS DADOS	42
3.7	MÉTODOS ESTATÍSTICOS PLANEJADOS E DETERMINAÇÃO DO TAMANHO AMOSTRAL	43
3.7.1	<i>Determinação do tamanho amostral do estudo</i>	45
3.8	ALTERAÇÕES NA CONDUÇÃO DO ESTUDO E DA ANÁLISE PLANEJADAS	46
4	RESULTADOS	48
4.1	POPULAÇÃO DO ESTUDO	48
4.2	DESVIOS DE PROTOCOLO	50
4.3	CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS	50
4.3.1	<i>Dados Gerais</i>	51
4.3.2	<i>Sinais e sintomas clínicos</i>	55
4.3.3	<i>Medidas de adesão ao tratamento</i>	58
4.4	RESULTADOS DE EFICÁCIA E FARMACOCINÉTICA	59
4.4.1	<i>Análise de eficácia</i>	59
4.4.2	<i>Questões analíticas e estatísticas</i>	63
4.5	AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA	63
4.5.1	<i>Eventos adversos</i>	63
4.5.2	<i>Apresentação dos eventos adversos</i>	64
4.5.3	<i>Análise dos eventos adversos</i>	71
5	DISCUSSÃO	73
6	CONCLUSÃO	84
6.1.1	<i>Conclusões</i>	84
6.1.2	<i>Conclusão Geral</i>	84
7	BIBLIOGRAFIA	85
8	ANEXOS	97
8.1	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	97
8.2	PREPARAÇÃO E LEITURA DE LÂMINAS - POP	101
8.3	GRADUAÇÃO DE GRAVIDADE DE EVENTO ADVERSO E DIRETRIZES PARA A GRADUAÇÃO DE ACHADOS EM EXAMES FÍSICOS	111
8.4	CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA	123
8.5	APROVAÇÃO DO PROJETO NA ANVISA	127
8.6	LISTA DE PRODUÇÃO ESCRITA DURANTE O PERÍODO	128

1 INTRODUÇÃO

A incidência da malária é uma preocupação sanitária e social, apresentando morbidade e mortalidade com alto impacto na população em áreas de risco. Durante o planejamento deste estudo, em 2008, foi estimada pela Organização Mundial de Saúde a ocorrência de 243 milhões de casos de malária e 863.000 mortes no mundo (1). No entanto, o panorama atual apresenta uma perspectiva rara na história da doença. O número de mortes, em 2014, decaiu 47% em relação aos números de 2000 (2). Estes dados representam o resultado de ações de controle clássicas, como o controle vetorial, o diagnóstico e o tratamento precoces, uso de mosquiteiros e drenagem de terreno. Mas também são produto de investimentos em políticas públicas e de novas tecnologias, incluído a pesquisa de novos esquemas terapêuticos e novas drogas, como a introdução das combinações com derivados de artemisinina (ACT). Estes resultados sinalizam que a meta de ampliar as áreas para medidas de eliminação da malária é algo viável, através de intensificação das medidas já consolidadas e de inovação tecnológica (3).

No Brasil, apesar da constante redução dos casos anualmente, a malária ainda é um grave problema de saúde pública, com aproximadamente 306 mil e 144 mil casos registrados em 2009 e 2014, respectivamente; destes, 99,9% foram transmitidos nos estados da Amazônia Legal (4). Atualmente há predominância de incidência de malária por *P. vivax*, mas este é um fenômeno relativamente recente no Brasil. Em 1988, *P. vivax* e *P. falciparum* apresentavam taxa de incidência de 50% cada, contudo, em 2014, *P. vivax* representava 89,0% dos casos, enquanto *P. falciparum* apenas 10,4% dos casos registrados e ainda, 0,6% dos casos com infecção mista (4,5). A Figura 1-1 mostra evolução dos casos de malária no Brasil.

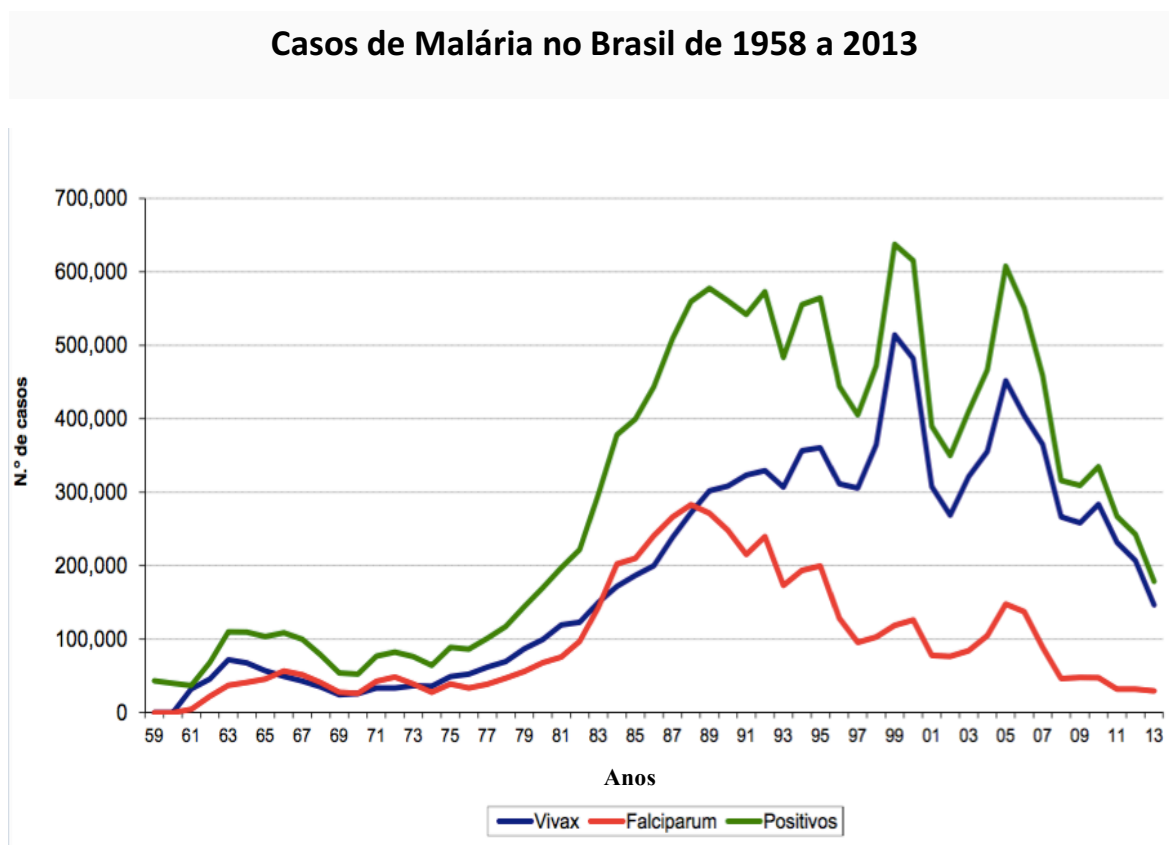


Figura 1-1 - Casos de Malária no Brasil de 1958 à 2013 (Fonte: SIVEP-Malaria)

Dentre as cinco espécies de Plasmodium causadoras da malária no homem (*P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*), o *P. falciparum* tem sido foco dos principais esforços de saúde pública e desenvolvimentos tecnológicos. O fato é justificável diante da alta mortalidade, da emergência de resistência aos antimaláricos em uso e da predominância dessa espécie no continente com maior número de casos, a África (2).

Recentemente, a malária pelo *P. vivax* ganhou nova relevância. Um mapeamento realizado em 2010 informou que haveria cerca de 2,85 bilhões de pessoas expostas a algum risco de transmissão de *P. vivax* no mundo (6). Seu controle pode apresentar dificuldades maiores que o controle da malária por *P. falciparum*, devido a presença de gametócitos precocemente na corrente sanguínea, facilitando a transmissão, e pela presença de formas latentes no fígado, que resultam em recaídas, reiniciando novo ciclo da doença anos após o primeiro episódio, além disso, o quadro clínico pode ser graves, principalmente em populações com comornidades, em crianças e em gestantes. (7-12). O impacto da doença vai além da morbidade individual, a malária vivax está também relacionada a efeitos sobre prosperidade, longevidade, desempenho escolar (13) e saúde das populações (14).

O tratamento para a malária falciparum tem recebido constante atualizações, resultado de pesquisa por novas drogas ou pelo desenvolvimento de cepas resistentes às drogas em uso (15). De forma abrangente, o *P. vivax* é sensível a praticamente todo arsenal terapêutico antimalárico. Entretanto, não só no Brasil, mas também na maioria dos países onde o *P. vivax* circula, há mais de 50 anos, o fosfato de cloroquina oral é a droga na escolha para tratamento das formas não complicadas. Como a cloroquina é ativa apenas contra as formas eritrocíticas assexuais do plasmódio, ela precisa ser combinada a primaquina para promover a cura radical da malária, atuando assim também contra os hipnozoítos no fígado e contra os gametócitos (12). A OMS considera a cloroquina combinada a primaquina um tratamento eficaz onde a proporção de RCPA é acima de 90% (3).

Entretanto, do ponto de vista da saúde pública, a eficácia não é o objetivo, mas o que se busca é um tratamento efetivo. Ou seja, em uma situação real, o tratamento resulte em resposta adequada ou cura. Dois fatores são fundamentais para a efetividade do tratamento: a eficácia e a adesão. A adesão é a medida da aceitação do tratamento e está relacionada com a posologia, implicando frequência e tempo de uso e sua compreensão, e também da gravidade, intensidade e frequência dos eventos adversos, sabor, via, apresentação (empacotamento) e facilidade do acesso ao medicamento. A baixa adesão tem um efeito direto sobre a efetividade do tratamento (16).

A eficácia é avaliação do medicamento quando a adesão é garantida. Usualmente em um estudo controlado, frequentemente divergente de situações adversas da realidade. Alterações da farmacocinética e farmacodinâmica do medicamento e o surgimento de resistência são os principais redutores da eficácia de um tratamento. Contudo, a baixa adesão pode produzir níveis ineficazes de droga e podem selecionar cepas resistentes. O que representa um efeito indireto da adesão sobre a efetividade do tratamento (17,18).

Assim sendo, a produção de formulações e apresentações farmacêuticas que melhorem a adesão à drogas antimaláricas é uma ação para salvaguardar nosso arsenal terapêutico atual, reduzindo a chance de resistência e promovendo a efetividade de forma direta e indireta.

Diante deste panorama e considerando-se o interesse das políticas públicas de saúde, no que diz respeito a malária vivax, buscamos, com este trabalho, coletar dados robustos para dar suporte ao registro sanitário de uma inovação incremental: um co-blister de cloroquina revestida (Cq) e primaquina (Pq), que possa ajudar na efetividade terapêutica

no tratamento da malária causada pelo *Plasmodium vivax*. A Figura 1-2 ilustra a embalagem a ser apresentada no produto final para uma faixa etária ou peso determinado.

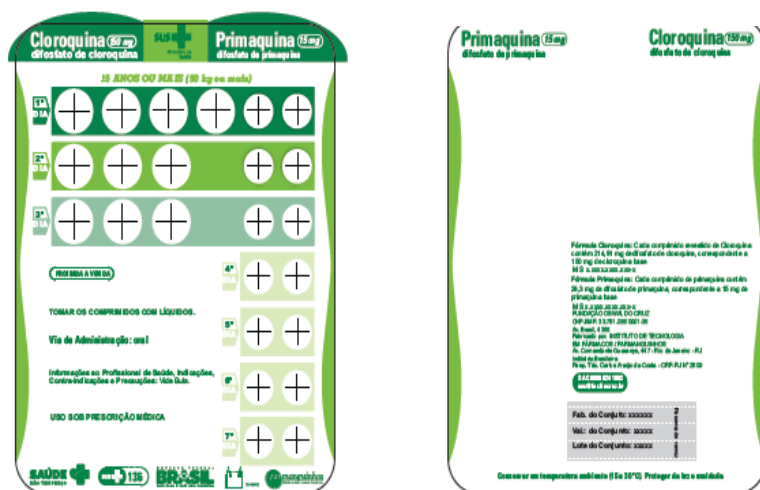


Figura 1-2 Ilustração de produto a ser produzido - co-blister de cloroquina revestida e primaquina, produzido por Farmanguinhos.

Uma nova apresentação em co-blister de cloroquina revestida e primaquina se justifica, porque o tratamento inadequado e esquemas terapêuticos de difícil adesão favorecem a manutenção da transmissão da malária, colaborando com as taxas atuais de prevalência da doença. Em um ambiente de uso incorreto dos tratamentos preconizados a resistência aos fármacos também tem maior chance de emergir.

Promovendo a efetividade, através da restrição do desenvolvimento de resistência aos antimaláricos, pela utilização de drogas eficazes, garantindo acesso ao medicamento de qualidade e incrementando a adesão ao tratamento com utilização de tecnologia farmacêutica e educação, o objetivo de alcançar o controle definitivo e avançar para eliminação da malária em regiões susceptíveis terá maior chance de êxito.

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 MALÁRIA – DOENÇA INFECTO PARASITÁRIA

Muito antes da descoberta de Charles Alphonse Laveran, descritor do agente etiológico, em 1893 (19) e de Ronald Ross, que apresentou um mosquito como vetor da doença em 1897, a malária já deixava pistas da sua existência na história da humanidade (20) através de relatos de manifestações clínicas típicas, como febre intermitente e prostração, descritas por Hipócrates, bem como a suspeita da transmissão de doenças por

mosquitos, relatada pelos egípcios no século XXVI ac. e por Marcus Terentius Varro (116–27 ac.), um estudioso romano. Recebeu seu nome moderno, malária, de “mala aria” do italiano, o mal do ar insalubre próximo aos pântanos, de onde também encontramos o termo paludismo, ou “*de noxiis paludum effluviis*”, uma direta referência à teoria miasmática (21). No século XIX, enquanto Pasteur (22) e Koch (23) apresentavam ao mundo os microrganismos, vários dos grandes nomes da ciência ampliavam rapidamente o conhecimento sobre a malária. Johann Meckel, Rudolf Virchow e Frerichs descrevem o pigmento malárico na corrente sanguínea, no baço e no cérebro, estabelecendo que a malária é uma doença do sangue (24) e Robert Koch narra sobre a imunidade clínica adquirida por crianças. Sobre o vetor, Giovanni Grassi, 1898, identifica espécies do gênero *Anopheles* (do grego: bom para nada), Patrick Manson reconhece a transmissão entre o vetor e o humano e Camillo Golgi, 1892, apresenta o ciclo do parasita no homem e sua relação com a febre. Já no início do século XX, Fritz Schaudinn desenha todo ciclo e propõe que a forma de esporozoíta, vinda do mosquito, infectaria diretamente as hemácias, e, finalmente, em 1947, Henry Shortt e Cyril Garnham, corrigem este erro e apontam a fase hepática como intermediária, antecedendo a fase eritrocítica (19,21).

O resumo de um século de descobertas sobre a malária (1847-1947)

A malária é uma doença infecciosa, transmitida através de um vetor do gênero *Anopheles*, que introduz no hospedeiro o plasmódio, agente etiológico da malária, na forma infectante, o esporozoíta. Antes de iniciar o ciclo na corrente sanguínea, ao infectar eritrócitos, tem um período de desenvolvimento no fígado. De lá saem os merozoítos que rapidamente invadem as hemácias e entram em uma nova fase de multiplicação assexuada, dando origem a trofozoítos, os quais apresentam dentro de seu vacúolo digestivo a hemozoína, também conhecida como pigmento malárico, responsável pela coloração vermelho acastanhada dos órgãos afetados pela malária. Uma forma especial, denominada de gametócito também é formada na corrente sanguínea. Estes gametócistos (masculino e feminino) sendo sugados pelo mosquito fêmea, durante seu repasto, fundir-se-ão em um zigoto, dando início ao ciclo sexuado no hospedeiro invertebrado. Assim, um oocisto é formado e dele surgem os esporozoítos, os quais continuam se multiplicando, migram para as glândulas salivares do mosquito e aguardam a chance de iniciar um novo ciclo no hospedeiro vertebrado, quando for novamente se alimentar de sangue.

Os sintomas da malária são resultantes do rompimento dos eritrócitos, pois o calafrio, a febre, a sudorese e a prostração são seguidos da liberação dos merozoítos na corrente sanguínea. Além disso, as hemácias parasitadas com plasmódios são encontradas dentro de vasos sanguíneos em vários órgãos, levando a disfunções locais e sistêmicas (6,25). Várias espécies de plasmódio e seus respectivos hospedeiros vertebrados foram descritos, sendo estes bastante diversificados, abrangendo desde aves a roedores e primatas (25,26). No homem, 4 espécies eram reconhecidas, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malarie*.

O extrato da casca do arbusto cinchona, era sabidamente eficaz contra a malária desde 1640 (21), da qual a quinina foi isolado e utilizada para tratamento a partir de 1920. Com base nestes conhecimentos, muitas campanhas de controle da malária foram iniciadas em várias regiões do mundo. Princípios, como evitar locais húmidos, com mosquitos, coleções de água e dormir desprotegido eram conhecidos como bons hábitos para evitar malária desde 1883, conforme prescrito pelo médico Albert Freeman Africanus King (21). Hoje, estes princípios ainda são as bases para as ações de controle e eliminação da malária: diagnóstico precoce, tratamento eficaz, proteção dos indivíduos e combate ao mosquito (27).

Ultrapassando este período centenário, em 1982, finalmente a forma “dormente”, por isso chamada de hipnozoíta, responsável pelo ressurgimento da malária em pacientes com previa infecção pelo *P. vivax* e pelo *P. ovale*, até meses ou anos fora da área de transmissão, foi descoberta por Wojciech Krotoski, alojada nos hepatócitos (28,29). Assim, entendimento do ciclo evolutivo das malárias humanas estava completo.

1.1.2 MALÁRIA - DOENÇA

Graças às iniciativas governamentais e não governamentais na última década, obteve-se uma importante redução dos casos de malária no mundo. Mais importante, a redução da mortalidade entre crianças africanas alcançou 75% dos casos relatados em 2005, o que corresponde a aproximadamente 500.000 mortes/ano, em 2014. Este número demonstra a importância que esta doença ainda representa para uma vasta parcela da população mundial, ou seja, cerca de 3,3 bilhões de pessoas continuam em risco de infecção (2).

A malária em humanos pode ser decorrente de 5 espécies. Quatro delas têm os ciclos de desenvolvimento dos seus respectivos agentes etiológicos centrado no próprio homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malarie*. Além destes, recentemente, uma

espécie que parasita macacos, o *P. knowlesi*, também tem sido encontrado parasitando o homem (2). Tradicionalmente, a malária também foi classificada pela periodicidade em que a febre surge e pela virulência. Assim sendo, terçã maligna para a malária causada pelo *P. falciparum*, terçã benigna para a malária causada pelos *P. vivax* e *P. ovale* e, finalmente, quartã benigna para a causada pelo *P. malarie*. Estes termos já não são cientificamente acurados, mas tem um valor históricos. As Figura 1-3 e Figura 1-4 auxiliam na compreensão do ciclo natural apresentado por cada um dos Plasmódios e suas características clínicas.

Tabela 1-1 relaciona as diferenças da infecção entre as 5 espécies de malária que parasitam o homem.

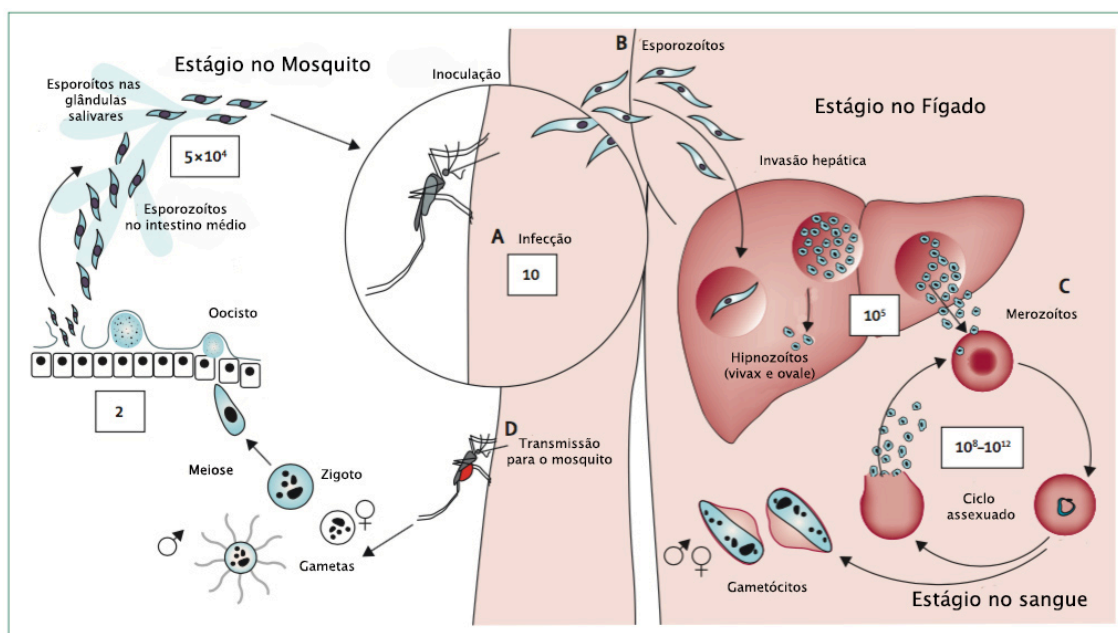


Figura 1-3 - Ciclo de vida dos plasmódios no corpo humano e no mosquito anófeles, adaptado de White *et al.* 2014 (15).

A: Infecção do homem: A fêmea do mosquito, através de picada na pele, inocula cerca de 10-50 esporozoítos por picada. B: Os esporozoítos, que vencem as primeiras barreiras de defesa do sistema imune na pele e na corrente sanguínea, alcançam o fígado. C: Os merozoítos formados no interior vacúolo parasitóforo dos hepatócitos, no ciclo tecidual, cerca de 10^5 merozoítos, são liberados na corrente sanguínea e logo invadem os eritrócitos, iniciando o ciclo sanguíneo. Ainda nos hepatócitos, nas espécies de *P. vivax* e *P. ovale*, a forma dormente ou latente, denominada hipnozoíta se desenvolve, a qual é a responsável pelo readoecimento resultantes de recaídas observadas na malária. No eritrócito do hospedeiro vertebrado, através de ciclos de reprodução assexuada, um merozoíta, transformado em uma forma anelar, trofozoíta, evolui para um esquizonte, resultando ente 6 a 30 novos merozoítos que rompem a membrana celular do eritrócito e ganham novamente a corrente sanguínea. Com carga parasitária total, o número de merozoíta pode alcançar entre $10^8 - 10^{12}$, dependendo da espécie do plasmódio. Gametócitos, formas sexuais, também são formados. D: os gametócitos são sugados pelo mosquito em um novo repasto, iniciando o ciclo no mosquito com a formação de zigoto, pela combinação de 2 gametócitos em reprodução sexuada. Dentro do intestino médio do mosquito a formação de oocineto e oocistos. Estes ao se romperem libram esporozoítos que migram para a glândula salivar,

aguardando novo repasto humano. Aproximadamente 5×10^4 novos esporozoítos podem ser formados de apenas um zigoto.

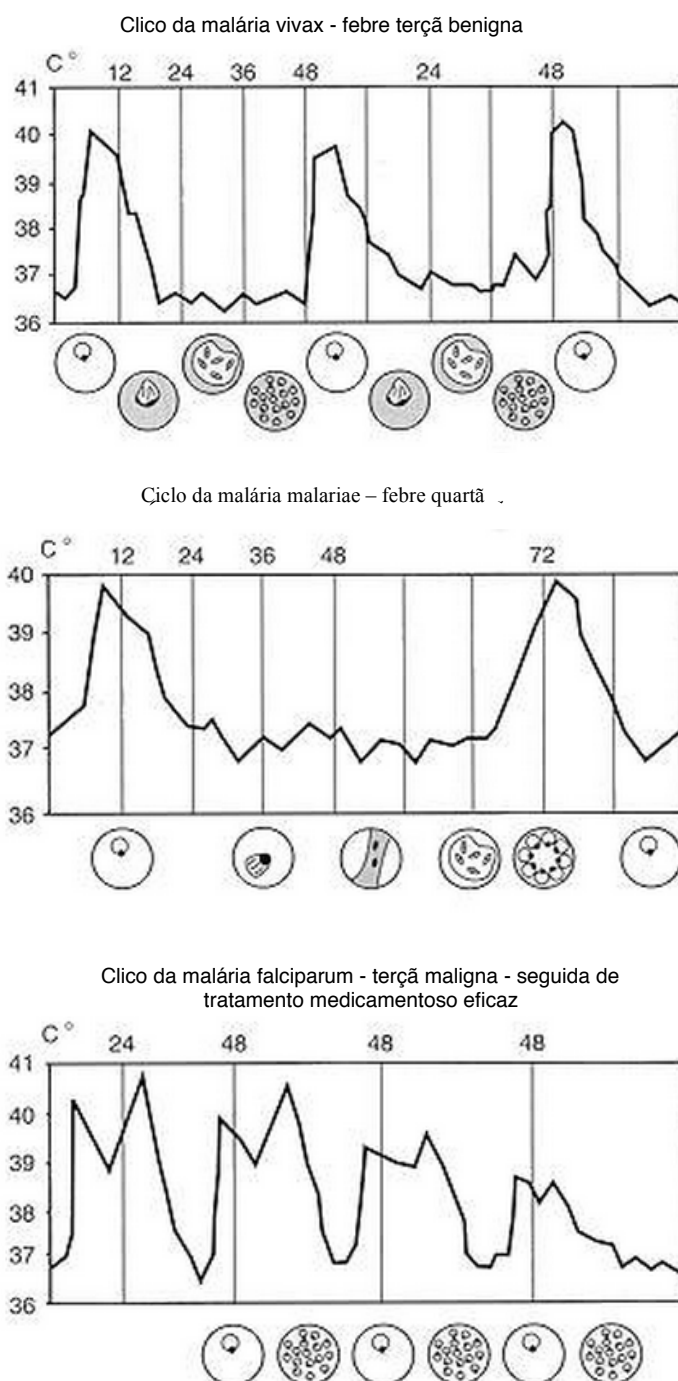


Figura 1-4 - Quadros com ciclos típicos de períodos de maturação dentro de eritrócitos, segundo tipo de malária. Adaptado de Bruce-Chwatt LJ: Essential Malariaology. 2nd Ed. John Wiley and Sons, New York, 1985, p. 52.

Tabela 1-1 - Características da infecção das cinco espécies de malária no homem.

Características	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. knowlesi</i>
Fase tecidual ou pré-eritrocítica (dias)	5-7	8-9	6-8	14-16	8-9
Ciclo eritrocítico (horas)	48	48	50	72	24
Período pré-patente (dias)	9-10	11-13	10-14	15-16	9-12
Hemácia comprometida	Todas	Reticulócitos	Reticulócitos	Eritrócitos maduros	Todas
Parasitemia por μL					
- média	20.000-500.000	20.000	9.000	60.000	600-10.000
- máxima	2.000.000	100.000	30.000	20.000	236-000
Duração do paroxismo (horas)	16-36 ou mais	8-12	8-12	8-12	8-12
Malária grave	Sim	Sim	Não	Não	Sim
Recaídas (hipnozoíta)	Não	Sim	Sim	Não	Não

Fonte: adaptado de Spinell antinori et al., 2014 (30)

Após a inoculação dos esporozoítos na pele do homem pelo mosquito fêmea durante seu repasto sanguíneo, estas formas extracelulares devem rapidamente ganhar a corrente sanguínea e alcançar os hepatócitos no fígado para escapar a sua destruição pelo sistema imune do hospedeiro. Segue-se o ciclo tecidual ou pré-eritrocítico, com aproximadamente uma semana de duração. Alguns sintomas, semelhantes a um resfriado, podem surgir quando os merozoítos deixam o fígado para iniciar o ciclo sanguíneo ou eritrocítico dentro das células vermelhas, sem que ainda sejam manifestos os sintomas clássicos. A doença, malária, é conhecida pelo acesso de febre típico, denominado paroxismo, que inicia como uma febre alta, acima dos 39° C, com calafrios e tremores, seguido de sudorese profusa, a qual, frequentemente, é acompanhada por cefaleia e, por fim, prostração, quando o paciente permanece deitado e com uma sensação de exaustão física (15,31). Todo o período de paroxismo pode durar de 8-12 horas, incluído um período febril, de 4-6 horas, com o retorno à normalidade clínica, oligossintomática. Então, um novo ciclo de desenvolvimento do plasmódio e de sintomas se repete: na febre terçã, a cada 48 horas e na febre quartã, a cada 72 horas. Entretanto, esta periodicidade não é típica nos primeiros dias, principalmente entre os casos de malária falciparum. Inicialmente, este padrão de febre foi relacionado à presença direta dos merozoítos no sangue, ao deixarem os eritrócitos (25). Atualmente, sabe-se que o período de sintomas coincide com a saída dos merozoítos, mas os sintomas são produzidos por uma tempestade de citocinas circulantes na corrente sanguínea por estímulo do sistema imune ao se deparar com antígenos do protozoário e de produtos da destruição dos eritrócitos rompidos durante a liberação dos merozoítos (32). Principalmente pela presença de citocinas pro-inflamatórias, como TNF e Interferon, comuns em vários processos inflamatórios, produzindo sintomas diversos: os

gastrointestinais, como náusea, vômito e dor abdominal, os neurológicos, como cefaleia, tontura e vertigem, além dos sistêmicos, como: mialgia, artralgia, inapetência e febre. Em alguns casos outros sinais clínicos e laboratoriais podem surgir, como aumento das transaminases, queda da hemoglobina (anemia) e das plaquetas (plaquetopenia), hepatomegalia e esplenomegalia (15).

A malária grave tem sido relacionada quase exclusivamente ao *P. falciparum*, por, frequentemente, levar o paciente a morte, se não tratada adequadamente. Os mecanismos fisiopatológicos para clínica de eventos graves durante a infecção pelo *P. falciparum* são bastante complexos e estão ligados à biologia do parasita e das respostas à infecção do próprio homem. A anemia é proporcional à parasitemia e é resultado da destruição de hemácias parasitadas e não parasitadas, que se soma a produção reduzida de eritrócitos devida ao comprometimento da medula óssea durante a infecção. As alterações na estrutura dos eritrócitos, com exposição de receptores e antígenos na membrana celular os tornam mais reconhecíveis ao sistema imune, além de provocar dois fenômenos típicos, a formação de rosetas, que são agregados de hemácias, e a adesão dos eritrócitos e das rosetas às paredes dos capilares sanguíneos (15,33). O resultado é um fluxo sanguíneo lento, ou mesmo a formação de trombos na microcirculação, levando a acentuação do estado de hipóxia produzido pela anemia. Na microcirculação, a hipóxia é um forte promotor de vasodilatação, que juntamente com a resposta imune contra os eritrócitos parasitados, causam um estado semelhante ao choque, com extravasamento de líquido para o interstício dos órgãos afetados, resultando em edema e piora da hipóxia tecidual. As consequências locais podem levar a insuficiência renal, insuficiência respiratória, entre outras, e sobre tudo, a mais temida das manifestações graves da malária falciparum, a malária cerebral, com perda da consciência, convulsões e morte. Causos fatais podem ser consequência de acometimento de um órgão específico ou por um quadro sistêmico (15).

Não obstante, em áreas de alta transmissão de malária falciparum, os quadros mais graves, como os citados acima, são descritos, mais frequentemente, em crianças e em pessoas recém-chegadas à área. Foi demonstrado que pessoas que resistem as primeiras infecções podem desenvolver uma condição chamada de imunidade clínica, ou seja, um indivíduo adquire malária, sem apresentar sintomas graves, ou mesmo, sintoma algum – assintomáticos (15,34). Os assintomáticos ou pacientes resistentes à doença clínica apresentam uma adaptação do sistema imune, dirigido para a tolerância. Esse quadro foi demonstrado em modelos murinos e humanos, relacionando um esgotamento dos linfócitos

T, com expressão de receptores de morte programada-1(PD-1/PL) e gene-3 de ativação de linfócitos (LAG-3), que surgem tanto na malária falciparum (35) quanto na malária vivax (36). Estes pacientes também não apresentam alta parasitemia e passam despercebidos pelo sistema de saúde, sendo por isso fonte de contágio para o mosquito, mantendo o ciclo da malária. Curiosamente, quando estes pacientes se afastam da área de transmissão, rapidamente perdem sua resistência a infecção clínica (34).

Fazendo jus a antiga alcunha de “terça benigna”, a malária causada pelo *P. vivax* frequentemente resulta em evolução clínica sem complicações graves em pacientes previamente saudáveis e sem coinfeções, excetuando-se grupos especiais, como crianças pequenas e gestantes. A evolução com prognóstico mais favorável está ligada a relação parasita-hospedeiro mais harmoniosa. O *P. vivax* tem sua infecção sanguínea limitada, pois a expansão parasitêmica é restringida pela sua predileção por eritrócitos jovens, os reticulócitos (9,15). Embora tenha capacidade de formar rosáceas e aderir-se a parede vascular, não o faz com a mesma eficiência que o *P. falciparum*, e, em raros casos, produz hipóxia local ou sistêmica. As manifestações clínicas mais graves podem estar ligadas à resposta imunológica específica do paciente ou à presença de coinfeções ou comorbidades não detectadas (9,33,37,38). Coinfeções, principalmente bacterianas podem modular o sistema imune para respostas mais exacerbadas, semelhantes à sepse, na malária (39). No entanto, benigna pode não ser uma boa definição para a malária vivax se se considerar a morbidade e a resiliência do *P. vivax*. Os sintomas agudos da malária vivax são tão intensos quanto os causados pela malária falciparum, embora sem repercussão laboratorial tão exuberante. A formação de gametócitos ocorre precocemente, iniciada no primeiro dia, o que favorece a manutenção da transmissão (31,33). Sobretudo, a presença do hipnozoíto no fígado produz recaídas (vide sessão sobre a primaquina), caso o tratamento não tenha sido eficaz, mantendo a infecção por longos períodos, produzindo anemia e levando ao absenteísmo no trabalho e nas escolas.

A plaquetopenia é um achado frequente na malária vivax. Suas razões, bem definidas pelos estudos de Marcus Lacerda *et al.* (40), não levam a repercussão na clínica e nem nos processos de coagulação, com raras exceções. Entretanto, em regiões de transmissão comum de patologias plaquetopênicas hemorrágicas, a dúvida diagnóstica promove a internação dos pacientes com malária e plaquetopenia pura, resultando em estresse para o paciente e gastos no serviço de saúde. Dessa forma, em um aspecto mais abrangente, devido a realidade casos com desfechos graves (38,41) ou pela complexidade do

manejo para a saúde pública, a malária vivax não tem sido vista como uma forma benigna (33).

Devido a menor abrangência territorial e repercussão clínica das malárias causadas pelos *P. malarie* e *P. Ovale*, estes não têm sido alvo de estudos de maior impacto para o entendimento e controle da malária no mundo.

1.1.3 DIAGNÓSTICO DA MALÁRIA

O diagnóstico parasitológico da malária é possível de ser realizado de forma simples ou complexa, dependente de instrumental com tecnologia de ponta ou um simples microscópio. O aspecto mais limitante no processo são os fatores humano e logístico. O treinamento, pagamento e distribuição territorial de pessoal para utilização de microscópio em países com grande extensão territorial e dificuldade socioeconômica tem sido um desafio para as estratégias de combate à malária. Desta forma, mesmo que proscrito, ainda, em áreas com alta mortalidade, o diagnóstico se faz por critério exclusivamente clínico, tornando o estabelecimento da prevalência da malária mundial uma atividade imprecisa, referida em intervalos bastante amplos. Por exemplo, em 2013, estima-se que houve 584 mil mortes no mundo por malária (com uma variação de 367 mil – 755 mil) (27).

Diagnóstico Clínico – O padrão de febre intermitente e o paroxismo são conhecidos da humanidade há milênios (26). Nos tempos atuais, onde não é possível o diagnóstico parasitológico com microscopia os testes rápidos devem ser utilizados. O diagnóstico clínico, baseado na presença de febre, calafrio e sudorese de padrão intermitente, não é recomendado pela OMS (27). Pensar em malária pela simples presença de febre tem salvado muitas vidas em regiões com alta endemia e sem recurso diagnóstico, porém tem sido a razão de desenvolvimento de resistência aos fármacos antimaláricas, confusão sobre a eficácia dos medicamentos e falha no diagnóstico de outras patologias febris (15,27,42).

Diagnóstico Por Microscopia – Em 2013, cerca de 197 milhões de pessoas foram testadas para malária por microscopia (2). Desde 1904, quando Gustav Giemsa estabeleceu a coloração de lâminas com azul de metileno e eosina, a microscopia se tornou o padrão ouro do diagnóstico parasitológico da malária. A microscopia com coloração de Giemsa tem mantido sua superioridade sobre os novos métodos por sua acurácia, baixo custo e capacidade de distinguir qualitativamente e quantitativamente as espécies de malária. No entanto, o método é observador dependente, o que significa investimento em microscopistas bem treinados. A sensibilidade de detecção do método em gota espessa pode variar de 4-20

parasitas/ μL , realizado por microscopistas de centros de referência de controle de qualidade, a 100 ou mais parasitas/ μL em condições reais de campo. A microscopia óptica continua sendo o único método aceito para verificação de cura (43).

Testes Rápidos – São testes baseados em tecnologia de imunocromatografia, que detecta antígenos da malária em uma pequena porção de sangue. Uma vez adquirido o teste, não há despesa com infraestrutura ou pessoal especializado para a operação. Tem sido muito útil em locais onde não existe microscopistas treinados, ou para confirmação diagnóstica em caso de dúvidas (43). A sensibilidade da maior parte dos testes ainda é insuficiente para detecção de parasitemia baixas (< 500 para *P. falciparum* ou 5.000 para o *P. vivax* parasitas/ μL). A geração atual de testes rápidos se baseia na detecção de um ou mais antígenos do Plasmodium: proteína rica em histidina 2 (HRP2, em inglês), a desidrogenase láctica (LDH) e a aldolase (44).

Diagnóstico Molecular – A amplificação de ácidos nucleicos usada como teste diagnóstico é uma técnica com alta sensibilidade, de alto custo e necessita de pessoal altamente capacitado, sendo por isso, até recentemente, utilizada quase exclusivamente em pesquisa. Os métodos atuais permitem a utilização da reação de cadeia da polimerase (PCR) tradicional ou real-time (RT-PCR), com detecção qualitativa e quantitativa da malária (44). Com a redução do preço e desenvolvimento de kits que exigem menor manuseio e sensibilidade ao ambiente externo de laboratórios, como os de Amplificação Isotermal Mediada por Circuito (LAMP, em inglês), surgem propostas para a utilização de testes moleculares como *point-of-care* no diagnóstico da malária, principalmente em áreas em que a alteração do foco de combate à malária mudou do controle para a eliminação (45,46).

1.1.4 TERAPIA E RESISTÊNCIA MEDICAMENTOSA

Tentativas de estabelecer tratamentos específicos para a febre típica da malária, discriminando-a de outras causas febris, são descritas na literatura. Principalmente com a descoberta da árvore da cinchona, como apresentado por Francisco Torti, em 1756, **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

Entre os pilares do combate à malária, segundo a OMS (2), o tratamento eficaz contra o *Plasmodium sp* tem se mostrado bastante importante, apesar de vulnerável. A pesquisa por drogas antimaláricas eficazes e efetivas, bem como o monitoramento de resistência a elas tem sido recomendado por instituições de fomento e coordenação de ações

ao combate à malária no mundo (2). Nos países onde tem sido possível assegurar o acesso e a qualidade das drogas, os resultados têm demonstrado uma redução significativa no número de casos. Hoje, as drogas antimaláricas são pertencentes a quatro categorias: a) As quinolinas: a quinina, um extrato, e as sintéticas, entre as quais estão as mais antigas formulações e ainda bastante utilizadas, como a cloroquina, a amodiaquina, a mefloquina e a primaquina, e recentes formulações, como a halofantrina, a lumefantrina, a atovaquona e a piperaquina; b) os antifolatos, frequentemente utilizados em combinações, sendo a mais reconhecida, a pirimetamina, associada à sulfadoxina; c) os antibióticos, como a doxiciclina e clindamicina, também utilizados sempre em combinação com drogas de outra classe, comumente com a quinina; d) a artemisinina e seus derivados, entre os quais atemeter e atersunato, estão entre as mais recentes armas contra a malária. A associação com outras drogas com meia-vidas mais prolongadas visam melhorar a farmacocinética e a farmacodinâmica das formulações, de maneira a melhorar a eficácia e evitar o desenvolvimento de resistência (47,48). Contudo, a resistência às drogas existentes tem surgido, colocando em risco todo o processo de controle mundial alcançado na última década (2,49,50).



Figura 1-5 Árvore de Torti, (17)

Os esquemas recomendados pela OMS estão no Guidelines for the treatment of malaria, WHO 2015 (27). Seguem abaixo, a referência de tratamento de primeira escolha

para as malária vivax e falciparum no Brasil, de acordo com as recomendações publicadas em 2010, nas Tabela 1-2, Tabela 1-3 e

Tabela 1-4, e, em continuidade, breves descrições sobre a quinina, a cloroquina, a primaquina e os derivados da artemisinina.

Tabela 1-2 Tratamento das Infecções pelo *P. vivax* com cloroquina em 3 dias e primaquina em 7 dias (esquema curto). Extraído do Guia prático de tratamento de malária no Brasil, 2010.

Idade/Peso	Número de comprimidos por medicamento por dia						
	1º dia		2º dia		3º dia		4º ao 7º dias
	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Primaquina INFANTIL
6-11 meses 5-9 kg	1/2	1	1/4	1	1/4	1	1/2
1-3 anos 10-14 kg	1	2	1/2	1	1/2	1	1
4-8 anos 15-24 kg	1	2	1	2	1	2	2
Idade/ Peso	Cloroquina	Primaquina ADULTO	Cloroquina	Primaquina ADULTO	Cloroquina	Primaquina ADULTO	Primaquina ADULTO
9-11 anos 25-34 kg	2	1	2	1	2	1	1
12-14 anos 35-49 kg	3	2	2	2	2	2	1
≥ 15 anos ≥ 50 kg	4	2	3	2	3	2	2

- Cloroquina: comprimidos de 150 mg, Primaquina infantil: comprimidos de 5 mg e Primaquina adulto: comprimidos de 15 mg.
- Sempre dar preferência ao peso para a escolha da dose.
- Todos os medicamentos devem ser administrados em dose única diária.
- Administrar os medicamentos preferencialmente às refeições.
- Não administrar primaquina para gestantes ou crianças menores de 6 meses (nesses casos usar a Tabela 3).
- Se surgir icterícia, suspender a primaquina.
- Se o paciente tiver mais de 70 kg, ajustar a dose de primaquina (Quadro 3).

Tabela 1-3 Tratamento das infecções por *Plasmodium falciparum* com a combinação fixa de artemeter+lumefantrina em 3 dias. Extraído do Guia prático de tratamento de malária no Brasil, 2010.

Idade/Peso	Número de comprimidos						
	1º dia		2º dia		3º dia		
	Manhã		Noite	Manhã	Noite	Manhã	Noite
	Artemeter + Lumefantrina	Primaquina comp 15mg	Artemeter + Lumefantrina				
6m-2 anos 5-14 kg	1	1/2	1	1	1	1	1
3-8 anos 15-24 kg	2	1	2	2	2	2	2
9-14 anos 25-34 kg	3	1 e 1/2	3	3	3	3	3
≥ 15 anos ≥ 35 kg	4	3	4	4	4	4	4

- Comprimido: 20 mg de artemeter e 120 mg de lumefantrina; Primaquina: comprimidos de 15 mg.
 - Cada tratamento vem em uma cartela individual, em quatro tipos de embalagem, de acordo com o peso ou idade das pessoas.
 - Sempre dar preferência ao peso para a escolha da dose.
 - No primeiro dia, a segunda dose pode ser administrada em intervalo de 8 a 12 horas.
 - Para crianças pequenas, esmagar o comprimido para facilitar a administração, podendo ingerir o comprimido com água ou leite.
 - Recomenda-se administrar o comprimido junto com alimentos.
 - Não administrar a gestantes durante o primeiro trimestre de gravidez, nem crianças menores de 6 meses (nesses casos, usar a Tabela 9)
 - A dose de primaquina não é necessária quando o paciente não reside, ou permanece, em área de transmissão.

Tabela 1-4 Tratamento das infecções por *Plasmodium falciparum* com a combinação fixa de artesunato+mefloquina em 3 dias e primaquina em dose única. Extraído do Guia prático de tratamento de malária no Brasil, 2010.

Idade/ Peso	Número de comprimidos por dia						
	1º dia		Primaquina comp 15mg	2º dia		3º dia	
	Infantil	Adulto		Infantil	Adulto	Infantil	Adulto
6-11 meses 5-8 kg	1		1/2	1		1	
1-5 anos 9-17 kg	2		1	2		2	
6-11 anos 18-29 kg		1	1 e 1/2		1		1
≥ 12 anos ≥ 30 kg		2	3		2		2

- Comprimido infantil: 25 mg de artesunato e 50 mg de mefloquina; adulto: 100 mg de artesunato e 200 mg de mefloquina; Primaquina: comprimidos de 15 mg.
- Cada tratamento vem em uma cartela individual, em quatro tipos de embalagem, de acordo com o peso ou idade das pessoas.
- Sempre dar preferência ao peso para a escolha da dose.
- Para crianças pequenas, esmagar o comprimido para facilitar a administração, podendo ingerir o comprimido com água ou leite.
- Recomenda-se administrar o comprimido junto com alimentos.
- Não administrar a gestantes durante o primeiro trimestre de gravidez, nem crianças menores de 6 meses (nesses casos, usar a Tabela 9).
- A dose de primaquina não é necessária quando o paciente não reside, ou permanece, em área de transmissão.

1.1.4.1 Quinino

A quinina é um alcaloide extraído da casca da cinchona, árvore natural das Américas. Desde 1640, a quinina já era conhecido por suas ações sobre a febre, quando foi apresentado à Europa por jesuítas vindos de missões no Peru. Em 1820, os químicos franceses Pierre Joseph Pelletier e Joseph Bienaime Caventou isolaram a quinina da cinchona, que se mantém ainda como única fonte da droga (48), foi utilizado para tratamento da malária de todas as espécies, com resultados bastante eficazes. Quando em monoterapia, eventos adversos de grau moderado a grave são relatados, o que levava ao abandono do tratamento antes do seu fim, reduzindo assim sua efetividade. Entre os principais eventos adversos estão, zumbido, cefaleia, náusea e distúrbios da visão, conhecidos como cinchonismo. Ainda mais graves consequências podem ocorrer em caso de sobredose, incluindo morte. A resistência à quinina foi pela primeira vez descrita em 1908, no Brasil, e demonstrada em 1938 entre os trabalhadores na construção da ferrovia Madeira-Mamoré entre o Brasil e Bolívia (51). A quinina foi deposto como droga de primeira escolha para o tratamento de malária, pela primeira vez, com a introdução da cloroquina, durante a

Campanha de Erradicação da Malária, e foi resgatado, passando a ser usado em combinação, quando a resistência do parasita da malária falciparum à cloroquina se expandiu mundialmente. A combinação de tratamento, usualmente com um antibiótico, como a doxiciclina, a eritromicina e a clindamicina, resulta na redução do tempo do uso da quinina para apenas 3 dias. Entretanto, as drogas combinadas deveriam ser continuadas até o quinto dia. Esta estratégia obteve êxito na redução dos eventos adversos da quinina e na minimização do problema da resistência, principalmente nas Américas, onde apresentava boa eficácia. Contudo, agregou os eventos adversos das drogas combinadas, o que manteve uma redução da efetividade do tratamento (52). Por uma segunda vez, a quinina foi retirada da primeira linha de tratamento com o advento dos derivados da artemisinina (ACTs) (2). No entanto, ainda é usada em casos de malária grave em situações especiais, principalmente às relacionadas a infecções em mulheres no primeiro trimestre de gestação (27,53). Apesar da baixa adesão voluntária, sua eficácia se manteve adequada tanto para a malária vivax quanto para a malária falciparum onde não circulam cepas resistentes, como nas Américas.

1.1.4.2 Cloroquina

A cloroquina, um sintético 4-aminoquinolina, foi produzida em 1934 (54) e tem sido utilizada no tratamento da malária como monoterapia, desde 1943, e, em associação com a primaquina, a partir de 1957 (55). Neste período, a preconização da associação destas drogas estava relacionada ao sinergismo para combate a formas sexuais e assexuais do parasito, pois ainda não era conhecida a forma hipnozoíta, descrita apenas em 1962. No período de 1946 a 1966, foi a droga de primeira escolha no tratamento e na profilaxia para malária em áreas endêmicas (56). A cloroquina, apesar de amarga, semelhantemente a quinina, não compartilha com esta os eventos adversos sérios, além disso, é uma droga sintética, que não depende de cultivo em regiões de difícil acesso, com produção mais barata e, sobretudo, dispõe de meia-vida mais longa que a quinina, fator muito importante para evitar as recorrências. Seu uso em larga escala dentro da política da Campanha Global de Erradicação da Malária (OMS) nos anos 60, resultou no surgimento de resistência contra o *P. falciparum*, com apenas duas décadas de uso. Entre os fatores que podem ter contribuído para a resistência, pode-se citar a prescrição de dose inadequadas, a descontinuidade do tratamento, o uso indiscriminado e a qualidade inapropriada da droga (56). Sobretudo, duas medidas foram bastante trágicas, a distribuição da cloroquina como tratamento massivo e a sua inclusão no sal de cozinha para profilaxia de toda população em áreas de risco (55). A cloroquina mantém-se bastante eficaz contra as demais formas de malária, porém, recentes

relatos de resistência do *P. vivax* tem surgindo em vários pontos do globo (57-60). A recomendação do tratamento radical da malária vivax não complicada pela OMS é a combinação da cloroquina e da primaquina, com resultados de cura clínica e parasitológica em 28 dias, em estudos de eficácia, acima de 90% (27).

Farmacologicamente, a cloroquina possui dois enantiômeros, a (-) - cloroquina, menos ativa e a (+) - cloroquina, mais ativa contra cepas de *P. falciparum*, podendo ser administrada por via oral, subcutânea e intramuscular. Quando administrada por via oral, tem rápida absorção pelo trato gastrointestinal, demonstrando cerca de 75-80% de biodisponibilidade. A concentração máxima no plasma é atingida em 2-3h, com a meia-vida de 3-6 dias e meia-vida de eliminação variando de 2-3 dias no plasma e ao redor de 12 dias nos tecidos. A eliminação completa da cloroquina, contudo, parece ser muito mais prolongada. Seu principal metabólito, a mono-desetilcloroquina, mantém a mesma atividade antimalárica. Após uma única dose de 300mg, cerca de 70% da droga é eliminada na forma ativa e pode ser detectada na urina durante 120 dias. O uso de drogas não antimaláricas, como bloqueadores de canal de cálcio, antidepressivos tricíclicos e anti-histamínicos podem resultar em manutenção dos níveis de cloroquina (56).

A ação antimalárica da cloroquina é resultado da sua interferência no metabolismo digestivo da hemoglobina pelo parasita no interior dos eritrócitos. O grupo heme é tóxico para o plasmódio e precisa ser metabolizado para a forma cristalóide não tóxica, hemozoína, que é conhecida como pigmento malárico. Durante degradação da hemoglobina, um estresse oxidativo intenso é produzido no interior do vacúolo e precisa ser contido. A cloroquina se liga fortemente ao heme dentro do vacúolo, impedindo a formação de hemozoína, que resulta na destruição oxidativa do vacúolo digestivo e do plasmódio (61).

A resistência a cloroquina está ligada à mutação no cromossomo 7, com um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP), no gene de resistência ao transporte da cloroquina do *P. falciparum* (pfert), representado pela substituição de uma lisina por uma treonina no códon 76 (62) e o aumento do número de cópias da proteína 1 de resistência a múltiplas drogas (63). Esta mutação resulta na restrição da entrada da cloroquina através da membrana do vacúolo digestivo do plasmódio para dentro do vacúolo (64).

1.1.4.3 Primaquina

A primaquina, um 8-aminoquinolina, é usada para a eliminação de gametócitos (formas sexuadas) no sangue e dos hipnozoítos (do ciclo tecidual) no fígado, responsável

pela recaídas. A primeira vez que um 8-aminoquinolina foi utilizada como tratamento para evitar as recaídas da malária vivax foi em 1924, mas foi descontinuado, por descredito da comunidade científica (65). Ela foi combinada a cloroquina inicialmente como uma forma de sinergismo contra as formas sanguíneas, sexuadas e assexuadas, e, mais tarde, como cura radical da malária vivax, na prevenção de recaídas, creditado às formas hipnozoítas, descobertas no fígado. Seu mecanismo de ação não está esclarecido e o estabelecimento da eficácia e da resistência são um desafio em regiões endêmicas, devida, praticamente, à impossibilidade de distinção entre recaídas e reinfeções (66). A dose padrão recomendada pela OMS é de 15 mg por dia (0,25 mg/Kg) por 14 dias, embora o tratamento alternativo com 30 mg por dia por 7 dias tem sido usado, com menor resultado de eficácia, porém com melhor efetividade, devido a adesão ser superior com o período mais curto. (16,18,67). Com relação a farmacocinética, a primaquina é bem absorvida pelo trato gastrointestinal, atinge o pico plasmático em 6 horas, com grandes variações individuais, podendo ocorrer de 1 a 3 horas. A primaquina não é ativa e precisa ser metabolizada no fígado, em carboxiprimaquina, então, é excretada na urina (68).

Os eventos adversos da primaquina são bem tolerados quando ingerida após a alimentação. Os mais frequentes estão ligados ao sistema gastrointestinal, como dor abdominal, náusea e vômito (69). Em pacientes com deficiência moderada ou grave da enzima desidrogenase glicose-6-fosfato (G6PD), a primaquina causa destruição de eritrócitos que pode levar a anemia grave. Embora recomendada pela OMS, a dosagem da G6PD não é indicada previamente ao tratamento com primaquina no Brasil, mas em pacientes com história pregressa de icterícia ou suspeita de deficiência leve, deve-se optar por um esquema terapêutico com dosagens menores diariamente e vigilância de hemólise. Em deficiência moderada, uma dose de 0,75 mg/kg por semana por 8 semanas e nos casos de deficiência grave, a primaquina não deve ser usada. Nesses casos um tratamento supressivo com cloroquina, com uma dose de 300 mg por semana por 12 semanas, é uma alternativa para prevenir recaídas clínicas (15,27,53,70).

Ainda não existe uma droga alternativa a primaquina aprovada com ação contra os hipnozoítos no fígado atualmente. A mais promissora, no momento, é a tafenoquina, uma 8-aminoquinolina sintética, que tem apresentado bons resultados em dose única, que se encontra em estudos de fase III. Produz intensa hemólise em pacientes com deficiência de G6PD, o que limita seu uso onde a prevalência da deficiência é alta ou desconhecida (71).

1.1.4.4 Derivados da artemisinina

Descobertos na China nos anos 70, os derivados da artemisinina (ACTs) são originados da qing hao (*Artemisia annua*), uma erva já utilizada para tratamento da febre intermitente na China por mais de 2 mil anos (72). Tal classe de drogas se tornou estratégica com o surgimento de cepas de *Plasmodium* multirresistentes no sul da Ásia, e rapidamente se tornou a primeira linha de tratamento para malária falciparum na maior parte dos países endêmicos. Sua atividade antimalárica está ligada a liberação de radicais oxidativos no interior do plasmódio. A artemisinina e seus derivados hidrossolúvel e lipossolúvel, o artesunato e o artemeter, respectivamente, após administração, são metabolizados em dihidroartemisinina que mantém a atividade antimalárica. Quando administrados por via oral ambos apresentam uma meia vida entre 1-3h e, por via intravenosa, de cerca de 8-11h e 23h, para o artesunato e para o artemeter, respectivamente. Devido a meia vida curta, para manter doses terapêuticas por 3-4 ciclos do parasita, são necessários 5-7 dias de tratamento, o que provou ser impraticável pelo frequente abandono do tratamento após 3 dias. Entretanto, associado a drogas com meia vida mais longa, sua adesão e eficácia são bastante efetivas (72). As formulações orais mais comuns são a combinação com a lumefantrina (artemeter-lumefantrina), a mefloquina (artesunato-mefloquina: ASMQ) e a amodiaquina (artesunato-amodiaquina). Estas combinações se mostram eficazes para todas as malárias humanas com cepas não resistentes, com alta taxa de redução parasitária e níveis terapêuticos acima de 30 dias (73).

Os derivados da artemisinina administrados por via oral, apresentam raros eventos adversos graves, entre eles anemia, principalmente em altas dose (15,74). Os mais importantes são: dor abdominal, anorexia, náusea, vômito, diarreia, cefaleia e tontura; além de prurido e *rash* cutâneo, reportados em menos de 2% dos pacientes(75).

Especificamente para pacientes com malária grave, os ACTs por via parenteral são a primeira linha de tratamento. O artesunato intravenoso ou intramuscular ou, na sua ausência, artemeter intramuscular. Ainda, a quinina em infusão intravenosa é a terceira opção, somente usado na falta dos ACTs (15).

A resistência aos ACTs é um processo recente, surgindo em diversas áreas a partir de 2007, no Cambódia, ao *P. falciparum* (76). A resistência tem se espalhado rapidamente pela Ásia e . Cepas que apresentam a mutação na formação da proteína K13, apresentam uma taxa de resposta parasitológica mais baixa (77). Estudos de vigilância e

resistência a drogas antimaláricas e presença da mutação K13 ou de outros sinais moleculares de resistência, como o *pfmdr1*, *pfert*, *pfdhfr* e outros têm sido implementados com o objetivo de detectar e salvaguardar umas das últimas alternativas para o tratamento da malária falciparum multirresistente (15,62,73,78).

1.1.5 PLANOS DE CONTROLE, ELIMINAÇÃO E ERRADICAÇÃO

A malária tem sido um flagelo para humanidade, presente tanto na vida cotidiana, em vilas e cidades, quanto em eventos de repercussão históricos grandiosos, como empreendimentos estratégicos de desenvolvimento regional, bem como em campanhas militares regionais e globais. A abrangência territorial, diferentemente de hoje, que se limita a regiões tropicais, já alcançou os limites extremos das regiões temperadas, envolvendo cerca de 137 países (65). Em vista das descobertas sobre o agente etiológico, do vetor transmissor da malária humana, de um tratamento medicamentoso efetivo, seguro e com produção sintética e barata (cloroquina), na presença de um inseticida bastante efetivo, como o diclorodifeniltricloroetano (DDT), foi bastante tentador produzir e executar um plano de combate a malária. Assim, nasce a Campanha de Erradicação Global da Malária, em 1955, conduzida pela recém-criada (1948), Organização Mundial de Saúde (OMS). Seus sucessos e fracassos tiveram imensos impactos geopolíticos, socioeconômicos, e, sobretudo, ecosanitários, deixando para as futuras gerações os desafios da perda da cloroquina como o tratamento eficaz da malária falciparum, a perda do DDT como inseticida de combate ao mosquito vetor, além dos efeitos tóxicos do DDT, usado intensamente, sem o conhecimento de seus efeitos residuais no ambiente. (65). Contudo, com ações de manejo de terreno, combate sistemático do mosquito e tratamento eficaz, cerca de 30% da população mundial, perto de 700 milhões de pessoas, deixou de habitar em áreas de risco para malária até 1978.

No Brasil, semelhantemente ao que ocorreu em outros países, a Campanha de Erradicação da Malária (1965-1978) produziu bons frutos para algumas regiões. Em 1979, as regiões do Nordeste, Sudeste, Centro-oeste e Sul do Brasil foram consideradas livres da malária, onde cerca de 40 milhões de pessoas estiveram sob risco de infecção (79). Na região da bacia amazônica os resultados já não foram tão eficazes. A proximidade com a floresta húmida, que mantinha o criadouro dos mosquitos, os domicílios com estruturas impróprias para a borrifação do DDT, o padrão de chuva, a formação de lagos em períodos de estiagem e o desenvolvimento precoce de resistência à cloroquina no tratamento da malária falciparum demonstraram que o plano não tinha os componentes para ter sucesso na região Norte (79,80).

Após o fracasso da erradicação da erradicação global da malária, a OMS passou a recomendar estratégias de controle da malária para os 30 anos seguintes. Principalmente a partir de 1992, após a Conferência Ministerial de Amsterdã, as orientações tinham como objetivo o diagnóstico rápido, o tratamento eficaz e a proteção do indivíduo com uso de mosquiteiros impregnados (79,81). Com a participação de instituições não governamentais investindo em pesquisa, produção de drogas e implementação de estratégias de combate à malária mais regionalizadas, vários projetos foram efetivados no mundo, recebendo ajustes nos objetivos e programas, como os propostos pelo *Roll Back Malaria*, da OMS em 1998 (82), e pelo *Millennium Development Goals 2000-2015*, das Nações Unidas (83). Observou-se uma redução de cerca 75% das mortes por malária no mundo, além de uma redução em números de casos na ordem de 50% em muitos países endêmicos, principalmente entre os casos produzidos pela *P. falciparum*. Com estes resultados, a OMS e outras Instituições surgem com a possibilidade de eliminação da malária em algumas regiões, trabalhando com estratégias mais específicas para cada cenário (2).

1.1.5.1 Malária e outras ciências

Uma definição ensinada às crianças na escola primária sobre o que é Ecologia diz: “Ecologia é a parte da **biologia** que estuda a relação dos seres vivos entre si e deles com o meio ambiente”. Apesar de estar 100% correta, o estudo das relações dos seres vivos e o meio ambiente atingiu, nas últimas duas décadas, magnitude tal que já não se limita ao campo da biologia. A malária, evoluindo com o homem, que com sua capacidade tecnológica tem rapidamente transformado o seu *habitate* em escala global, mostra-se também sensível aos reflexos das ações da humanidade e das mudanças do planeta.

No capítulo sobre a Epidemiologia da malária, do livro *Malaria – Molecular and Clinical Aspects* (31), o autor apresenta os diversos aspectos ecológicos que têm alterado a epidemiologia da malária. Com a constante **Urbanização**, há um movimento contínuo, gente que deixa o campo e passa a viver nas cidades. De início, pessoas infectadas, em regiões com baixos índices demográficos, levam a infecção para áreas de alta densidade demográfica, facilitando a transmissão. Principalmente, porque devido as dificuldades iniciais, os imigrantes tendem a habitar em regiões de baixo desenvolvimento sanitário, onde a presença do vetor é mais provável. Num segundo momento, a transmissão nos grandes centros fica restrita a área periférica, que continua a apresentar infraestrutura precária e população empobrecida, ainda, acentuada pela proximidade com lagos e florestas.

Entretanto, a mortalidade em regiões urbanas é menor, devido a maior facilidade de acesso aos serviços de saúde e ações ativas de saúde pública.

Os avanços do **desenvolvimento econômico** trazem demandas de produção de alimentos, energia, moradia e transporte, que requerem a contínua transformação do meio ambiente. É bastante reconhecida a relação entre produção de riqueza e redução de malária. Desde que uma boa parcela da população tenha acesso a riqueza produzida. Por exemplo, para o uso da terra na produção de alimentos, grandes áreas são desflorestadas, precisam de irrigação, precisam de água, e então, são construídos reservatórios. Esses projetos atraem e precisam de pessoas, iniciando o processo imigratório. quando bem coordenado e com recursos financeiros adequados. O resultado frequentemente é uma redução dos casos de malária e melhora da qualidade de vida da população, como ocorrido na Itália e nos Estados Unidos nos anos 30 (65). Contudo, quando o planejamento e os recursos financeiros não são suficientes, ocorre o contrário. Foi o que aconteceu no Brasil, nas décadas de 70 e 80, durante a ocupação da região amazônica e, principalmente, do estado de Rondônia, quando a imigração rápida e descoordenada elevou o número de casos/ano, no território brasileiro, de 52.000 casos em 1970 para cerca de 600.000 casos em 1989, com mais de 90% destes exclusivo da região Norte (5,79,80). As **migrações** humanas, pela a razão que seja, guerras, fome, desastres, negócios ou turismo, planejadas ou não, são as principais formas de distribuição de resistência a drogas. Cepas são compartilhadas entre regiões bastante distantes com a facilidade e rapidez dos transportes modernos (31).

Um tema bastante em voga, que afeta a todos nós, são as **mudanças climáticas**. Deixando de lado as razões e as causas, a verdade é que o clima da terra tem mudado, elevando a temperatura dos oceanos, resultando em tempestades tropicais mais intensas e inversos mais rigorosos. A mudança no padrão climático, principalmente o aquecimento global, tem resultado em epidemias de malárias em áreas hipoendêmicas, ou onde estiveram ausentes, simplesmente ao elevar a população de anofelinos nestas regiões.

Por último, a **descontinuidade dos serviços de saúde**. Após os anos 70, a malária tem se mantido na área compreendida em que a maioria dos países em desenvolvimento se encontram. Essas regiões são bastante sensíveis a alterações econômicas mundiais, podendo resultar em instabilidade política e econômica, levando a desestruturação dos serviços de saúde que deixam de prover equipamentos, insumos e pessoal necessário para o controle de endemias como a malária. A malária falciparum é um bom indicador da

qualidade da organização do sistema de saúde regional, pois esta é bastante sensível as ações programáticas e precocemente respondem às medidas de controle e, da mesma forma, à falta de delas.

Assim como ter saúde não implica somente em não estar doente, a eliminação da malária não depende apenas dos conhecimentos sobre a biologia do hospedeiro e do parasita, mas também em investir na transformação positiva da forma como nós humanos alteramos o meio ambiente e a relação com nossos semelhantes para que o ecossistema global seja saudável.

1.1.5.2 Efetividade: fator adesão ao tratamento antimalárico

A eficácia de um tratamento, ou seja, a proporção de cura de uma ou mais drogas, quando ingeridas sob supervisão direta, pode não ser suficiente razão para a adoção do tratamento em situações “de vida real” (17). A falta de adesão ao tratamento é um dos fatores mais importantes que influenciam na efetividade do tratamento quando a droga em questão apresenta eficácia e qualidades de produção adequados (16). Pereira, EA *at al.* (18) apresentam um resumo de razões para a baixa adesão em regiões endêmicas de malária: a) orientação posológica inadequada ou paciente não entende as instruções de uso; b) esquecimento; c) perda do medicamento; d) ocorrência de eventos adversos; e) uso concomitante de bebida alcoólica; e f) desaparecimento dos sintomas da malária antes do fim do tratamento. A duração do tratamento é um fator bastante importante para a adesão, de forma que o uso da cloroquina por 3 dias em associação com a primaquina por 7 versus 14 dias para malária vivax pode resultar em menor adesão no grupo com 14 dias. (16-18). Outra variável especial é a distribuição de fármacos em apresentações independentes, que tem um impacto relevante em vários fatores citados. Esse estudo ainda demonstra que o Brasil tem apresentado um dos mais altos indicadores de adesão ao tratamento para a malária vivax no mundo, o que pode ser explicado pela segurança de diagnóstico e entrega dos fármacos para o tratamento no mesmo local e, ademais, pelo controle da distribuição gratuita dos medicamentos em todo território nacional pelo serviço público. Uma outra abordagem que tem demonstrado melhorar a adesão é a associação em blister de duas ou mais medicações com frequência e duração de tomada diferentes, representando benefícios para a compreensão da posologia, na logística de armazenamento e auxiliando a lembrança de uso do medicamento (84).

As definições dos tratamentos com drogas antimaláricas nacionais são frequentemente orientadas com estudos de eficácia, uma vez que os estudos de efetividade demandam um número maior de pacientes, resultando em custo mais alto. Todavia, de forma indireta, as medidas que promovem a adesão resultam em melhor efetividade, pois reduzem a frequência de doses subterapêuticas, com isso, a seleção de cepas resistentes, e assim, preservando a eficácia dos tratamentos atuais.

1.1.5.3 Reconhecendo a resistência

A OMS, em protocolos de monitoramento e avaliação de eficácia de drogas ou nos guias terapêuticos da malária (27,85) utiliza os termos, resposta clínica e parasitológica adequada (RCPA) – quando na ausência de parasitemia, independente da temperatura axilar; e falha terapêutica (FT) – divididas em precoce (antes de D3, com parasitemia e piora clínica ou entre D3-D7 com parasitemia aumentando) e tardia (entre D7 e D28, presença de parasitemia) – quando definem as respostas esperadas aos tratamentos com drogas antimaláricas, para as malárias falciparum e vivax (86).

Entretanto, falha terapêutica não é sinônimo de resistência. Como mencionado no item anterior, a eficácia se diferencia da efetividade pela primeira ser alcançada em condições de controle, que buscam condições ideais de uso da droga, certificando-se que níveis ideais terapêuticos sejam alcançados na corrente sanguínea. De forma que estudos de eficácia são mais indicados quando se procuram conhecer a sensibilidade e a resistência dos microrganismos às drogas avaliadas. A resistência pode ser afirmada quando o parasito pode ser detectado com níveis da droga dentro da concentração mínima efetiva no sangue. Nesta condição, na terapêutica da malária vivax e ovale, a resistência pode ser classificada como tipos R1, R2 e R3. O tipo R1 ocorre quando, após a administração do medicamento, não mais se detecta o parasito, obtendo-se um período de lâminas de microscopia negativa, contudo em um período, ela se torna positiva novamente; com o tipo R2, a parasitemia é reduzida, mas nunca se negativa, retornando a subir; e no tipo R3, a parasitemia se mantém inalterada ou aumentando.

Ainda, deve-se observar o tempo, ou quão precoce os parasitos são detectados novamente, pois uma recorrência, mesmo mais tardia pode indicar o surgimento de cepas com resistência inicial, com doses baixas da droga em uso (87), a qual pode passar desapercibida como uma reinfeção ou recaída tardia. A dosagem dos níveis séricos das

drogas sob investigação de eficácia é uma informação crucial quando se detecta a recorrência da infecção por malária para a adequada caracterização da resistência.

1.1.5.4 A resistência ao tratamento da malária vivax com cloroquina

Embora existam relatos de resistência a cloroquina em vários países, ainda ela é a droga mais utilizada no tratamento para malária vivax. A vigilância ao surgimento de resistência às drogas antimaláricas é uma estratégia preconizada pela OMS. Dois artigos de publicados em 2011 e 2014 (66,88) fazem uma síntese dos achados de diversos estudos sobre a eficácia da cloroquina no período compreendido entre 1953 à 2014. O primeiro faz um levantamento menos criterioso, incluído protocolos com diversas formas de tratamento, desde ingestão assistida ou não, uso de diferentes doses, até o uso ou não da primaquina, conjuntamente ou posteriormente, além dos diferentes desfechos para definir a falha terapêutica ou resistência, que mostrou resultados dispares e contraditórios mesmo dentro de uma mesma região geográfica (66). Eles encontraram entre 87 ensaios clínicos e 59.735 pacientes, de 20 países, valores de falha terapêutica que ficaram compreendidos entre 0 e 90%. Estes dados provam quão complexo é determinar a real eficácia da cloroquina para o tratamento da malária vivax, simplesmente pela falta de padronização do método. O segundo, entretanto, utilizando-se de critérios mais rígidos, como dose da cloroquina supervisionada, uso não concomitante da primaquina, dosagem da cloroquina sanguínea quando da recorrência da infecção e desfecho de 28 dias para determinação de eficácia do tratamento, encontrou que a resistência a cloroquina estava presente em cerca de 7% dos 112 sítios de estudo selecionados. Contudo, em até 53% dos sítios, não se incluía a medida da concentração da cloroquina sanguínea no dia da recorrência (88).

Ambos, discutindo o papel da primaquina como primordial para cura radical para malária vivax, apresentam um desafio incremental quando se avalia a resistência às drogas antimaláricas para a malária vivax. Diferentemente da malária falciparum, a presença da forma hipnozoíta da malária vivax produz recaídas, que são recorrências da malária que não são resultantes nem da resistência às drogas esquizonticida sanguíneas (recrudescência) e nem de reinfecções. Ainda, as recaídas podem ser causadas por cepas com padrões moleculares distintos da primeira malária, pois os esporozoítos que são injetados durante o repasto sanguíneo do mosquito são poli clonais, o que, até o momento, não se permite estabelecer, com certeza, quando uma recorrência é devida a recaída ou a reinfecção. As formas hipnozoítas são tratadas com a primaquina, e sua eficácia tem sido questionada quando recaídas acontecem (29).

A falta de modelos animais adequados e protocolos clínicos seguros para a avaliação da eficácia da primaquina não só tem dificultado a definição da resistência a esta droga, bem como ao monitoramento da resistência à cloroquina (88).

Baseado na dificuldade de padronização dos métodos para comparar a eficácia e a presença de resistência, recomendações têm sido feitas para que os novos estudos relacionados a eficácia da cloroquina abordem de forma constante os seguintes aspectos: Pacientes devem ser sintomáticos; o tratamento com primaquina deve ser atrasado para após o 28º dia; seguimento do tratamento por mínimo de 28 dias; e para a resistência à cloroquina, além das anteriores, acrescentar que: o tratamento deva ser supervisionado; documentação da dose exata ministrada; dosagem do nível sanguíneo no dia 7 do tratamento e no dia da recorrência da parasitemia e confirmação farmacológica da qualidade da droga utilizada no estudo (88).

1.1.5.5 Justificativa para o desenho deste estudo

Este estudo, não incorpora os aspectos para avaliação da eficácia e da resistência à cloroquina citados no item anterior. Ele busca avaliar a eficácia e a segurança do tratamento combinado de cloroquina e primaquina como tratamento radical para malária vivax não complicada. Ainda, introduzindo uma nova apresentação farmacêutica, com o comprimido de cloroquina revestido. Apesar da cloroquina revestida ser utilizada em alguns países, não existe estudos validados ou registro nacional (ANVISA) ou internacional (FDA ou OMS) desta formulação. O revestimento da cloroquina é uma alteração maior de formulação e este estudo dará suporte ao registro sanitário desta nova formulação de cloroquina revestida em uma apresentação em co-blister com primaquina.

Este co-blister é uma inovação no tratamento para malária vivax que ambiciosamente busca a melhor da adesão, através do mascaramento do sabor amargo da cloroquina, facilitando a sua ministração oral e da apresentação conjunta das duas drogas em um único blister com doses adequadas por peso e/ou idade dos pacientes. Como já mencionado anteriormente, a qualidade da adesão tem efeitos diretos e indiretos na efetividade dos medicamentos. Esperamos que o produto possa incorporar-se ao arsenal terapêutico antimalárico nacional.

2 OBJETIVO

Avaliar a eficácia terapêutica e segurança de uma nova formulação de cloroquina 150 mg, com revestimento administrada em associação com primaquina 15 mg para o tratamento de malária não complicada causada por *Plasmodium vivax*.

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar a taxa de cura no dia 28, medida por intenção de tratamento (IT) e por protocolo (PP), onde a análise por protocolo é considerada a análise primária e a análise por intenção de tratamento é complementar dos resultados obtidos.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

2.2.1 *SEGURANÇA*

Avaliar a tolerabilidade (segurança) aferida por meio do monitoramento de eventos adversos (EA), clínicos ou laboratoriais.

2.2.2 *FARMACOCINÉTICA*

Avaliar a farmacocinética por níveis séricos de cloroquina em papel de filtro nos dias 0, 3, 7, 14, 21 e 28 ou em qualquer dia que houver falha.

3 MÉTODOS

3.1 LOCAL E POPULAÇÃO DO ESTUDO

Este estudo foi conduzido no município de Porto Velho, capital do Estado de Rondônia, que apresenta uma população pouco acima de 500.000 (estimada), com clima úmido, com área de 34.080 Km², situada na região Norte do Brasil, com fronteiras com o Estado do Amazonas ao norte, com o município de Candeias do Jamarí ao sul, com Estado do Acre a noroeste e com município de Guajará Mirim à oeste, bastante próximo à fronteira Brasil-Bolívia. A cidade completou recentemente 100 anos de fundação, com história intimamente relacionada com a evolução da malária no Brasil. Os ciclos de desenvolvimento econômico e populacional da região coincidem com períodos de aumento dos casos de malária, que passou pelo ciclo da borracha, construção da Estrada de Ferro Madeira-Mamoré, construção da BR364 e colonização do Estado de Rondônia e, por último, as construções das hidrelétricas do rio Madeira. Houve uma redução importante dos casos de malária em todo o Estado nos últimos 10 anos, deixando os cerca de 100.000 casos/ano em 2005, para menos de 10.000 em 2015. Entretanto, os municípios de Porto Velho e Candeias do Jamarí são responsáveis por mais de 80% dos casos totais do Estado. Cerca de 90% da malária é causada pelo *P. vivax* atualmente.

Os pacientes avaliados para o estudo foram atendidos no serviço ambulatorial do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia, CEPEM, o qual recebe por demanda espontânea pacientes febris para realização de lâminas para diagnóstico de malária. Cerca de 4.000 lâminas são lidas anualmente, com 10-15% delas positivas para malária. O CEPEM é o responsável por 1/3 dos casos diagnosticados em Porto Velho. Os casos não complicados são acompanhados no ambulatório, enquanto os pacientes diagnosticados com sinais e sintomas mais graves são encaminhados para atendimento hospitalar no CEMETRON, hospital terciário especializado em doenças tropicais, em continuidade física com o CEPEM. Os participantes deste estudo foram atendidos no CEPEM.

3.2 DESCRIÇÃO GERAL DO DESENHO DO ESTUDO E PLANO

Este é um estudo de monitoramento de eficácia que tem um único braço de avaliação prospectiva das respostas clínicas e parasitológicas do tratamento com administração diretamente observada para tratamento de malária não complicada causada por *P. vivax*.

Pacientes com malária não complicada que atenderam aos critérios de inclusão foram tratados e monitorados por 28 dias. Os acompanhamentos consistiram de vistas previamente estabelecidas no cronograma de avaliações (0, 1, 2, 3, 7, 14, 21 e 28) assim como as avaliações clínicas e laboratoriais correspondentes. Com base nestas avaliações, os pacientes foram classificados como falha terapêutica ou cura. A proporção de pacientes com falha terapêutica durante os acompanhamentos foi usada para estimar a eficácia do produto teste.

3.2.1 *DISCUSSÃO DO DESENHO DO ESTUDO INCLUINDO AUSÊNCIA DE GRUPO CONTROLE*

Um desenho de monitoramento de eficácia foi considerado suficiente pelo PNCM/MS para a avaliação de uma nova formulação de cloroquina. Uma anuência de pesquisa clínica para este estudo com o mesmo fim foi expedida pela ANVISA (CE No. 188/2012, expediente 0896111125, em 05 de novembro de 2012, em nome da Fundação Oswaldo Cruz). Uma inscrição do projeto de pesquisa também foi realizada no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (REBEC), com o número: RBR-77q7t3. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) local, com CAAE-Sisnep no. 0001.0.046.000-11.

A metodologia deste estudo segue rigorosamente as recomendações metodológicas estabelecidas pela OMS que definem que uma taxa de cura superior a 90% é um critério suficiente para que os programas nacionais de controle de malária confirmem a adequação do esquema terapêutico para o perfil de resistência de um determinado país. Esta metodologia, no entanto, não permite, randomização ou cegamento, uma vez que se trata de um ensaio de único braço.

O presente estudo não avalia a alteração de dosagem ou uma nova associação de drogas. O uso concomitante de cloroquina e primaquina vem sendo usado no país há mais de trinta anos e que encontra amplo respaldo na literatura e prática clínica quanto sua segurança. Recente revisão da literatura analisou mais de sessenta ensaios realizados desde 1958 com o uso concomitante de cloroquina e primaquina confirmando seu bom perfil de segurança John *et al.*, em 2012 (66).

Por causa da ausência de fármaco de referência na lista da ANVISA ou na OMS não foi possível uma comparação de níveis séricos entre a formulação nova e uma anterior com o intuito de provar intercâmbio entre formulações. Assim optou-se por um ensaio clínico que não utilizasse medidas indiretas de eficácia como níveis séricos adequados, mas

sim o padrão ouro como desfecho, isto é a cura parasitológica, a ausência de parasitemia em D28.

3.2.2 CRITÉRIO DE INCLUSÃO

Os critérios de inclusão no estudo eram:

- a) Idade superior ou igual a 18 anos e inferior ou igual a 70 anos;
Considerada por ser uma faixa etária não vulnerável.
- b) Peso entre 50kg e 90kg;
Nesta faixa de peso não é necessário ajuste na dose da cloroquina.
- c) Mono infecção por *P. vivax* confirmada por microscopia;
- d) Contagem de parasitos assexuados $> 250/\mu\text{l}$;
- e) Temperatura axilar $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ ou história de febre durante as 48h antes do recrutamento;
- f) Capacidade para engolir os medicamentos em estudo;
- g) Disponibilidade e desejo de atender ao cronograma de avaliações do estudo;
- h) Concordar e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.2.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os critérios de exclusão no estudo eram:

- a) Presença de condições clínicas relacionadas à malária vivax que requerem hospitalização (coma, disfunção respiratória ou anemia grave);
- b) Presença de condições febris devido a outra doença além da malária (exemplo, sarampo, infecção aguda do trato respiratório, diarreia com desidratação) ou outras comorbidades crônicas ou grave (por exemplo doença renal, cardíaca ou hepática crônica, e HIV/SIDA);
- c) Qualquer doença ou achados clinicamente significante durante a avaliação médica ou exame físico que, na opinião do investigador, possa interferir no estudo. No entanto,

toda e qualquer decisão será registrada nas fichas de recrutamento para evitar viés de seleção.

- d)** Uso de medicamentos que possam interferir na farmacocinética dos antimaláricos em estudo, como:
- antiácidos, que podem reduzir a absorção da cloroquina,
 - cimetidina, que aumenta a ação da cloroquina podem ser,
 - quinacrine, dado aumento do potencial de toxicidade da primaquina e drogas que alteram a motilidade gastrointestinal,
 - em caso de relato de uso de medicamentos concomitantes, será realizada consulta na base de dados Drug Interaction Checker (disponível em - <http://www.medscape.com/druginfo/druginterchecker?cid=med>).
- e) Hipersensibilidade aos fármacos do estudo;
- f) Presença de deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, relatada pelo paciente; Gravidez ou lactação;
- g) Indígenas. (População vulnerável e morar fora de área de acompanhamento).
- h) Uso de tratamento antimalárico em período menor que 63 dias antes dos sintomas.

3.2.4 RETIRADA DE PACIENTES E SUSPENSÃO DO TRATAMENTO

Todos os participantes de pesquisa foram informados da sua liberdade de se abster da participação deste estudo e da possibilidade de abandonar o estudo a qualquer momento, sem que fosse necessário definir a razão e sem que a assistência médica a eles fosse comprometida.

Foram realizados a administração supervisionada de cloroquina e atendimento domiciliar por equipes capacitadas para os procedimentos. Pacientes que não se apresentaram aos retornos marcados para avaliações de desfecho, isto é, D28, foram classificados como perdas de acompanhamento e excluídos das análises por protocolo. Pacientes que perderam alguma visita de acompanhamento, mas que, subsequentemente, foram avaliados antes do desfecho final (dia 28), não foram excluídos das análises.

Outros motivos previstos para termino precoce do acompanhamento clínico previsto no cronograma de avaliações do estudo eram:

- a) Não encontrado durante os três primeiros dias do estudo;
- b) Ocorrência de eventos adversos sérios, alterações laboratoriais de graus 3 ou 4 ou outras condições clínicas que o médico assistente considerasse impeditivas para dar continuidade ao tratamento.
- c) Hipersensibilidade aos produtos utilizados;
- d) Falha terapêutica e necessidade de terapia de resgate
- e) Violações de protocolo.

3.3 TRATAMENTOS

O tratamento utilizado é aquele preconizado pelo Programa Nacional de Controle de Malária.

3.3.1 TRATAMENTOS ADMINISTRADOS

Os medicamentos foram administrados por via oral, única tomada diárias entre 8 e 10 horas da manhã, conforme a posologia por faixas de peso, descrita na Tabela 3-1. As doses foram supervisionados somente nos três primeiros dias, período de uso da cloroquina em combinação a primaquina.

Tabela 3-1 - Posologia dos medicamentos do estudo

Número de comprimidos por medicamento por dia									
Peso kg	1° dia		2° dia		3° dia		4° ao 7° dia	8° dia	9° dia
	Cq 150 mg	Pq 15mg	Cq 150 mg	Pq 15 mg	Cq 150 mg	Pq 15mg	Pq 15 mg	Pq 15 mg	Pq 15 mg
≥ 50 -69	4	2	3	2	3	2	2	0	0
70-79	4	2	3	2	3	2	2	2	0
80-90	4	2	3	2	3	2	2	2	2

As dose da cloroquina são fixas e as dose da primaquina são corrigidas para as faixas de peso, calculando-se a dose total de 3,2 mg/kg, distribuída em um número maior de dias, para que se não excedesse o máximo de 30 mg/dia de primaquina.

3.3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS INVESTIGACIONAIS

O fabricante forneceu certificados de análise dos lotes que foram utilizados no estudo. Estes lotes foram produzidos de acordo com a s Boas Práticas de Fabricação (BPF).

Todos os medicamentos foram enviados diretamente da fábrica ao centro de pesquisa.

A Tabela 3-2 apresenta detalhes de formulação lotes e datas de validade dos produtos usados no ensaio clínico.

Tabela 3-2 - Informações sobre os produtos investigados

Nome Comercial	Cloroquina Farmanguinhos	- Primaquina- Farmanguinhos
Nome do fármaco	fosfato de cloroquina	Difostato de primaquina
Classe química	derivado sintético	4- derivado 8-aminoquinolina aminoquinolina
Formulação	Comprimidos revestidos	comprimidos
Fabricante	Instituto de Tecnologia em Fármacos Farmanguinhos - FIOCRUZ	Instituto de Tecnologia em Fármacos Farmanguinhos - FIOCRUZ
Lote:	11090655	12010038 13030282
Validade	30-09-2014	30-01-14 30-03-15
Dosagem por comprimido	150 mg	15 mg

Após a inclusão do paciente no estudo e pesagem para cálculo do número de comprimidos de primaquina, o investigador ou pessoa por ele delegada e treinada conforme registro de delegação de funções, dispensava o tratamento e registrava e assinava no formulário de controle de medicamentos. Os medicamentos na utilizados foram retornados a fábrica para procedimento de incineração.

Estes documentos de controle de envio e retorno para descarte de medicamentos assim como os certificados de análise estão disponíveis no arquivo do investigador, no do patrocinador e no sistema de qualidade do fabricante.

3.3.3 SELEÇÃO DAS DOSES DO ESTUDO

O tratamento utilizado foi aquele preconizado pelo Programa Nacional de Controle de Malária. Como hipnozoiticida do *P. vivax*, a primaquina é eficaz na dose total de 3,0 a 3,5 mg/kg total de peso. Para tanto, calcula-se a dose de 0,50 mg de base/kg de peso por dia, durante sete dias. Em caso de pacientes com mais de 70 kg de peso, a dose de primaquina pode ser ajustada, calculando-se a dose total de 3,2 mg/kg de peso, que pode ser atingida num período maior de dias (53).

3.3.4 SELEÇÃO DO HORÁRIO DE ADMINISTRAÇÃO

Os pacientes incluídos no estudo receberam as doses conforme descrito anteriormente.

Cada dose de cloroquina e as três primeiras doses de primaquina foram administradas sob a supervisão de um profissional treinado e delegado para tal função, sendo a primeira dose administrado no momento do diagnóstico e as doses seguintes entre 8 e 10 horas da manhã. O horário preciso foi registrado em documento fonte e transcrito para CRF para avaliação dos resultados de farmacocinética.

Os pacientes foram observados durante trinta minutos após cada administração em caso de vômitos neste período uma nova dose foi administrada. Não houve restrições a ingestão de alimentos.

Após o terceiro dia, a administração do medicamento não foi sob supervisão direta, mas foi avaliada por questionamento direto ao paciente na visita subsequente à última dose do medicamento.

3.3.5 TERAPIA PRÉVIA OU CONCOMITANTE

Todo medicamento administrado ao paciente durante o período de tratamento, além das medicações do estudo, teve o nome, dose, via de administração, data da primeira administração e período registrados da maneira mais precisa possível, dentro das limitações inerentes a dados coletados a partir dos relatos dos pacientes.

Por causa da longa meia vida da mefloquina, o uso de tratamento antimalárico em período menor que 63 dias antes do aparecimento de sintomas foi considerado critério de exclusão.

Administração, pelo próprio sujeito do estudo ou terceiro, de outra droga antimalárica ou antibiótico com comprovada ação antimalárica durante o estudo foi

considerada justificativa para retirada do paciente do estudo e acompanhados de acordo com a rotina do CEPEM.

3.3.6 ADESÃO AO TRATAMENTO

O tratamento foi completamente supervisionado nos três primeiros dias por equipes de atendimento domiciliar devidamente capacitadas. Os pacientes foram observados durante 30 minutos após a administração do medicamento para observação de eventos adversos. Em caso de vômitos dentro de 30 minutos, os pacientes foram retratados com a mesma dose do medicamento e observados por mais trinta minutos. Em caso de novo vômito, os pacientes foram retirados do estudo e tratados com terapia de resgate. A terapia de resgate foi realizada com Coartem® (lumenfantrina-artemeter), por 3 dias, e primaquina, ajustada a dose e tempo para o peso, como já descrito anteriormente. A terapia de resgate, descrita, também foi utilizada em caso de falha terapêutica.

As doses de primaquina entre os dias 4 e 7 (8 e 9, dependendo do peso) foram auto administradas, no entanto, na primeira visita após as medicações encerrarem, os pacientes foram questionados sobre a adesão ao tratamento. A adesão foi definida como tratamento incompleto, quando a suspensão do uso do medicamento ocorreu antes da 7ª dose, e tratamento irregular, quando a duração do tratamento foi maior do que ao de dias programado inicialmente e/ou intervalo entre duas doses foi superior a 24 horas.

3.4 AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA, SEGURANÇA E FARMACOCINÉTICA

Os pacientes incluídos na pesquisa foram convidados para participar e deram seu consentimento livre e esclarecido por escrito. Após o qual foram submetidos a exame físico completo, além de confirmação diagnóstica por exame de esfregaço. Também foram submetidos à coleta de amostras para a realização de exames complementares (**Tabela 3-3**) e aos procedimentos diagnósticos pertinentes para avaliação dos critérios de inclusão e exclusão. A anamnese, incluindo história patológica pregressa para avaliação posterior de EA e amostra de farmacocinética inicial foram coletadas antes da administração (dia 0). Participantes do sexo feminino em idade reprodutiva, definida como pós-menarca ou idade ≥ 12 anos realizaram teste rápido de gravidez em urina antes de serem incluídas no estudo.

As avaliações programadas foram realizadas nos dias 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21 e 28 e incluíam a contagem parasitária, avaliação clínica de sinais e sintomas de malária, incluindo temperatura axilar, exames complementares e relatos de EA. Os pacientes foram orientados

a buscar assistência fora das visitas agendas em caso de EA. Amostras para farmacocinética foram coletas em pontos específicos conforme descrito na Tabela 3-3.

A Tabela 3-3 descreve as avaliações planejadas para o estudo.

Tabela 3-3. Cronograma de acompanhamento e esquema de exames dos pacientes do estudo para avaliação de eficácia, segurança e parâmetros farmacocinéticos co-blister de comprimidos revestidos de cloroquina 150 mg e primaquina 15 mg produzidos por Farmanguinhos/Fiocruz.

Procedimento/Dia	0	1	2	3	7	14	21	28	Outro
Avaliação Clínica	X	X	X	X	X	X	X	X	(X)
Temperatura	X	X	X	X	X	X	X	X	(X)
Coleta de sangue para contagem de parasita	X		X	X	X	X	X	X	(X)
Amostra de urina	(X)								
Coleta de amostras de Sangue para:									
Hemoglobina e Hematócrito	X					X		X	(X)
Marcadores moleculares	(X)		(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)
Farmacocinética	X			X	X	X	X	X	(X)
Medicamento a ser testado				Tratamento durante 7 a 9 dias.					
Terapia de Resgate		(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)

Parênteses denotam atividade opcional ou condicional

3.4.1 MEDIDAS DE EFEITO DE EFICÁCIA

3.4.1.1 Avaliação parasitológica

Duas coletas de sangue distintas foram realizadas no dia 0, a triagem inicial foi feita por gota espessa e o esfregaço.

Gota espessa foi avaliada ainda nos dias 2, 3, 7, 14, 21 e 28, bem como qualquer outro dia que os pacientes retornaram espontaneamente. Gota espessa e esfregaços corados com Giemsa foram examinados a aumento de 1000x para determinar espécie e densidade parasitária em triplicata. A gota espessa inicial foi usada para contagem de formas assexuadas de parasitos e leucócitos em um número limitado de campos. A parasitemia adequada para inclusão foi definida como pelo menos um parasito para cada seis leucócitos, que corresponde a aproximadamente a 1000 formas assexuadas de parasito por microlitro.

A segunda lâmina foi usada para se estimar a densidade parasitária, através da contagem de formas assexuadas de parasitos dentro de um conjunto de leucócitos (usualmente 200) com um contador manual.

$$\text{Densidade parasitária (por } \mu\text{l)} = \frac{\text{Número de formas assexuadas} \times 6.000}{\text{Número de leucócitos contados}}$$

Um esfregaço foi considerado negativo quando no exame de 1000 leucócitos não for visualizado nenhuma forma assexuada de parasitos. A presença de gametócitos na inclusão foi registrada.

Dois microscopistas treinados fizeram a leitura das lâminas de maneira independente e a densidade parasitária foi calculada através da média das duas contagens. Resultados discrepantes (definidos como discordância de espécie ou densidade parasitária > 50% ou presença de parasitas) foram avaliados por um terceiro microscopista e a densidade parasitária foi calculada pela média das duas contagens mais próximas.

3.4.2 *MEDIDAS DE EFEITO DE SEGURANÇA*

Eventos adversos (EA) são sinais, sintomas e alterações em exames laboratoriais que surgem ou tornam-se mais frequentes ou mais graves, após o uso de um medicamento ou procedimento. Assim sendo, diferenciam-se dos sintomas produzidos pela doença, a malária, pela temporalidade. Embora possam se confundir, quando as alterações fisiopatológicas mantêm os sintomas da doença mesmo após o início do medicamento. Buscando diferenciar “alhos de bugalhos”, eventos, classificados como eventos adversos, também foram sub classificados com relação causal com o medicamento como: não relacionado, improvável, possível ou provável.

Avaliações de sinais e sintomas clínicos e exames laboratoriais, relatos de eventos adversos e uso medicamento concomitante foram realizados ao longo de todo estudo. Uma equipe clínica composta de um médico, 3 enfermeiros, 2 técnicos de enfermagem estava disponível 24h, todos os dias da semana para contato por telefone, agendamento de consulta fora do cronograma ou inclusive, visitas domiciliares. De forma que as informações de segurança fossem colhidas em momento oportuno. As avaliações clínicas, protocolares, foram realizadas nos dias definidos na Tabela 3-3 . O valor da hemoglobina e do hematócrito foram avaliados nos dias 0, 14, 28, através de amostras colhidas por punção venosa e encaminhada para laboratório de referencia, certificado.

Eventos adversos sérios definidos como aqueles que levem à morte, sejam de risco à vida, demandem hospitalização com internação ou prolongamento de hospitalização

existente, ou resultem em deficiência/incapacidade persistente ou significativa, foram reportados ao Patrocinador e Comitê de Ética local.

Eventos adversos foram classificados de acordo com sua gravidade utilizando-se a escala de avaliação do National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events, versão 4.0 (adaptada para este estudo, Tabela 3-4) (89) e relação do medicamento com o evento apresentado. A classificação dos EA foi realizada pelo médico da equipe. A descrição do evento, assim como, sua duração e conduta, foi incluída nos formulários apropriados.

Tabela 3-4 Classificação da gravidade de sintomas

Gravidade dos sintomas	Descrição
1	Leve, sem comprometimento das atividades de rotina
2	Leve, porém com comprometimento das atividades de rotina, melhora com medicação rapidamente.
3	Média, comprometimento das atividades e repouso restrito necessário, medicação constante para alívio.
4	Não melhora com medicação, sendo necessária hospitalização.

Avaliações de segurança durante a triagem incluíam realização do teste rápido de gravidez em participantes do sexo feminino em idade reprodutiva, definida como pós-menarca ou idade ≥ 12 anos. Esta população recebeu instruções sobre a importância da contracepção durante o período do estudo e foi fornecido acesso a métodos anticoncepcionais de barreira.

3.4.3 MEDIDAS DE EFEITO DE FARMACOCINÉTICA

Amostras para determinação da concentração de cloroquina foram coletadas de acordo com o cronograma de avaliações nos dias 0, 3, 7, 14, 21 e 28. Em caso de falha terapêutica foi realizada coleta no dia da falha. A presença de parasitos em níveis séricos da droga superiores a 100ng/ml, os caracteriza como parasitos resistentes (58). Não foi possível realizar a avaliação da farmacocinética da primaquina neste estudo, por limite orçamentário.

3.4.4 AFERIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS DROGAS

As concentrações plasmáticas de cloroquina foram dosadas por método analítico validado usando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC/ MS-MS). A etapa analítica foi desenvolvida e conduzida de acordo com a

legislação vigente no país, a RDC 27 de 17 de maio de 2012, pelo Serviço de Farmacocinética (SEFAR) da Vice-Presidência de Produção e Insumos para Saúde (VPPIS) da FIOCRUZ que é um centro analítica acreditado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Foram calculados os parâmetros farmacocinéticos C_{max} , ASC_{0-t} , ASC_{0-inf} , T_{max} , $T_{1/2}$. Sendo T_{max} o tempo necessário para que ocorra o C_{max} . C_{max} é a máxima concentração sérica observada durante a coleta. ASC_{0-t} é a área sob a curva de concentração sanguínea versus tempo medida do instante 0 ao instante t, onde t é o tempo relativo à última concentração determinada experimentalmente e é calculada pelo método dos trapézóides. $T_{1/2}$ é a meia-vida de eliminação do fármaco, que é o tempo para reduzir a concentração plasmática do fármaco à metade. ASC_{0-inf} é a área sob a curva de concentração sanguínea versus tempo, calculada do tempo zero ao tempo infinito (dias). O volume de distribuição (Vd) e o Clearance aparente (Cl).

3.5 ADEQUAÇÃO DESTAS MEDIDAS

Todos os procedimentos clínicos laboratoriais e microbiológicos realizados nestes estudos são recomendados nos protocolos da OMS para estudos de monitoramento de eficácia. Estes exames também são o padrão de avaliação de pacientes com malária apenas quando atendidos em unidades secundárias ou terciárias do SUS. Os exames laboratoriais descritos no protocolo foram realizados em um único laboratório com certificação quanto a calibração de seus equipamentos. Adicionalmente os pacientes foram submetidos a exames laboratoriais no CEPEM segundo critérios clínicos

3.6 GARANTIA DA QUALIDADE DOS DADOS

O patrocinador é responsável pela garantia da qualidade dos dados gerados no estudo de acordo com as Boas Práticas Clínicas - Documento das Américas. O controle de qualidade dos dados foi realizado pela plataforma de pesquisa clínica da VPPLR-Fiocruz em cada um dos estágios da coleta e manuseio dos dados. Os procedimentos operacionais padrões (POP) para as visitas de monitoria e manuseio de dados estão inseridos no sistema de qualidade da VPPLR que é certificado pela ISO 9001.

Os dados deste estudo foram coletados através de uma ficha clínica eletrônica, o Openclinica em versão open source. O software foi hospedado pelo serviço de Tecnologia da Informação de Farmanguinhos. Este serviço é inspecionado quanto as BPF pela ANVISA.

O monitor de estudos clínicos avaliou e documentou de acordo com POP em visita de monitoria pré estudo as instalações do centro e capacitação do pessoal de pesquisa em BPC e demais qualificações para adequada condução do estudo.

A visita de monitoria iniciação do estudo foram verificados a disponibilidade de todo material necessário a condução do estudo, incluindo o medicamento e suas instruções de armazenamento e manuseio. Nesta visita foi feito treinamento nos procedimentos do protocolo, uso do Openclinica.

Durante o curso do estudo os monitores verificaram todos os TCLE e se os dados dos pacientes foram registados de maneira correta e completa, assim como desvios ou violações do protocolo. A verificação da fidelidade dos dados foi realizada através da comparação dos dados dos documentos fontes com aqueles das fichas clínicas. Eventuais discrepâncias foram sinalizadas e informadas ao investigador principal e equipe do centro. O acompanhamento das discrepâncias foi realizado por telefone ou online. A ficha clínica eletrônica permite monitorias remotas e definição de intervalos de valores conhecidos para identificação precoce de discrepâncias. Os relatórios das visitas estão disponíveis no arquivo patrocinador.

Gerenciamento de dados

Os dados foram coletados através de dupla entrada. Um responsável pela qualidade no centro de pesquisa verificava os dados, inclusive os usados para avaliação de eficácia antes de sua entrada. As discrepâncias entre digitadores ou resultados fora dos intervalos fisiológicos foram inicialmente automaticamente identificadas pelo software, as discrepâncias restantes posteriormente foram identificadas pelos monitores e, por fim, o estatístico responsável pela limpeza do banco gerou queries antes que o congelamento fosse feito. Todas estas alterações e os responsáveis por elas assim como seus esclarecimentos estão registradas no *audit log* do software Openclinica.

3.7 MÉTODOS ESTATÍSTICOS PLANEJADOS E DETERMINAÇÃO DO TAMANHO AMOSTRAL

Foram apresentadas as proporções para variáveis categórica e médias e mediana para variáveis contínuas, com seus respectivos intervalos de confiança (IC95%). A comparação entre mediana de variáveis contínuas com três grupos foi realizada pelo test Kruskal-Wallis (o valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo). Para os

calculados foram usando os softwares Epi Info7® (CDC) e Excel® (MsOffice) versão 14.4.0. A análise farmacocinética foi realizada utilizando-se o programa WinNonlin versão 6.3 (Pharsight Corp, Mountain View, Calif, EUA).

Este estudo avaliou a eficácia e segurança, sendo aquela avaliada por intenção de tratamento (IT) e por protocolo (PP), onde a análise por protocolo é considerada a análise primária e a análise por intenção de tratamento é confirmatória dos resultados obtidos.

População para avaliação de segurança

Todos os pacientes que receberam pelo menos uma dose do tratamento e que tiveram alguma avaliação clínica ou laboratorial após esta dose foi incluído na análise. A presença de qualquer EA, não descrito na história patológica pregressa, foi registrada e descrita, incluindo sinais e sintomas relacionados a malária.

População para análise Intenção de Tratar

Todos os pacientes que foram incluídos no estudo foram selecionados para análise por IT.

População para análise por protocolo

Todos os pacientes que não tiveram violações maiores de protocolo e possuíam dados para a avaliação de efeito primária, contagem da parasitemia em D28, foram incluídos na análise PP.

Foram consideradas violações maiores de protocolo aqueles que afetam o desfecho de eficácia do estudo ou o tratamento do paciente.

Cabe uma explicação mais detalhada sobre os métodos de análise por Intenção de Tratar e Por Protocolo. A análise por IT inclui todos os participantes incluídos independente se seguiram ou não estritamente o protocolo do estudo, mesmo aqueles que abandonaram, incluídos erroneamente, ou fizeram uso de medicamento de forma irregular. É uma análise bastante rígida e conservadora, que considera que qualquer situação com resultado diferente de resposta adequada ao tratamento como falha. Por outro lado, na análise Por Protocolo somente são verificados os participantes que foram incluídos e concluíram o estudo dentro do protocolo. É uma análise dentro dos parâmetros planejados, porém sofre a crítica de que não mantém todos os benefícios da aleatorização das amostras, podendo

incluir vieses e amplificar os benefícios dos resultados. Este estudo segue o desenho estabelecido pela OMS que estabelece a análise do tipo PP. Contudo, optamos por manter a análise por IT para que satisfizesse todas as condições e preferências dos leitores.

Análise Primária de eficácia

A proporção de sucesso versus falha terapêutica é apresentada em números absolutos (n) e frequências relativas (%) e os intervalos confiança de 95% até o dia 28.

Análise Secundária

Análise de desfechos secundários de eficácia:

- a) Taxa de sucesso terapêutico cumulativa até dia 28 (ou a probabilidade de permanecer sem parasitos no dia 28) foi definidas usando o método de análise de sobrevivência Kaplan-Meier.
- b) Número absoluto de pacientes com presença de sintomas ou exame parasitológico positivo no dia 3 (72h pós tratamento) para caracterização de falha clínica e parasitológica precoce.
- c) Tempo para desaparecimento de sinais e sintomas de malária.

Análise dos desfechos de segurança:

Foi realizada análise de segurança descritiva das frequências de eventos adversos e estratificação entre:

- a) Pacientes com EA Graves. Definido pelo médico avaliador, com os critérios descritos no item sobre Medidas de Segurança.
- b) Pacientes com EA que levaram a suspensão do tratamento
- c) Pacientes com EA relacionados a droga (causalidade descrita como possível, provável)

Alteração da mediana do hematócrito e da hemoglobina dos pacientes em relação ao baseline.

3.7.1 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO AMOSTRAL DO ESTUDO

O tamanho da amostra foi calculado com a suposição de que o tratamento teste demonstra-se taxa de falhas de até 5%. Buscando um o intervalo de confiança de 95% e precisão de 5%, um mínimo de 73 pacientes deveria ser incluído no estudo. Esperando perdas

de acompanhamento e retiradas de até 20% do cálculo amostral, foi definida a inclusão de 88 pacientes.

3.8 ALTERAÇÕES NA CONDUÇÃO DO ESTUDO E DA ANÁLISE PLANEJADAS

Todas as alterações na condução do estudo foram previamente notificadas e aprovadas pelo CEP. A definição de anemia grave como critério de inclusão não estava presente no protocolo e para tanto foi utilizado o critério de *Hg < 7g/dL aferida por HemoCue®, conforme previsto no cronograma de avaliação inicialmente aprovado no CEP.

* A hemoglobina foi dosada após a assinatura do TCLE, como ainda critério de exclusão, através de punção de polpa digital e leitura em fita em equipamento móvel, HemoCue® hb 201 system.

A alteração da análise planejada do protocolo consiste em adequação da descrição da população para análise PP. O protocolo definia como pacientes elegíveis a análise PP aqueles que atendessem aos seguintes critérios:

- a) Pacientes que tenham cumprido os critérios de inclusão.
- b) Pacientes que fizeram pelo menos as visitas de acompanhamento visita 7, 14 e 28.
- c) Pacientes que fizeram tratamento regular.
- d) Pacientes que apresentaram resultados positivos nos exames confirmatórios de mono infecção por *P. vivax*.

Para a avaliação da eficácia primária do produto, optou-se por incluir todos os pacientes com tratamento irregular ou não, e aqueles que tivesse avaliação parasitológica final (em D28) que permite a avaliação do desfecho principal do estudo.

Assim, os critérios para análise por protocolo final foram:

- a) Pacientes que tenham cumprido os critérios de inclusão.
- b) Pacientes que fizeram a visita de acompanhamento em D28.
- c) Pacientes que apresentaram resultados positivos nos exames confirmatórios de mono infecção por *P. vivax*.

A alteração retirada do critério sobre tratamento irregular para inclusão do paciente na análise PP é justificada, pois todos os pacientes receberam tratamento supervisionado de cloroquina e primaquina durante os três primeiros dias. Portanto, todos os tratamentos foram completos (regulares) para a atividade esquizotocida do tratamento. A

análise de efeito primária do estudo em 28 dias avalia a atividade esquizotípica do tratamento.

O desfecho principal do estudo é cura sustentada até 28 dias após o tratamento. Foram incluídos na análise de desfecho primário, todos os pacientes com resultado de cura ou falha em 28 dias, mesmo que não tenha comparecido em alguma das visitas de acompanhamento do dia 7 ou 14.

4 RESULTADOS

4.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Um total de 2.928 (2.074 homens; 854 mulheres) pacientes foram atendidos no CEPEM, com resultado de lâmina positiva, durante o período do estudo, sendo a data da primeira inclusão 17/04/2013 e 30/05/2014 o término do acompanhamento do último paciente. Aqueles que cumpriam os critérios iniciais de inclusão eram encaminhados ao centro de pesquisa clínica. Foram definidos como critérios iniciais de triagem e não encaminhamento a equipe de pesquisa clínica: procura de atendimento para realização de exame para acompanhamento de tratamento prévio externo ao estudo, i.e., Lâmina de Verificação de Cura (LVC); horário de atendimento noturno ou fim de semana; parasitemia alta definida como quatro cruzeiros; encaminhado do hospital Cemetrón. Um total de 921 foram encaminhados a equipe de pesquisa clínica do CEPEM, os pacientes eram reavaliados quanto aos critérios de exclusão e incluídos, ou não, no estudo. O motivo mais frequente para não inclusão do paciente no estudo (41,7%) foi a impossibilidade de acompanhamento, pelo paciente residir em áreas remotas e, portanto, estar impossibilitado de atender ao cronograma de avaliação proposto pelo estudo. A presença de malária em período inferior a 63 dias (21,4%) foi a segunda causa de não inclusão no estudo.

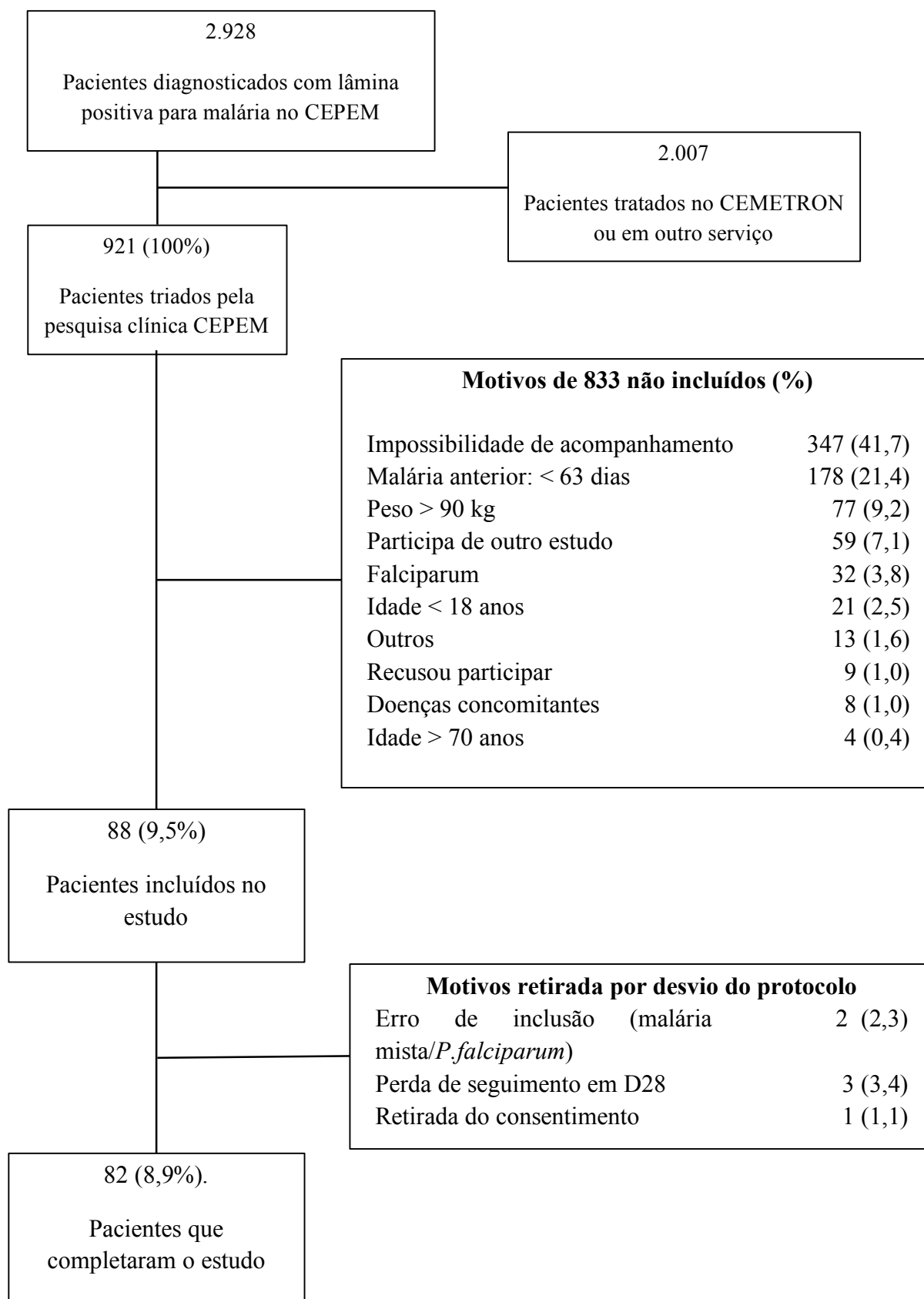
Seis pacientes foram retirados do estudo e não foram incluídos na análise PP. Os motivos da retirada, o número absoluto e porcentagem de amostra são apresentados na Tabela 4-1.

Tabela 4-1 - Motivo de retirada do estudo e da análise PP

Motivo de retirada do estudo	Número de pacientes (%)
Erro de inclusão por malária por <i>P. falciparum</i>	01 (1,14%)
Violação de protocolo involuntária (malária mista)	01 (1,14%)
Perda de seguimento em D28	03 (3,42%)
Evento Adverso Grave	0
Retirada de consentimento	01 (1,14%)
Readoecimento antes de D28	0

O número de pacientes incluídos, retirados precocemente do estudo e os motivos de não inclusão deles no estudo são apresentados na Figura 4-1.

Figura 4-1 - Descrição da população e razões para não inclusão ou retirada do estudo ou da análise PP.



4.2 DESVIOS DE PROTOCOLO

Todos os 88 pacientes incluídos foram analisados por IT para os desfechos de eficácia, mesmo aqueles com diagnóstico por *P. falciparum*.

Todos os 88 pacientes foram incluídos nas análises de segurança.

Os desvios de protocolo mais graves que resultaram na exclusão do paciente da análise por protocolo foram inclusão equivocada de pacientes por erro de inclusão por malária por *P. falciparum*, 1 (1,14%), perda de seguimento em D28, 3 (3,42%), retirada de consentimento, 1 (1,14%) e violação de protocolo involuntária, 1 (1,14%). Este último paciente apresentava malária vivax a microscopia ótica no momento da inclusão. E as revisões de lamina conforme procedimento descrito em protocolo confirmam este diagnóstico. O paciente, no entanto, teve piora do quadro clínico e inicialmente foi tratado como um evento adverso grave. A investigação do EA levou ao diagnóstico da malária por *P. falciparum* por PCR, com resposta a terapêutica instituída para esta forma de malária e completa recuperação. Conforme terminologia prevista no protocolo o paciente foi tratado como violação involuntária de protocolo.

Os 3 (3,48%) pacientes com tratamento irregular para os 7 dias de primaquina foram incluídos na análise PP. O tratamento irregular registrado no estudo se refere ao uso da primaquina, dado que a cloroquina foi supervisionada e esta era a formulação inovadora e responsável pela atividade esquizotocida. Optou-se por manter estes pacientes na análise PP, uma vez que a atividade hipnozoitocida da primaquina (para prevenção de recaídas) só poderia ser avaliada adequadamente fora de áreas endêmicas e em acompanhamentos de até dois anos.

Outro desvio de protocolo que impacta no desfecho secundário de eficácia de tempo para o clearance parasitológico foi a ausência de visitas em D3. Foram registrados 4 (4,5%) pacientes com este desvio. Destes pacientes, no entanto, apenas 1 (1,14%) foi incluído na análise do desfecho principal em 28 dias, por ter todos outros dias de visita, incluindo o D28. Os motivos de retirada estão apresentados na Tabela 4-1.

4.3 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

Os dados demográficos e outras características de base no momento da inclusão dos pacientes no estudo estão sumarizados nas tabelas 6 a 8 abaixo. Todas os pacientes tiveram informações sobre as condições, patologias, sinais e sintomas registrados nos

documentos fontes e transcritos nas fichas clínicas (não há registro de dados faltantes) portanto o percentual de pacientes com ausência das características descritas nesta seção é complementar aos apresentados nas tabelas abaixo, exceto número de dias de sintoma e malária anterior (n=76).

4.3.1 DADOS GERAIS

Dados de características gerais dos pacientes no dia da inclusão, anteriormente ao início do tratamento, discriminados segundo a análise proposta - por IT e por protocolo - são apresentados na

Tabela 4-2.

Todas as idades e pesos descritos da população estão de acordo com aquelas definidas nos critérios de inclusão do estudo da última versão do protocolo.

A descrição em números absolutos e em percentagens da população da análise por IT de comorbidades e condições referidas pelos pacientes ao momento da inclusão no estudo é descrita na

Tabela 4-3.

Tabela 4-2 - Dados de características gerais da população do estudo em D0, discriminados por tipo de análise proposta - por intensão de tratar (IT) e por protocolo (PP).

Variável	IT (N=88)	PP (N=82)
Sexo		
Masculino	67 (76,14%)	61 (74,4%)
Feminino	21(23,8%)	21 (25,6%)
Idade (anos)	38,4 (19-68)	38,2 (19-68)
18-39	53 (60,2%)	48 (58,5%)
40-59	33 (37,5%)	32 (39,0%)
60-70	2 (2,3%)	2 (2,5%)
Peso (kg)	70,7 (51-90)	70,7 (52-90)
>50 a 69	41 (46,6%)	39 (47,6%)
70 a 79	27 (30,7%)	24 (29,3%)
80 a 90	20 (22,7%)	19 (23,2%)
Malária anterior (sim)	76 (86,4%)	71 (86,6%)
Número de malária anterior		
zero	12 (13,7%)	11 (13,4%)
1-5	41 (46,6%)	39 (47,6%)
6-10	15 (17,0%)	14 (17,1%)
>10	17 (19,3%)	15 (18,3%)
Não sabe informar	3 (3,4%)	3 (3,7%)
Febre durante exame (sim)	33 (37,5%)	32 (39,0%)
Temperatura °C	37,8 (35,8-41,6)	37,8 (35,9-41,6)
Parasitemia (parasitas/μL)	2.360 (282-12.000)	2.360 (282-12.000)
PA sistólica (mmHg)	113 (90-150)	112,9 (90-150)
PA diastólica (mmHg)	71,9 (50-100)	71,8 (50-100)
Tempo de sintoma em dias (n=76)*	3,7 (1-15)	3,8 (1-15)
Hemoglobina (mg/dL)	13,5 (8,6-16,8)	13,4 (8,6-16,8)
	40,9 (27,8-51,5)	40,7 (27,8-51,5)

O índice para as estatísticas apresentadas é: número absoluto (%) para variáveis categóricas e média aritmética (intervalo interquartil) para variáveis contínuas, exceto para *, que significa mediana (intervalo interquartil), por não apresentar distribuição normal.

Tabela 4-3 - Dados referidos pela população IT de condições e patologias preexistentes

Condição ou comorbidade N=88	Presente	
	n	(%)
Alergias	11	(12,5)
Hipertensão arterial Sistêmica	4	(4,6)
Doenças Neuropsiquiátricas	2	(2,3)
Drogas ilícitas atualmente	2	(2,3)
Asma	1	(1,1)
Tireoidopatias	1	(1,1)

O uso de bebida alcoólica regularmente, definida como a ingestão semanal, independente da medida, foi relatada em 50% dos participantes. O uso do tabaco diariamente foi relatado por 29,5% entre a população estudada. Todos os pacientes negaram a história patológica pregressa de acidentes vasculares cerebrais, diabetes mellitus, doença pulmonares obstrutivas crônicas, doenças sexualmente transmissíveis e doenças hemolíticas.

4.3.2 SINAIS E SINTOMAS CLÍNICOS

Os sinais e sintomas de malária por *P. vivax* presentes no momento da inclusão dos pacientes no estudo em número absolutos e frequência estão sumarizados na Tabela 4-4 e

Tabela 4-5 respectivamente.

Tabela 4-4 - Sinais apresentados pelos pacientes com malária por *P. vivax* presentes no momento da inclusão por IT.

Exame físico alterado	n	(%)
Dor a palpação abdominal	24	(29,6)
Descoramento de mucosas	13	(14,8)
Ictérico	6	(6,8)
Desidratado	2	(2,3)
Edema de membros inferiores	1	(1,1)

Ao exame físico não foi identificado ausculta cardíaca alterada, ausculta respiratória alterada e nem hepatoesplenomegalias.

Os sintomas mais frequentes,

Tabela 4-5, foram febre (98,7%), mialgia (90,9%), calafrio (89,8%) e cefaleia (86,4%).

Tabela 4-5 - Sintomas apresentados pelos pacientes com malária por *P. vivax* presentes no até o momento da inclusão por IT.

Sintomas	Presente	
	n	(%)
Febre	87	(98,9)
Mialgia	80	(90,9)
Calafrio	79	(89,8)
Cefaléia	76	(86,4)
Artralgia	67	(76,1)
Sudorese	67	(76,1)
Inapetência	60	(68,2)
Náusea	48	(54,5)
Dor retro-ocular	42	(47,7)
Tontura	42	(47,7)
Dor Abdominal	40	(45,5)
Vômito	20	(22,7)
Dispnéia	17	(19,3)
Prurido	10	(11,4)
Vertigem	10	(11,4)
Diarreia	9	(10,2)
Oligúria	9	(10,2)
Confusão Mental	6	(6,8)
Disúria	6	(6,8)
Icterícia	5	(5,7)
Exantemas	2	(2,3)
Manchas	1	(1,1)

4.3.3 MEDIDAS DE ADESÃO AO TRATAMENTO

A adesão nos três primeiros dias do tratamento com uso concomitante de cloroquina e primaquina foi de 84 pacientes (95,4%) na população por IT, uma vez que houve uma perda de follow-up no dia 3, uma exclusão por violação involuntária do protocolo, um erro de inclusão e um abandono. Na avaliação PP, a adesão nos três primeiros dias foi de 100%.

Dois pacientes (2,3%), ID22 e ID33 optaram por interromper o tratamento com primaquina nos dias 5 e 4 respectivamente, não houve nenhum prejuízo à assistência médica a eles. Durante o período de ingestão não supervisionado da primaquina, com adesão avaliada por questionamento do participante na visita subsequente à última dose, mostrou 100% de adesão.

4.4 RESULTADOS DE EFICÁCIA E FARMACOCINÉTICA

4.4.1 ANÁLISE DE EFICÁCIA

O objetivo primário deste estudo é provar taxa de cura superior a 90% avaliadas tanto na população por IT como PP. Onde PP é considerada a análise primária e IT confirmatória dos resultados obtidos.

Análise de Efeito primária

A taxa de cura é definida como proporção de sucesso versus falha terapêutica e é apresentada, na Tabela 4-6, em números absolutos (n) e frequências relativas (%), com os intervalos confiança de 95% até o dia 28, para a população PP.

Tabela 4-6 - Proporção de sucesso e falha na população PP em número total e percentagens com IC 95% válido em D28.

População por Protocolo	D28 (n=82)	
	n	% (IC 95%)
Resposta clínica e parasitológica adequada	81	98,8 (93,4-99,9)
Falhas	1	1,2 (0,0-6,6)
Causas		
Falha de tratamento precoce	0 (0,0)	0 (-)
Falha clínica tardia	1* (1,2)	1,2 (-)
Falha parasitológica tardia	1* (1,2)	1,2 (-)

* Ambos se referem ao mesmo caso.

Os dados de eficácia para população IT, incluindo as causas de falha e os dados da população IT são apresentados na Tabela 4-7.

Tabela 4-7 - Número absoluto e percentagens de causas de falha terapêutica na população IT em D28.

População por Intenção de Tratar	D28 (n=88)	
	n	% (IC 95%)
Resposta clínica e parasitológica adequada	81	92,0 (84,3-96,7)
Falhas	7	7,9 (3,3-15,5)
Causas		
Erro de inclusão	1 (1,1)	1,1 (-)
Violação involuntária de protocolo	1 (1,1)	1,1 (-)
Perda de seguimento	4 (4,6)	4,6 (-)
Readoecimento	1 (1,1)	1,1 (-)

Análise de Efeito secundária de eficácia:

As falhas clínicas ou parasitológicas precoces, caracterizadas como a presença

de sintomas e exames parasitológico positivos, respectivamente, no dia 3 (72h pós tratamento), são apresentadas nas

Tabela 4-8 e Tabela 4-9 em número absoluto de pacientes, percentagens e intervalos de confiança de 95%.

Tabela 4-8 - Número absoluto e proporção de cura e de falha terapêutica na população por Protocolo (PP) em D3.

População por Protocolo	D3 (n=84)		
	n	%	(IC 95%)
Resposta clínica e parasitológica adequada	84	100,0	(-)
Falha de tratamento	0	0	(-)

Tabela 4-9 - Número absoluto e proporção de cura e de causas de falha terapêutica na população por Intenção de Tratar (IT) em D3.

População por Intenção de Tratar	D3 (n=88)	
	n	% (IC 95%)
Resposta clínica e parasitológica adequada	84	95,5 (88,8-98,7)
Falhas	4	4,5 (1,2-11,2)
Causas		
Erro de inclusão	1	1,1 (-)
Violação involuntária de protocolo	1	1,1 (-)
Perda de seguimento	2	2,3 (-)

A taxa de sucesso terapêutico cumulativa até dia 28 (ou a probabilidade de permanecer sem parasitos no dia 28) foi definida usando o método de análise de sobrevivência Kaplan-Meier apresentado na Tabela 4-10 e Figura 4-2.

Tabela 4-10 - A taxa de sucesso terapêutico cumulativa até dia 28 (análise de sobrevivência Kaplan-Meier)

População	D28 (n=82)	
	n	% (IC 95%)
Incidência cumulativa de sucesso em D28	81	98,8 (91,7-99,8)
Incidência cumulativa de falha em D28	1	1,2 (0,2- 8,3)

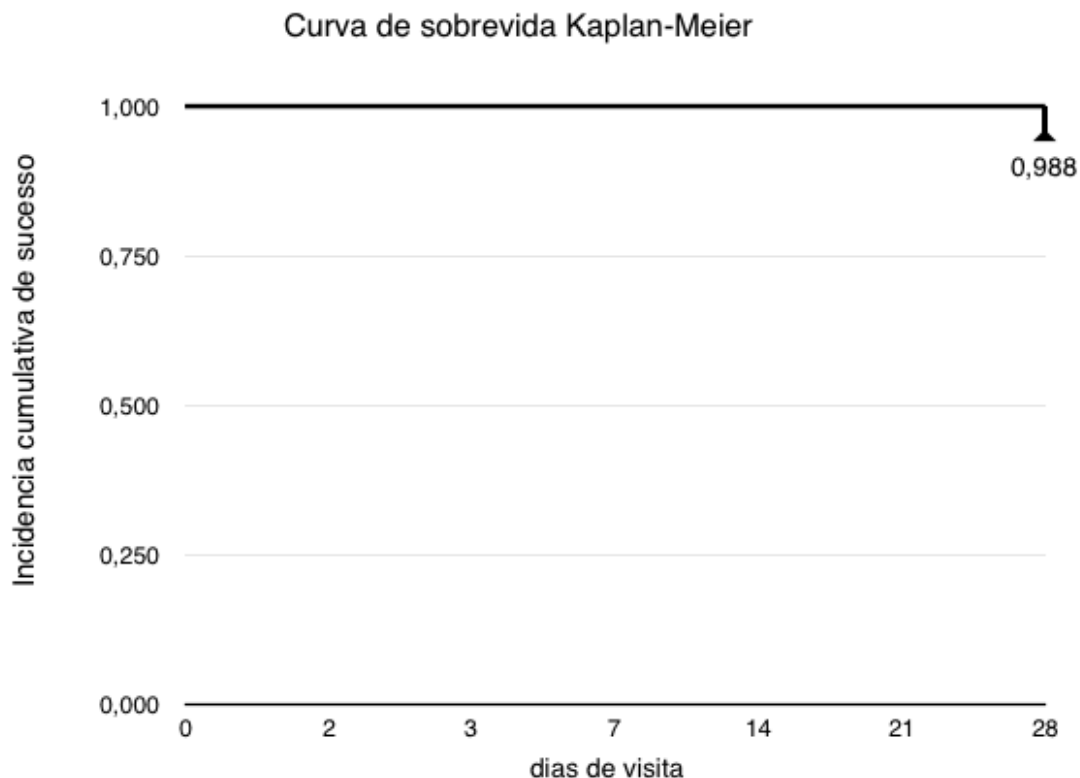


Figura 4-2 – Gráfico da Curva de sobrevida Kaplan-Meier para os dados avaliados por protocolo (n=82).

A apresentação dos principais sinais e sintomas durante as avaliações dos pacientes entre o dia 0 e dia 28 de acompanhamento pode ser observada na Figura 4-3.

Importante redução dos sintomas relacionados à malária aguda é alcançada nas primeiras 72 horas. A febre, marcador importante de cura clínica da malária, inicialmente presente em 87 (98,9%) dos participantes, é encontrada em apenas 4 (4,5%) dos participantes em D3, e em apenas um paciente após esta data. A febre após o início do tratamento medicamentoso não é acompanhada de sudorese ou calafrio o que denota temperaturas mais baixas.

A dor abdominal e náuseas, sintomas bastante frequentes no D0, também apresentam no D3 uma importante redução (92,4 e 68,7% respectivamente), mas estes sintomas se mantêm por um período maior. Estes são sintomas da doença, porém também são descritos como eventos adversos relacionados ao medicamento antimaláricos. Zumbido (tinnitus), sintoma que somente foi relatado após o início do tratamento, ou prurido, que apresentou um aumento da frequência, também são descritos como eventos adversos relacionados ao medicamento e a temporalidade corrobora com a relação com os medicamentos antimaláricos.

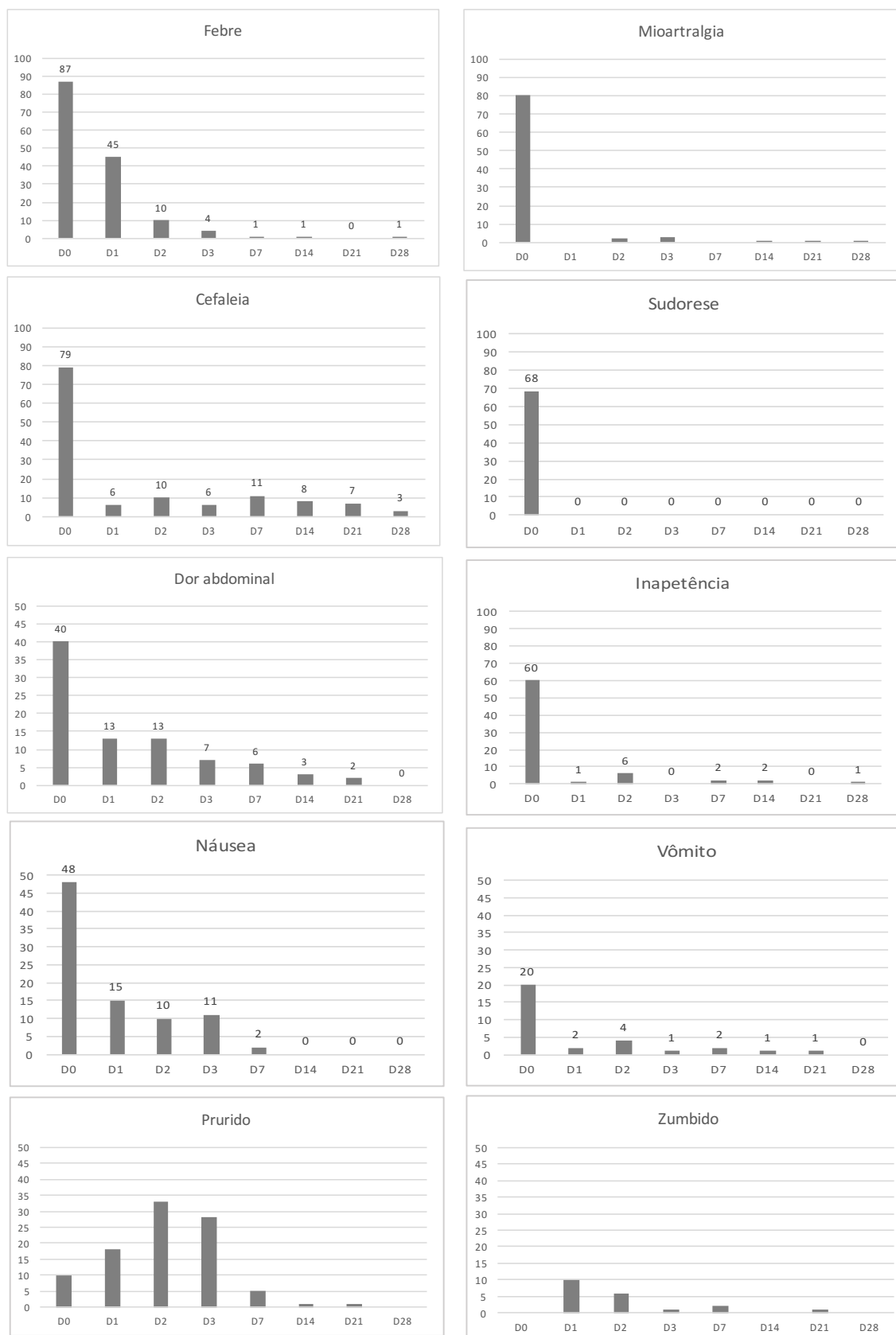


Figura 4-3 – Apresentação da frequência dos principais sinais e sintomas relatados pelos pacientes por dia de visita.

4.4.2 QUESTÕES ANALÍTICAS E ESTATÍSTICAS

A dosagem da cloroquina no sangue, conforme protocolo, foram realizadas nos dias 0, 3, 7, 14, 21 e 28. A perda de algumas visitas ou pacientes retirados impossibilitou a dosagem de todos os 88 pacientes após D0.

A Figura 4-4 apresenta a curva das concentrações médias nos tempos de avaliação dos pacientes do estudo.

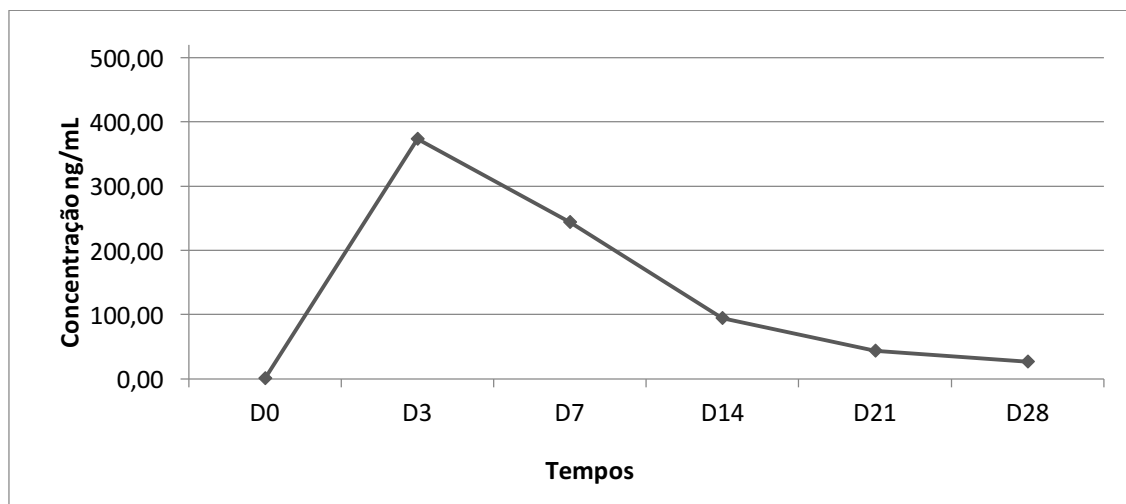


Figura 4-4 - Curva das médias da concentração da cloroquina nos dias de avaliação D0-D28 dos pacientes.

Os parâmetros farmacocinéticos da amostra (n=86) são apresentados na Tabela 4-11 com desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), média, valores mínimo e máximo de toda amostra.

Tabela 4-11 - Parâmetros farmacocinéticos da amostra (n=86)

	C_{max} ng/mL	T_{max} dias	AUC_{0-t} dias * ng/mL	AUC_{0-inf} dias * ng/mL	Vd mg/ (ng/mL)	Cl mg/(dias*ng/mL)
média	374,66	27,51	3700,43	3949,30	0,49	0,04
DP	129,57	2,09	1394,43	1431,95	0,34	0,02
CV	0,35	0,08	0,38	0,36	0,69	0,50
mínimo	122,10	14,0	690,60	826,84	0,16	0,02
máximo	733,52	28,0	8045,24	9331,73	2,74	0,18

4.5 AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA

4.5.1 EVENTOS ADVERSOS

Através de uma lista na ficha padrão do documento fonte, os eventos adversos mais frequentes descritos na literatura eram investigados de forma ativa e direcionada na

anamnese. Esta investigação era iniciada apenas após uma pergunta não direcionada. Os dados foram coletados a cada visita prevista no cronograma de avaliação e nas visitas espontâneas. Adicionalmente foram registrados eventos adversos não esperados. As datas de início e fim de cada evento foram registradas com a maior precisão possível dentro dos limites inerentes a recuperação de dados através de anamnese. Os eventos adversos foram classificados de acordo com sua gravidade utilizando-se a escala de avaliação do *NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events*.

4.5.2 APRESENTAÇÃO DOS EVENTOS ADVERSOS

As doenças referidas na história patológica progressiva ao momento da inclusão do estudo não foram registradas como eventos adversos, assim como sua manifestação ao longo do estudo. Exacerbações (aumento da frequência ou gravidade) destas mesmas doenças foram registrados com EA.

Exacerbações de sintomas da malária que não denotam piora clínica e são descritos como eventos adversos às drogas, como prurido, também foram registradas como eventos adversos.

Não houve mortes registradas durante este estudo. Também não houve eventos sérios que resultassem em malformação, risco de morte, deficiência ou incapacidade persistente.

Um total de 380 eventos adversos foram registrados durante o período do estudo e 74 (84%) pacientes apresentaram eventos adversos classificados como possíveis ou prováveis, sendo que 63 pacientes e 44 pacientes manifestaram EA grau I, classificados como possível e provável, respectivamente, como apresentado na **Tabela 4-12**.

Tabela 4-12 - Número de pacientes (%) por número de eventos, classificados por grau e causalidade.

Gravidade	Causalidade n (%) do na amostral = 88			
	Não relacionado	Improvável	Possível	Provável
Grau I	27 (30,7)	1 (1,1)	63 (71,6)	44 (50)
Grau II	20 (22,7)	1 (1,1)	21 (23,9)	8 (9,1)
Grau III	1 (1,1)	0	0	0

A Tabela 4-13 apresenta os números totais e percentagens de eventos adversos segundo seu grau e relação de causalidade.

Do mesmo total de 380 eventos adversos registrados durante o período do estudo, 304 (80%) dos eventos foram descritos pelo investigador principal como grau I, 75 (19,7%) como grau II, 1 (0,3%) como grau III. Nenhum paciente apresentou EA com grau IV de gravidade.

Tabela 4-13 - Número de eventos adversos por grau e relação de causalidade

Grau	Causalidade n total 380 (%)									
	Não relacionado		Improvável		Possível		Provável		Total	
1	56	(14,7)	1	(0,3)	186	(48,9)	61	(16,1)	304	(80,0)
2	25	(6,6)	1	(0,3)	28	(7,4)	21	(5,5)	75	(19,7)
3	1	(0,3)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	1	(0,3)
Total	82	(21,6)	2	(0,5)	214	(56,3)	82	(21,6)	380	(100,0)

Dentre todos os 214 (56,3%) eventos classificados como possivelmente relacionados 186 (48,9%) como grau I, 28 (7,4%) como grau II, e nenhum como grau III ou grau IV.

Entre os 380 EA observados, 55 (14,5%) eventos necessitaram de tratamento sintomático ou específico. A maior frequência de uso medicamento para da EA ocorreu nos 3 primeiros dias do estudo, demonstrado na Figura 4-5. Entretanto, 10 dos EA com uso de medicamento relatados em D2 surgiram no participante ID31, diagnosticado, neste dia, com malária falciparum. Chás e suplementos vitamínicos não foram avaliados como medicamento específico.

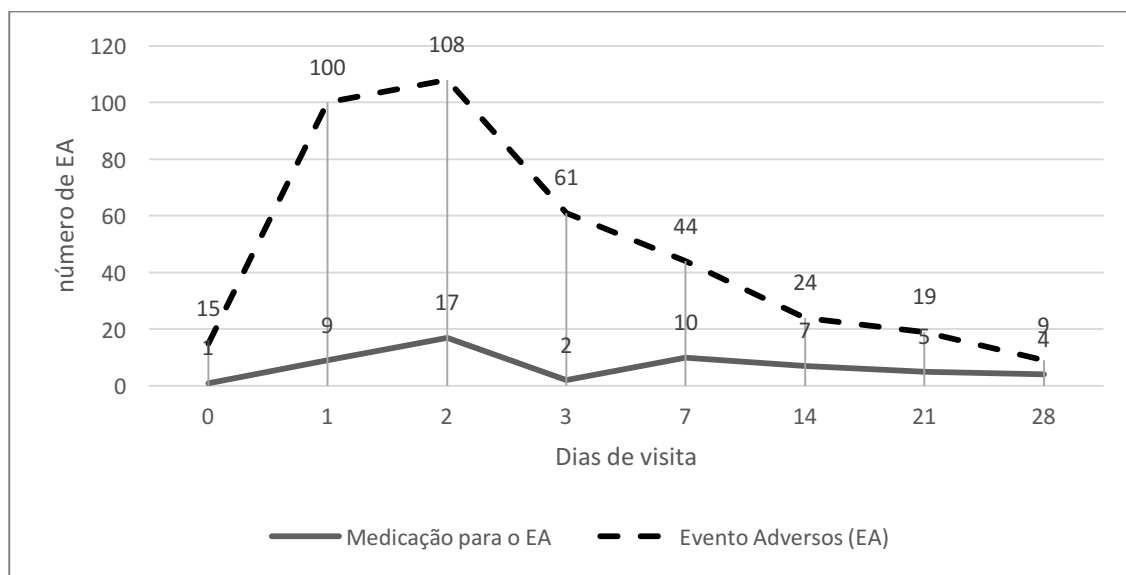


Figura 4-5 - Distribuição do número de EA total e EA com uso de medicamento específico por dia de visita.

Os eventos adversos prurido, cefaleia, dor abdominal, desordem do sono, náusea, diarreia, fraqueza, zumbido e tosse tiveram frequência > 15% da população do estudo, enquanto os eventos inapetência, vômito, erupções cutâneas, dores musculares, mudança comportamental e tontura > 5% da população do estudo, **Tabela 4-12**. O único EA com grau III, paciente ID83, finalizou estudo com RCPA. A tosse foi posteriormente diagnosticada como infecção das vias aéreas superiores, viral, com recuperação total e sem necessidade de internação. A incidência de EA é maior nos três primeiros dias que corresponde ao período do uso combinado de cloroquina e primaquina, com 223 (58,7%) EA, seguindo pelo período, D3-D7, de primaquina em monoterapia, com 103 (27,1%) EA e restando 54 (14,2%) EA, quando nenhum medicamento foi ingerido. A mesma avaliação foi realizada para cada um dos EA mais incidente do estudo (Tabela 4-15), com cálculo da razão entre número de EA (nEA) e número de pacientes (NP) que manteve-se próximo de 1, significando que os EA não incidiram mais de uma vez na maioria dos participantes.

Tabela 4-14 - Número (%) de pacientes (n=88) com eventos adversos com frequência acima de 5%, por gravidade e causalidade.

Eventos Adversos	Total (n=88) n (%)	Grau - n (%)			Causalidade - n (%)			
		I	II	III	Imporvável	Não relacionado	Possível	Provável
Prurido	50 (56,8)	43 (48,9)	7 (8,0)	0	0	1 (1,1)	7 (8,0)	45 (51,1)
Cefaléia	34 (38,6)	22 (25,0)	19 (21,6)	0	2 (2,3)	17 (19,3)	18 (20,5)	3 (3,4)
Dor abdominal	31 (35,2)	29 (33,0)	3 (3,4)	0	0	6 (6,8)	27 (30,7)	1 (1,1)
Desordem do sono	28 (31,8)	26 (29,5)	3 (3,4)	0	0	3 (3,4)	23 (26,1)	2 (2,3)
Náusea	25 (28,4)	24 (27,3)	2 (2,3)	0	0	0	24 (27,3)	1 (1,1)
Diarréia	18 (20,5)	17 (19,3)	1 (1,1)	0	0	2 (2,3)	14 (15,9)	2 (2,3)
Zumbido	17 (19,3)	1 (1,1)	16 (18,2)	0	0	0	15 (17,0)	2 (2,3)
Fraqueza	16 (18,2)	13 (14,8)	3 (3,4)	0	0	5 (5,7)	10 (11,4)	1 (1,1)
Tosse	15 (17,0)	14 (15,9)	0	1 (1,1)	0	2 (2,3)	7 (8,0)	6 (6,8)
Inapetência	12 (13,6)	9 (10,2)	3 (3,4)	0	0	4 (4,5)	6 (6,8)	2 (2,3)
Vômito	12 (13,6)	10 (11,4)	2 (2,3)	0	0	1 (1,1)	9 (10,2)	2 (2,3)
Erupções cutâneas	10 (11,4)	9 (10,2)	1 (1,1)	0	0	1 (1,1)	2 (2,3)	7 (8,0)
Dores musculares	8 (9,1)	6 (6,8)	3 (3,4)	0	0	6 (6,8)	5 (5,7)	1 (1,1)
Mudança comportamental	8 (9,1)	8 (9,1)	0	0	0	2 (2,3)	6 (6,8)	0
Tontura	8 (9,1)	8 (9,1)	0	0	0	2 (2,3)	6 (6,8)	0

Tabela 4-15 - **Distribuição** de número de pacientes com EA mais incidentes por dia de ocorrência.

Nome do EA	NP	nEA	nEA/NP	D0		D1		D2		D3		D7		D14		D21		D28	
				n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
*nEA = 322/380 (84,7%)																			
Prurido	50	53	1,1	0	0	17	19,3	21	23,9	11	13,4	2	2,4	1	1,2	1	1,2	0	0,0
Cefaléia	34	45	1,3	1	1,1	7	8,0	7	8,0	4	4,9	10	12,2	7	8,5	6	7,3	3	3,7
Dor abdominal	31	36	1,2	0	0,0	13	14,8	10	11,4	4	4,9	6	7,3	1	1,2	2	2,4	0	0,0
Desordem do sono	28	32	1,1	3	3,4	13	14,8	9	10,2	3	3,7	1	1,2	2	2,4	1	1,2	0	0,0
Náusea	25	29	1,2	2	2,3	13	14,8	9	10,2	4	4,9	1	1,2	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Diarréia	18	18	1,0	3	3,4	4	4,5	5	5,7	4	4,9	2	2,4	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Zumbido	17	17	1,0	1	1,1	9	10,2	4	4,5	1	1,2	1	1,2	0	0,0	1	1,2	0	0,0
Fraqueza	16	18	1,1	1	1,1	3	3,4	5	5,7	5	6,1	0	0,0	2	2,4	1	1,2	1	1,2
Tosse	15	15	1,0	0	0,0	4	4,5	6	6,8	3	3,7	0	0,0	2	2,4	0	0,0	0	0,0
Inapetência	12	12	1,0	1	1,1	0	0,0	5	5,7	4	4,9	0	0,0	1	1,2	0	0,0	1	1,2
Vômito	12	12	1,0	1	1,1	1	1,1	5	5,7	2	2,4	1	1,2	1	1,2	1	1,2	0	0,0
Erupções cutâneas	10	10	1,0	0	0,0	2	2,3	1	1,1	2	2,4	4	4,9	0	0,0	0	0,0	1	1,2
Dores musculares	8	9	1,1	0	0,0	1	1,1	2	2,3	2	2,4	2	2,4	0	0,0	1	1,2	1	1,2
Mudança comportamental	8	8	1,0	0	0,0	4	4,5	1	1,1	0	0,0	1	1,2	1	1,2	1	1,2	0	0,0
Tontura	8	8	1,0	0	0,0	0	0,0	5	5,7	1	1,2	1	1,2	1	1,2	0	0,0	0	0,0
				n (D0-D2)=88						n (D3-D28)=82									
Fármacos em uso:				Cloroquina + Primaquina						Primaquina		Nenhuma							
nEA (%) para n=322				199 (61,8%)						82 (25,5%)		41 (12,7)							

NP: número de pacientes; nEA: número de eventos adversos; nEA/NP: razão de eventos adversos e número de pacientes; *nEA: número de eventos adversos nesta tabela/total de EA no estudo (%).

Para melhor avaliação dos resultados do EA mais prevalente entre os participantes, o prurido, os dados por paciente e dia de apresentação do EA são apresentados na

Tabela 4-16. Observou-se que 48 (96%) participantes apresentaram o EA - prurido uma única vez durante todo o período de acompanhamento, apenas 7 (7,9%) participantes fizeram uso de anti-histamínico por até 3 dias e 49 (92,4%) dos eventos ocorreram até D3.

Tabela 4-16 - Participantes com EA - prurido por dia de visita.

Participante (ID)	Número de pacientes com EA por dia de visita						Total EA por participante	
	Dia (n)	D1(88)	D2(88)	D3(82)	D7(82)	D14(82)		D21(82)
1		1*						1
5			1					1
7			1					1
8			1					1
11		1						1
13			1					1
14			1					1
15		1						1
17			1					1
19				1				1
20				1				1
22		1						1
24			1					1
25		1						1
26			1		1			2
27			1					1
28			1					1
35					1			1
37		1						1
38		1						1
41			1					1
44		1						1
45			1					1
46				1				1
48			1*					1
49		1		1				2
51				1				1
54		1*						1
55				1				1
56							1	1
57		1*						1
59			1					1
60				1				1
61			1					1
64			1					1
65		1*						1
68		1						1
69			1					1
71				1				1
72						1		1
73		1		1				2
74			1					1
77			1					1
78				1				1
80			1					1
82		1						1
83		1*						1
85				1				1
87			1*					1
88		1						1
Total – n (%)		17(19,3)	21(23,9)	11(13,4)	2(2,4)	1(1,2)	1(1,2)	53

EA: Evento adverso. Não houve EA prurido em D28. Não foram incluídos os 10 casos de D0. *: dias e pacientes que utilizaram anti-histamínicos.

As médias do hematócrito e hemoglobina dos pacientes nos dias 0, 14 e 28 são apresentadas na Tabela 4-17.

Tabela 4-17 - Médias do hematócrito e hemoglobina dos pacientes nos dias 0, 14 e 28

Exames Laboratoriais	D0 (n=87)		D14 (n=82)		D28 (n=81)	
	média	intervalo (DP)	média	intervalo (DP)	média	intervalo (DP)
Hemoglobina	13,5	8,6-16,8 (1,5)	13,0	9,6-16,3 (1,3)	13,9	11,4-16,5 (1,1)
Hematócrito	40,9	27,8-51,5 (4,8)	39,7	32,0-48,6 (3,7)	42,1	35,8-51,5 (3,3)

As alteração na mediana do hematócrito e hemoglobina dos pacientes em relação a linha de base são apresentadas nas **Erro! Fonte de referência não encontrada. Erro! Fonte de referência não encontrada.** respectivamente.

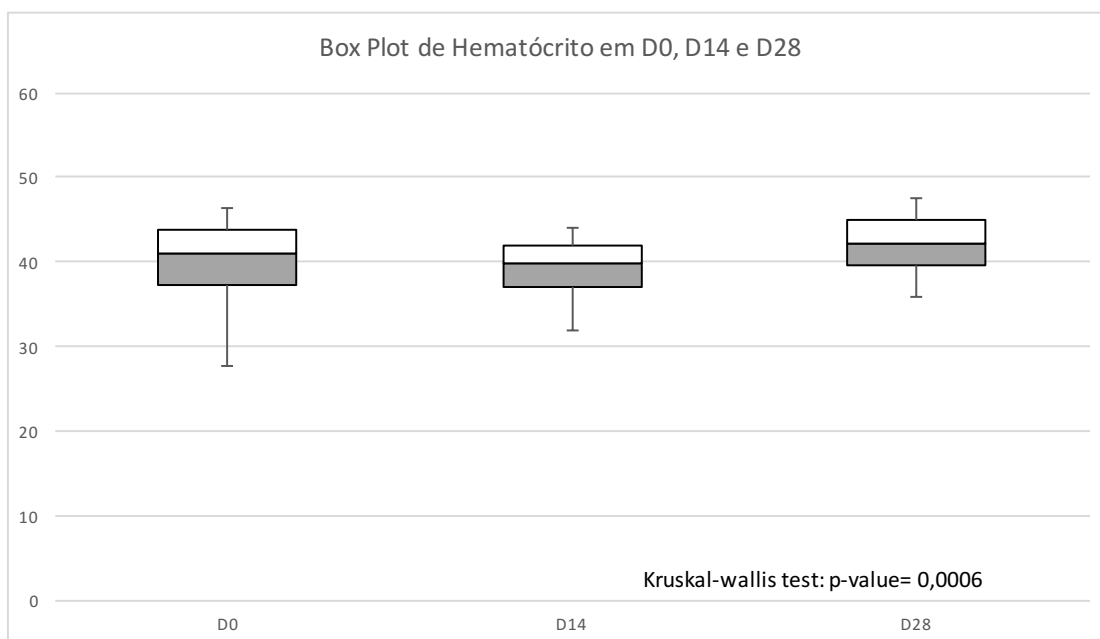


Figura 4-6 - Mediana do hematócrito dos pacientes avaliada em D0, D14 e D28.

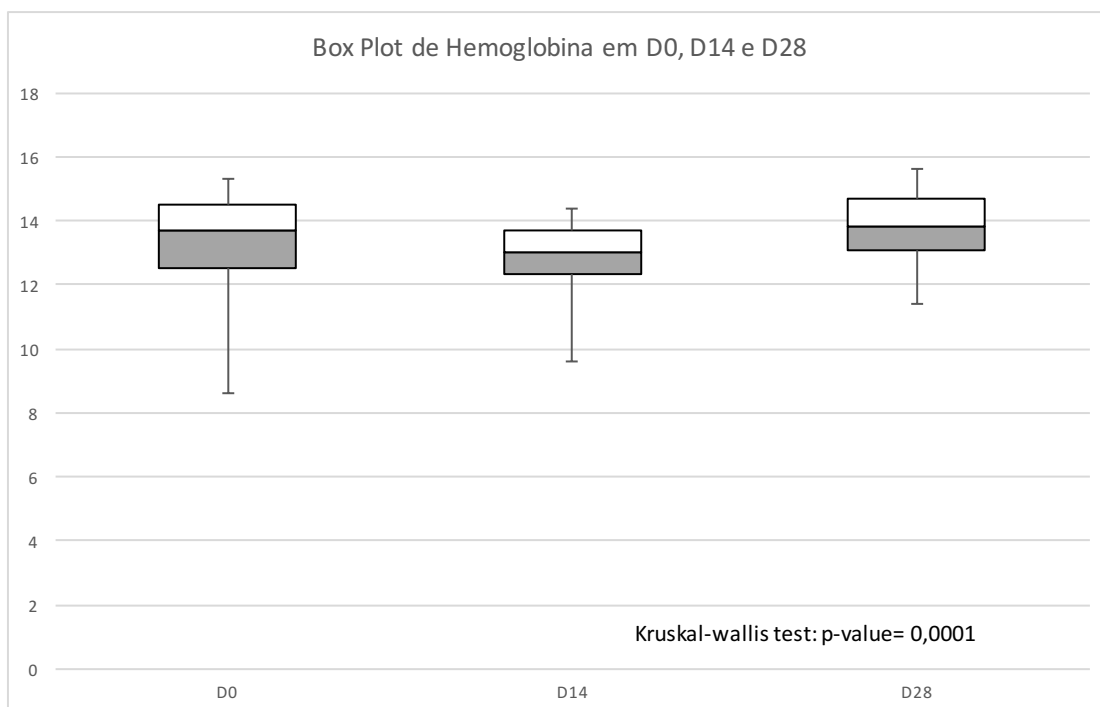


Figura 4-7 - Mediana da hemoglobina dos pacientes em avaliada em D0, D14 e D28.

A avaliação da variação da mediana do hematócrito e da hemoglobina dos pacientes em relação a medida em D0, apresenta significância estatística, mas não representa um alteração clínica significativa.

A variação da parasitemia durante durante o período de acompanhamento dos pacientes nos dias de visita, Tabela 4-18, revela que todos os pacientes estavam negativos em D3.

Tabela 4-18 - Parasitemia dos participantes entre D0 e D28

	Dia de avaliação / Parasitemia por mm ³						
	D0	D2	D3	D7	D14	D21	D28
Média	3.245,3	98,9	0	0	0	0	-
DP"	2.566,9	83,8	0	0	0	0	-
Min	282	18	0	0	0	0	48*
Max	12.000	240	0	0	0	0	48*
Falha	450	0	0	0	0	0	48

"DP: desvio padrão; *única falha.

4.5.3 ANÁLISE DOS EVENTOS ADVERSOS

A análise de efeito de segurança prevista foi realizada e não houve pacientes com EA graves ou pacientes com EA que levassem a suspensão do tratamento.

A descrição das frequências de eventos adversos e estratificação entre pacientes com EA relacionados a droga (causalidade descrita como possível, provável) assim como a estratificação por gravidade (grau) é descrita na tabela 19. Setenta e quatro pacientes (72,7%) apresentaram EA descritos como possivelmente relacionados, 49 (55,7%) como provavelmente relacionados ao medicamento do estudo. Um total de 74 (84%) pacientes apresentaram eventos adversos classificados como possíveis ou prováveis relacionados ao medicamento do estudo.

Do mesmo total de 380 eventos adversos registrados durante o período do estudo, 304 (80%) eventos foram descritos pelo investigador principal como grau I, 75 (19,7%) como grau II, 1 (0,3%) como grau III. Nenhum paciente apresentou EA com grau IV de gravidade.

Dentre todos os 214 (56,3%) eventos classificados como possivelmente relacionados 186 (48,9%) como grau I, 28 (7,4%) como grau II, e nenhum como grau III ou grau IV

Dentre todos eventos 82 (21,6%) que foram classificados como provavelmente relacionados, destes 61 (74,4%) como grau I, 21 (25,6%) como grau II, e nenhum como grau III ou grau IV.

Dos duzentos e noventa e seis eventos possivelmente ou provavelmente relacionados ao medicamento 247 (83,4%) foram classificados como eventos de grau I e não necessitaram intervenção terapêutica para seu tratamento.

Alteração na média do hematócrito/hemoglobina dos pacientes em relação aos valores iniciais, apesar de demonstrar aumento, não foi clinicamente significativa.

5 DISCUSSÃO

O tratamento efetivo é um dos pilares do plano de controle da malária (27). Efetividade se refere a capacidade do tratamento em produzir resposta adequada, nesse caso, cura, em condições reais. Diferentemente, a eficácia implica que as variáveis e condições do estudo sejam controladas para que os resultados não sejam afetados pela variação da qualidade do medicamento, adesão, ou por particularidades individuais de farmacodinâmica e farmacocinética (17). De forma que, um medicamento com eficácia adequada não é certeza de boa efetividade.

A cloroquina combinada à primaquina tem sido utilizada no Brasil para controle da malária vivax há 60 anos (53,60), contudo, inexistem estudos sobre o custo-efetividade na Amazônia brasileira. A maior parte dos estudos, são avaliações de resistência e eficácia da monoterapia com cloroquina, com poucas exceções (60,90,91). Embora tenha um desenho menos controlado, os estudos de efetividade requerem um número grande de participante e, usualmente, por longos períodos de acompanhamento, o que demanda altos custos. Este déficit de conhecimento sobre os fatores que influenciam a efetividade dos esquemas terapêuticos antimaláricos, que vão além da eficácia, pode retardar implementos inovadores em formulações farmacológicas que não só protegem nosso arsenal terapêutico atual, mas também amplia os resultados dos tratamentos atualmente propostos.

Esse estudo, além de avaliar uma nova apresentação terapêutica para a malária vivax, traz uma informação atualizada sobre a eficácia e segurança do tratamento conjunto, cloroquina e primaquina (esquema curto, 7 dias), preconizado pelo Ministério da Saúde como tratamento para malária vivax no Brasil. Esse desenho se encontra dentro do escopo do protocolo de avaliação de eficácia e segurança de drogas antimaláricas recomendado pela OMS (85).

Por critério de protocolo, diferenças entre a população do estudo e os pacientes atendidos no CEPEM no mesmo período, nas variáveis local de residência, tempo para diagnóstico da malária e frequência de comorbidades. Estas divergências não comprometem o objetivo do estudo, porém são importantes ao se avaliar a generalização dos resultados. Os dados do SIVEP-malária sobre os pacientes do estudo revelam que as proporções de sexo e idade são semelhantes aos descritos nesta tese. O cronograma de visitas levou à exclusão de participantes residentes em região rural distante do centro de pesquisa. Estes adquirem a malária no domicílio ou no peridomicílio, enquanto os pacientes deste estudo

são, na maior parte, moradores da cidade de Porto Velho, que adquiriram malária durante atividade de lazer ou laboral fora da área urbana. Esta característica pode ter minimizado o risco de reinfecção, pois os locais prováveis de infecção podem ter sido evitados pelos participantes. Muito embora, cerca de 86,4% dos participantes relataram pelo menos uma malária anterior, reforçando o argumento comportamental de exposição.

Ainda, segundo os mesmos dados do SIVEP-malária, cerca de 50% dos pacientes do Cepem têm diagnóstico antes de 48 horas do início dos sintomas. Nesse projeto, apenas 32 (26,3%) participantes tiveram diagnóstico anteriormente a 48 horas de sintomas. Esta diferença é explicada pelo critério de inclusão, que estabelecia uma parasitemia superior a 250 parasitas/ μ L, logo, pela fisiopatologia da malária vivax, pela qual o aumento da parasitemia ocorre mais tardiamente. Os merozoítos de *Plasmodium vivax* tem certa predileção por reticulócitos que são células jovens e representam apenas 0,5 a 1,8% dos eritrócitos circulantes. Inicialmente, durante a infecção, a parasitemia se mantém baixa, limitada por poucos reticulócitos. Entretanto, a destruição de eritrócitos infectados e não infectados pelo sistema imune, causa anemia leve, o que provoca a estimulação da produção de reticulócitos pela medula óssea, incrementando o número destas células jovens após o 3º dia, com a produção aumentando até o 10º. dia (92). De forma que, pacientes com tempo de evolução de doença maior, devido a estimulação da produção de reticulócitos, têm parasitemia mais altas, como requerido por critério de inclusão (93).

Como relatado, a prevalência de comorbidades é menor no grupo do estudo. Mesmo permitida a inclusão de pacientes com comorbidades controladas, a malária, em pacientes com comorbidades, tende a ser mais grave, o que os excluiu do estudo durante a triagem (37,39,94,95).

Os sintomas clássicos da malária como, febre, cefaleia, calafrio, mialgia e sudorese, que tipificam o paroxismo (96,97), estão presente entre 76 a 99% dos casos antes do início do tratamento, bem como inapetência, náusea, dor retro-ocular, tontura e dor abdominal, todas visíveis em mais de 45% dos pacientes. A presença de sintomas que acompanham o paroxismo malárico é resultado de uma tempestade de citocinas e quimiocinas (98,99), também comum em vários processos infecciosos febris. Uma vez iniciado o tratamento adequado, a depender da capacidade de retirada de parasitas da corrente sanguínea da droga escolhida, esses sintomas desaparecem dentro de 1 a 3 dias,

juntamente com os marcadores de resposta imune com citocinas pro-inflamatórias de fase aguda (100).

Neste estudo, um paciente apresentou recorrência da malária vivax na visita do dia 28, diagnosticado com parasitemia positiva e sintomas (febre e cefaleia), e dois outros pacientes apresentaram febre nos dias 7 e 14, porém com lâmina negativa, diagnosticado com outro processo febril específico, não malárico. A relação entre o número de parasitas em circulação e os sintomas da malária, principalmente, a febre, é conhecida desde os tempos de Ronald Ross, o qual estabeleceu que um mínimo de 200 a 500 parasitas por μL no sangue de *P. vivax* e uma parasitemia maior, entre 600 a 1500, para o *P. falciparum*, seriam necessários para sobrevir o sintoma (101). Essa tolerância clínica está ligada a resposta imune do hospedeiro e a idade do paciente, que tem um componente altamente impactante, pela qual crianças necessitam de parasitemias mais altas para o desenvolvimento de febre, enquanto adultos, apesar de apresentarem febre mais frequentemente em primo infecções de malária, evoluem com quadro clínico mais brando que as crianças. Os pacientes com parasitemia abaixo do limiar de desencadeamento de sintomas, os assintomáticos, são possíveis fontes de manutenção da transmissão da malária e, por isso, o acompanhamento do tratamento de um paciente deve ser seguido de exames de verificação de cura (LVC), mesmo entre aqueles que não apresentam sintomas (53). Casos febris devem ser investigados por métodos de diagnóstico parasitológico (imunoenzimáticos, microscópicos, ou moleculares), quando possíveis, para diagnóstico diferencial. O diagnóstico clínico exclusivo não é mais recomendando (27), não sendo adotado no Brasil, mas ainda é realizado, principalmente, em países africanos, por completa falta de outro recurso. Contudo, nos últimos anos, com o desenvolvimento de testes rápidos para malária a baixo custo, tem-se feito grande esforço na direção de ampliar o diagnóstico parasitológico dos processos febris em todo o mundo.

A febre é um processo comum produzido por patógenos comuns em regiões tropicais e a não definição, laboratorial ou clínica, pode atrasar o diagnóstico e ainda complicar o quadro clínico (39). Quer em caráter epidêmico ou endêmico, no Brasil e, particularmente, na região amazônica, pode ser encontrada uma gama desses patógenos, como, os arbovírus (Dengue, Febre Amarela, Mayaro, Oropouche, Chikungunya, Zika) (102-105), o Hantavírus (106), além de infecções gastrointestinais por helmintos, protozoários, fungos, bactérias e vírus (107-109). Sobretudo, em locais onde o número de

casos de malária tem reduzido rapidamente, a população e os serviços de saúde não associam a malária como uma das primeiras hipóteses diagnósticas. O que pode resultar em atraso de diagnósticos e casos mais graves, dificultando a identificação e o controle de surtos de malária (110).

Importante redução dos sintomas relacionados à malária aguda é alcançada nas primeiras 72 horas. A febre, marcador importante de cura clínica da malária, inicialmente presente em 87 (98,9%) dos participantes, é encontrada em apenas 4 (4,5%) dos participantes em D3, e em apenas um paciente após esta data. A febre após o início do tratamento medicamentoso não é acompanhada de sudorese ou calafrio o que denota temperaturas mais baixas e resolução dos processos da tempestade de citocinas (97). A ação antimalárica da cloroquina está ligada ao seu acúmulo dentro do vacúolo digestivo do plasmódio, impedindo a formação da hemozoína (56), que é, sabidamente, um dos mais importantes estimulador de formação de citocinas pró-inflamatórias e pirogênicas na malária (101). Logo, apesar da destruição de hemácias, com a liberação de antígenos maláricos e do eritrócito apoptótico que perduram por cerca de 72h, após o uso da cloroquina, a redução do conteúdo de hemozoína se sobrepõem na orquestração da resposta do sistema imune na indução do paroxismo malárico. Acima de tudo, a supressão da febre é marcador importante da redução da massa parasitária circulante e da eficácia deste tratamento (111).

Pelas interações de fisiopatologia da doença e do tratamento, diferenciar entre a manifestação clínica da malária e os EA do esquema terapêutico utilizado nos primeiros 3 dias de tratamento do *P. vivax*, não é uma ciência exata. Este estudo se utilizou de metodologia bastante sensível ao definir e classificar os EA, o que resultou em um número incomumente elevado em comparação com os resultados históricos descritos para a cloroquina. Deixando muito a que se comentar nesta discussão. Infelizmente poucos estudos apresentam detalhes metodológicos e resultados sobre a avaliação de EA (112).

Um total de 74 (84,0%) pacientes apresentaram 296 EA classificados por causalidade, como relação, possível ou provável, com o esquema de fármacos do estudo. Entre estes, 247 (83,4%) foram classificados como EA de grau I (leve). Estes resultados não se assemelham aos obtidos em estudos de segurança com cloroquina convencional em monoterapia ou em combinações, que relatam incidência de EA entre 5-20% (111-114). Algumas razões metodológicas podem ser listadas para explicar estas diferenças. Em primeiro lugar, este estudo utilizou quatro formas de classificar os EA, quais sejam, *não relacionados*,

improváveis, possíveis e prováveis. Uma classificação mais atual inclui ainda uma 5ª categoria, definida como EA *relacionados*. Neste estudo, esta categoria se funde aos EA classificados como prováveis, os quais também apresentam valores de incidência discretos, analisados separadamente. Em segundo lugar, apesar de não deixarem explícito, os estudos de segurança e eficácia, tem focado na identificação de resistência medicamentosa e descrevem apenas os EA classificados na categoria *relacionados*. Que são aqueles classicamente já descritos na literatura e farmacopeia específica. Os dados deste estudo foram coletados por equipe treinada, com procedimentos operacionais para padronizar os resultados, focados, principalmente, em EA e relatos de segurança, uma vez que estes dados se tornarão um relatório para registro do fármaco na ANVISA. Em último lugar, o relato de prurido por mais de 50% dos participantes, representando um ponto fora da curva na incidência de EA nesta população de estudo. Excluindo-se o EA-prurido da análise, são 18 pacientes com EA classificados como prováveis, ou seja, cerca de 20,4%. Resultado dentro do intervalo de EA relatados para esquemas terapêuticos com a cloroquina. Entretanto, embora sejam contados de forma inclusiva, elevando-se os números de EA, para fins de segurança, é salutar que quase 97,7% deles são EA de grau I e II, e não comprometeram as atividades do cotidiano dos participantes.

Por todo o exposto, a discussão dos resultados de segurança deste estudo evocará comparações limitadas com outros estudos e discorrerá sobre especificidades e extrapolações dos dados encontrados. Detalhamento dos EA por sistema mais frequentes são comentados a seguir.

Diversos estudos demonstram que entre os eventos adversos da cloroquina, os sintomas gastrointestinais são bastante comuns. Entre eles: náusea (1,9-12,3%), vômito (1,7-5,1%), dor epigástrica (1,3-1,7%) e diarreia (0,6-5,8%), usualmente bem tolerados (56,111,113,115,116). Todos estes valores são semelhantes aos descritos neste estudo, dentro da classificação EA provável. Contrastando com a incidência combinada de EA com relação provável e possível. Muito embora os sintomas gastrointestinais, como dor abdominal e náuseas terem sido relacionados por 92,4 e 68,7% participantes, respectivamente, antes do tratamento, em D0, após ingestão dos fármacos, foi bastante discreta, nenhum paciente para dor abdominal e 2 pacientes com náusea. Diferentemente, porém, de sintomas mais estritamente relacionados ao quadro febril da malária, como sudorese, calafrio e mioartralgia, que não mais se apresentaram de forma significativa após D0, os EA gastrointestinais aumentaram a incidência em comparação a D0, tornando a reduzir, em um

primeiro momento, ao fim do período de ingestão combinada de cloroquina e primaquina, e, num segundo momento, de forma cabal, no fim do período do uso da primaquina. Este dados, em relação aos EA gastrointestinais, exemplificam e reforçam a possível relação causal da cloroquina e da primaquina na promoção de EA, não só como monoterapia, mas também, seu efeito sinérgico em combinações (117).

Zumbido (tinnitus), EA classificando entre as otites médias, foi relatado por 19,3% dos pacientes, e não está comumente relacionado ao uso da cloroquina, com incidência descrita de 0,1-0,8% na maioria dos estudos, exceto por tese apresentada com o título, “Estudio de los efectos ototóxicos en 725 pacientes tratados con antimaláricos en el Hospital Central de Maputo (mozambique)”, em 2004, que demonstrou incidência de 44,8% de zumbido em 29 pacientes incluídos (117,118). Tal achado tem sido descrito entre pacientes com patologias reumatológicas, em uso de cloroquina por períodos mais longos (119). Os artigos relatam perda de audição e desequilíbrio por alguns pacientes, com comprometimento cocleovestibular, relacionado a um grau de hipóxia. A maioria dos autores concordam com a possibilidade de reversão do quadro com a interrupção do uso da cloroquina e uso de anti-inflamatórios (119). Futuras pesquisa e detalhamento em nossos dados serão necessários para esclarecer a alta incidência de zumbido neste estudo.

O prurido, um sintoma que apresentou um aumento da frequência, neste estudo, também é descrito como EA relacionado ao medicamento (117). O prurido, particularmente, tem sido relacionado à cloroquina e, apesar de considerado um evento de menor gravidade, produz desconforto suficiente para interferir com a adesão ao tratamento (120). Sua prevalência tem variado bastante entre a população mundial, com cerca de 24-64% na África (117,121,122), 1,9% na Ásia e cerca de 20% em estudo no Brasil (123). Em nosso estudo, o prurido foi relatado por 56,8% dos pacientes após o início do tratamento, com pico de queixas no 3º dia da cloroquina. Um valor mais próximo dos resultados africanos, considerado bastante alto (120). A causa do prurido em uso da cloroquina é multifatorial, com incidência maior na população de cor negra - talvez pela maior afinidade da cloroquina pelo melanócitos, em crianças, com maiores doses de cloroquina, história de prurido em uso de cloroquina previamente, história familiar, estimulação de receptores de liberadores de gastrina no sistema nervoso central e ativação de mastócitos mediado por IgE, além de fatores ainda não esclarecidos (120,124). Populações com historia pregressa de malária acima de 70%, semelhante ao encontrado neste estudo (86,6%), e população de cor negra, relatam prurido em 30% dos pacientes (125). Ressalva-se que boa parte dos estudos

específicos sobre a ocorrência de prurido são revisões de outros estudos ou inquéritos aplicados *à posteriore* a administração da droga, o que pode ter introduzido um viés de memória. Ainda, outros estudos incluíram todos os pacientes com prurido anteriormente ao tratamento, não diferenciando sintomas de eventos adversos. Sendo assim, a comparação dos resultados é dificultada pelas diferenças metodológicas.

A presença de prurido é referida como causa de suspensão do tratamento da malária, com a baixa adesão e fonte de seleção de cepas resistentes (125,126). O uso de medicamento para tratamento dos episódios de prurido mais intenso é abordado por Adebayo *et al.*, que recomendam o uso de prednisona como alternativa a anti-histamínicos, por estes não serem eficazes (127). Como discutido anteriormente, o prurido foi um EA com peso importante na avaliação de segurança, pela sua alta incidência. Contudo, ressalta-se que a duração de cada evento foi de 1-2 dias em média, sem recorrência frequente e apenas 7 dos 88 participantes, 7,9%, necessitaram de medicamento para resolução do EA.

A maior frequência de uso dos antipiréticos/analgésicos, bem como de anti-histamínicos, ocorreu nos três primeiros dias de acompanhamento, por 58 vezes (63,7%) e por 13 vezes (92,9%), respectivamente. O uso de anti-histamínicos pode estar relacionado ao prurido descrito como um evento adverso da cloroquina (128,129), enquanto os antipiréticos e analgésicos à sintomatologia da doença (97). A introdução de chás e vitaminas após o tratamento da malária é um reflexo da tradição em regiões endêmicas de malária. Diferentemente dos relatos africanos, onde o uso de chás e medicina tradicional são uma barreira à adesão ao tratamento medicamentoso (130), no Brasil, ela é complementar e reporta à ideia da necessidade de “cuidar do fígado” após o tratamento da malária, que se baseia na ingestão diária de receitas familiares ou automedicação com polivitamínicos. Salienta-se que alterações hepáticas podem realmente surgir durante e após o episódio de malária, contudo, na maior parte, autolimitadas, não exigindo qualquer ação terapêutica (75,131).

Uma diminuição no nível da hemoglobina é relatado, principalmente ao redor do dia 7 do tratamento, com recuperação até o 21º dia (90). Percebemos uma diferença, com menor média de hemoglobina no D14, comparadas com o baseline e o dia 28, muito embora não tenhamos a medida da hemoglobina em D7 para confirmar o nadir da medida dessa variável. Uma explicação para a anemia progressiva, mesmo após o tratamento da malária vem da continuação da destruição dos eritrócitos não parasitados pelo sistema imune (9,132).

Alterações nas médias do hematócrito e da hemoglobina dos pacientes em relação ao baseline, apesar de estatisticamente significante, não foi clinicamente significante. Fato também encontrado e descrito por Hwang e colaboradores (133), também não encontrando diferença significativa, mesmo ao incluir D7 na análise. Um resultado diferente poderia ocorrer com pacientes com malária mais grave.

No tocante a adesão ao tratamento, dos 82 pacientes avaliados por protocolo, cem por cento tiveram adesão à cloroquina. Devido ao seu sabor amargo, o tratamento com a cloroquina, apesar de ser considerado curto, tem enfrentado falha na adesão quando não supervisionado, principalmente quando os sintomas mais extenuantes, como a febre, a cefaleia e a mialgia cessam, ou quando os eventos adversos mais desconfortáveis, como o prurido e dor abdominal surgem (17,75,128). Este produto apresentou um comprimido de cloroquina com revestimento para mascarar o sabor, e foi considerado por 63,6% dos pacientes como melhora do sabor. No entanto, esta informação foi comprometida pela forma da apresentação da pergunta do questionário e pela obscuridade do significado da resposta, por isso, não foi apresentada nos resultados e será reavaliado de forma adequada em estudos futuros. Três pacientes recusaram-se a continuar o tratamento com primaquina após o 3º dia. Após o 3º dia, o tratamento com primaquina não foi supervisionado, mas sim reportado e avaliado seu uso na visita D7. O abandono do tratamento completo com primaquina não é comum no Brasil, pois o esquema preconizado de dose dobrada/dia, com duração de tratamento reduzindo para a metade do tempo, com média de 7 dias, resulta em melhor adesão do que em outros países com esquema de primaquina longo, 14 dias (18,134). Porém, fatores culturais e o desconhecimento pela população da indicação do uso da primaquina resultam na interrupção precoce do tratamento. Nenhum dos pacientes não aderente a primaquina apresentou falha terapêutica no dia 28. Diversas intervenções podem ser implementadas na embalagem da droga, as quais incluem alterações na apresentação do medicamento, mascaramento do sabor desagradável, maior informação gráfica e de texto para o paciente e, até a ingestão de dose supervisionada, não obstante, a educação científica da população ainda é uma barreira para os avanços na efetividade das drogas (16).

A avaliação farmacocinética deste estudo não tinha como objetivo um estudo de farmacocinética clássica, ou seja, com um número maior de pontos tomada de concentração do fármaco por tempo. Além disso, mesmo que um estudo de farmacocinética clássico para a cloroquina revestida fosse executado, não haveria como comparar com a farmacocinética da cloroquina regular como medicamento antimalárico, pois esta nunca foi realizada para

registro em órgãos reguladores no Brasil ou internacionalmente. Não obstante, esta medida trouxe informação que assegura que a concentração do fármaco avaliado, a cloroquina, alcançou níveis terapêuticos efetivos em todos os participantes. Este parâmetro é um marco fundamental para a garantia da qualidade dos estudos de eficácia e segurança, assegurando, de forma indireta, que as variáveis de adesão ao esquema terapêutico ou as diferenças individuais de farmacocinética e farmacodinâmica não interferiram nos resultados encontrados.

Pelo protocolo da OMS e da ANVISA, a resistência à cloroquina é estabelecida com parasitas circulantes quando a concentração sanguínea da cloroquina e da desetilcloroquina (DEC), seu principal metabólito ativo, encontram-se acima 100ng/mL. Neste estudo, somente a concentração da cloroquina foi avaliada. Níveis terapêuticos da cloroquina foram alcançados e mantidos por 100% dos participantes até o D7. A recorrência de malária pelo *P. vivax* surgiu no dia 28, quando a concentração da cloroquina sanguínea era de 27,4 ng/mL. Dessa forma, não podemos atribuir a falha terapêutica à presença de uma cepa resistente. Deve-se levar em conta que a circulação da DEC corresponde aproximadamente a 20-30% da concentração sanguínea da cloroquina (135), de forma que, a soma das concentrações de ambas, cloroquina e DEC, ainda é bastante inferior aos 100 ng/mL, necessários para tratar.

Embora tomando todas as precauções desde a produção, logística de distribuição e armazenamento das drogas e adesão ao tratamento, não se pode descartar a circulação de cepas resistentes afetando a eficácia, resultando em falhas no tratamento. Estudos recentes apontam que o *Plasmodium vivax* tem apresentado certo grau de resistência à cloroquina. Entretanto, variações no método de avaliação da resistência e dos esquemas terapêuticos dificultam as comparações e o reconhecimento dos dados (60,90,136). Como apresentado na introdução, um artigo de revisão de Price *et al.*, de 2014, sumariza os resultados de publicações entre 1953 e 2011, com métodos bastante distintos, reportam a presença da resistência à cloroquina em diversas regiões do mundo, e por fim, apresentam sugestões para condução de futuros estudos de eficácia e segurança em malária, visando padronizar os métodos e permitir as comparações dos resultados. Desta forma, para avaliar o resultado primário deste estudo, foi realizada uma pesquisa no Pubmed, objetivando encontrar artigos com ensaio clínico com avaliação de eficácia e segurança da cloroquina entre janeiro de 2015 e junho de 2016, acreditando que estes artigos teriam metodologia mais homogênea com este estudo. O resultado, foram 14 artigos que ou seguiam todas as recomendações

propostas de padrão metodológico, ou destacavam claramente nos métodos os pontos de não adequação, Tabela 5-1 (113-115,137-147).

Os resultados destes mais recentes estudos, surpreendentemente, reportam uma eficácia acima de 98% em 10 (71,4%) destes, e apenas 1 artigo com eficácia abaixo de 90%, (89,4%). Este mostrando a presença de resistência em 6 (6,5%) casos, com dosagem da concentração de cloroquina em dose efetiva. No total, 3 sítios em 3 países demonstraram a presença de cepas resistentes, Bolívia, Vietnã e Brasil, com prevalência de 6,5%, 1,3% e 1,1%, respectivamente. Na última linha da Tabela 5-1, os dados deste estudo são comparados com os 14 estudos. Com eficácia de 98,2%, este resultado se assemelha aos dados da maior parte dos centros, sobre tudo com o sítio de pesquisa no Brasil. Houve uma só falha terapêutica tardia em D28, que não foi constatada cepa resistência, como já abordo em parágrafos anteriores.

Tabela 5-1 - Eficácia de esquemas de tratamento com cloroquina - 14 estudos (Jan 2015-Jun 2016)

Autores	Ano de Publicação	País	Uso de primaquina	Duração da Primaquina	Ingestão superv.	Dose da [] Cloroquina	Endpoint	n de pacientes	Eficácia (RCPA)	Recorrência % (n)	Residência (>100 ng/dL)
Añez et al.	2015	Bolívia	não	-	sim	sim	28 dias	96	89,4%	10,6% (10)	6,5% (6)
Rishikesh et al.	2015	Índia	sim	14 dias	não	não	28 dias	122	99,2%	0,8% (1)	-
Getachew et al.	2015	Etiópia	não	-	sim	não	28 dias	254	91,8%	9,8% (25)	-
Ould Ahmedou Salem et al.	2015	Mauritania	não	-	sim	não	28 dias	121	100%	0%	-
Gonzalez-Ceron et al.	2015	México	sim	14 dias	sim	não	28 dias	86	100%	0%	-
Thanh et al.	2015	Vietnã	sim	14 dias	sim	sim	28 dias	240	96,0%	4% (8)	1,3% (3)
Cheoymung et al.	2015	Tailândia	sim	14 dias	sim*	não	28 dias	85	100%	0%	-
Gomes et al.	2015	Brasil	sim	7 dias	sim	sim	28 dias	95	98,9%	1,1% (1)	1,1% (1)
Höglund et al.	2016	Tailândia/ Miamar	não	-	sim	sim	28 dias	75	100%	0%	-
Saravu K et al.	2016	Índia	sim	14 dias	-	não	28 dias	155	100%	0%	-
Yuan et al.	2015	Miamar	sim	8 dias	sim*	não	28 dias	401	94,8%	5,2% (10)	-
Wangchuk et al.	2016	Butão	sim	14 dias	sim	não	28 dias	24	100%	0%	-
Valecha et al.	2016	Índia	sim	14 dias	sim*	sim	28 dias	158	100%	0%	-
Zuluaga-Idárraga et al.	2016	Colômbia	sim	14 dias	sim	não	28 dias	87	100%	0%	-
Pereira et al.	2016	Brasil	sim	7 dias	sim*	sim	28 dias	82	98,2%	1,8% (1)	-

*Ingestão supervisionada da cloroquina e primaquina até o terceiro dia. Pereira *et al.*: dados desta tese.

Nossos resultados indicam que os comprimidos de cloroquina revestida e de primaquina apresentados em co-blister são uma opção viável e traz uma inovação tecnológica ao tratamento convencional. A eficácia do estudo, 98,8%, está dentro do que preconiza a OMS, com falha do tratamento abaixo de 10% no dia 28 (85).

As perspectivas para o futuro do co-blister de cloroquina e primaquina são estudos de fase 4, ou seja, estudos de efetividade, uma vez obtida a liberação da ANVISA.

O desenho do protocolo já se encontra em elaboração e o ferramental de produção em estudo para aquisição. Sobretudo, destacamos a importância deste novo produto para enfatizar da adesão ao tratamento, dose adequada para o peso do paciente e qualidade do medicamento como fatores cruciais para manutenção da eficácia e efetividade do tratamento.

A discussão da política de tratamento da malária foge ao escopo deste estudo, porém, considerar a expertise nacional na produção, distribuição e controle da cloroquina e primaquina dentro de um estudo não somente de eficácia ou efetividade, mas também de custo-benefício, pode ser um ponto sensível para a tomada de decisão em saúde pública (3). A adesão ao tratamento é altamente impactante sobre a efetividade da droga. Estudos avaliando o valor de intervenções sobre a adesão do tratamento em pacientes com malária vivax, demonstraram que a embalagem em forma de co-blister e a supervisão do tratamento, são medidas validadas e são recomendadas para melhoria da efetividade do tratamento (16,148).

Não relacionado entre os objetivos deste estudo, mas com certeza, um resultado plenamente alcançado, ressalta-se a consolidação de um grupo de pesquisa clínica, dentro dos padrões de excelência das boas práticas em pesquisa clínica, em Porto Velho. Este estudo, apelidado internamente de Co-blister, nasceu de uma parceria entre a Fiocruz-RJ, pela Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência (VPPLR), Farmanguinhos e o Cepem, apoiado pela nascente Fiocruz-RO. Foi o primeiro ensaio clínico, iniciado e concluído, com monitoria e controle de qualidade interno e externo no centro de pesquisa, conduzido pela também recém estruturada plataforma de pesquisas clínicas da Fiocruz, que desenvolveu uma ficha clínica de pesquisa online (CRF-e, em inglês), juntamente com a equipe do centro e implementada como piloto durante o estudo. A qualidade da condução do estudo, já certificada pela plataforma técnica da Fiocruz, vem resultando em novos projetos, em parceria com o serviço público, com Farmanquinhos, OPAS, Ministério da Saúde, Butantan, assim como com a indústria privada, que incluem a GlaxoSmithkline, a Jansen e outras, já incluindo também outras doenças tropicais da região. Ter uma equipe habilitada e certificada, fortalece as ações em ciência, tecnologia e inovação, não só no centro em Porto Velho, mas também no Brasil, ao permitir que mais uma parcela da população do Norte do país também tenha a chance de ser avaliada quanto aos benefícios de novas tecnologias.

6 CONCLUSÃO

6.1.1 CONCLUSÕES

- A avaliação tipo PP da cloroquina revestida, combinada à primaquina por 7 dias, indica resposta clínica e parasitológica adequada em 98,8% (IC 95% 93,4 – 99,9) dos 82 pacientes avaliados.
- A avaliação tipo IT da cloroquina revestida, combinada à primaquina por 7 dias, indica resposta clínica e parasitológica adequada em 92,0% (IC95% 84,3 – 96,7) dos 88 pacientes avaliados.
- A análise de eficácia secundária de sucesso precoce de tratamento, com clearance parasitológico em D3, foi realizada em 84 pacientes com taxa de sucesso de 100%.
- A taxa de sucesso terapêutico cumulativa até dia 28 (ou a probabilidade de permanecer sem parasitos no dia 28) foi definida usando o método de análise de sobrevivência Kaplan-Meier e apresenta incidência cumulativa de sucesso em D28 de 98,8% (IC95% 91,7-99,8).
- Não houve pacientes com EA graves ou pacientes com EA que levassem à suspensão do tratamento. Não houve mortes registradas durante este estudo.
- A avaliação de farmacocinética do difosfato de cloroquina sanguínea indica que 100% dos pacientes obtiveram valor de C_{max} maior que 100 ng/mL.

6.1.2 CONCLUSÃO GERAL

O esquema terapêutico avaliado é seguro e eficaz para o tratamento de malária vivax não complicada dentro das doses e população avaliada neste estudo.

7 BIBLIOGRAFIA

1. Aregawi M, Cibulskis RE, Otten M, Williams R. World malaria report 2009. 2009.
2. World Health Organization. World Malaria Report 2014. 2015 Mar 9;:1–242.
3. World Health Organization. Control and elimination of *Plasmodium vivax* malaria. 2015. 64 p.
4. Ministério da Saude do Brasil, Datasus. Resumo Epidemiológico Nacional Mensal - Sivep-Malária [Internet]. 2015 Oct. Available from: <http://dw.saude.gov.br/gsid/servlet/mstrWeb?evt=2048001&documentID=AC2B0F5041CEEC8C671FA39D5337A697&server=srvbipdf03&project=DMMalaria&uid=convidado&pwd=datasus&hiddensections=header,path,dockTop,dockLeft,footer>
5. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J. BioMed Central Ltd*; 2010;9(1):115.
6. Gething PW, Elyazar IRF, Moyes CL, Smith DL, Battle KE, Guerra CA, et al. A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012 Jan 1;6(9):e1814–4.
7. Genton B, D'Acremont V, Rare L, Baea K, Reeder JC, Alpers MP, et al. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Med*. 2008;5(6):e127.
8. Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, et al. Multidrug-Resistant *Plasmodium vivax* Associated with Severe and Fatal Malaria: A Prospective Study in Papua, Indonesia. Rogerson S, editor. *PLoS Med. Public Library of Science*; 2008;5(6):e128.
9. Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol* [Internet]. 2009 May;25(5):220–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492209000646>
10. Kochar DK, Das A, Kochar SK, Saxena V, Sirohi P, Garg S, et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009 Feb 1;80(2):194–8.
11. Barcus MJ, Basri H, Picarima H, Manyakori C, Sekartuti, Elyazar I, et al. Demographic risk factors for severe and fatal vivax and falciparum malaria among hospital admissions in northeastern Indonesian Papua. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007 Nov 1;77(5):984–91.
12. Baird KJ, Maguire JD, Price RN. Diagnosis and treatment of *Plasmodium vivax* malaria. *Adv Parasitol*. 2012;80:203–70.
13. Vitor-Silva S, Reyes-Lecca RC, Pinheiro TRA, Lacerda MVG. Malaria is associated with poor school performance in an endemic area of the Brazilian Amazon. *Malar J. BioMed Central Ltd*; 2009;8(1):230.

14. Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. 2001 Jan 1;64(1 suppl):97–106. Available from: http://www.ajtmh.org/content/64/1_suppl/97.abstract
15. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. *The Lancet*. 2014 Feb;383(9918):723–35.
16. Fuangchan A, Dhippayom T, Kongkaew C. Intervention to promote patients' adherence to antimalarial medication: a systematic review. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2014 Jan;90(1):11–9.
17. Yeung S, White NJ. How do patients use antimalarial drugs? A review of the evidence. *Trop Med Int Health*. Blackwell Science Ltd; 2005 Feb;10(2):121–38.
18. Pereira EA, Ishikawa EA, Fontes CJ. Adherence to *Plasmodium vivax* malaria treatment in the Brazilian Amazon Region. *Malar J*. BioMed Central Ltd; 2011;10(1):355.
19. Cox FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors*. BioMed Central Ltd; 2010;3(1):5.
20. de Souza DK, Koudou BG, Bolay FK, Boakye DA, Bockarie MJ. Filling the gap 115 years after Ronald Ross: the distribution of the *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* s.s from Freetown and Monrovia, West Africa. Snounou G, editor. *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2013;8(5):e64939.
21. Hempelmann E, Krafts K. Bad air, amulets and mosquitoes: 2,000 years of changing perspectives on malaria. *Malar J*. BioMed Central Ltd; 2013 Jul 9;12(1):232.
22. Barnett JA. A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. *Yeast*. John Wiley & Sons, Ltd; 2000;16(8):755–71.
23. Blevins SM, Bronze MS. Robert Koch and the “golden age” of bacteriology. Vol. 14, *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. Elsevier; 2010. 8 p.
24. Hempelmann E. Hemozoin Biocrystallization in *Plasmodium falciparum* and the antimalarial activity of crystallization inhibitors. *Parasitol Res*. Springer-Verlag; 2007;100(4):671–6.
25. Cox FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors*. BioMed Central Ltd; 2010;3(1):5.
26. Schlagenhauf P. Malaria: from prehistory to present. *Infect Dis Clin North Am*. 2004 Jun;18(2):189–205–tableofcontents.
27. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. Geneva: WHO; 2015.
28. Krotoski WA, Collins WE, Bray RS, Garnham PC, Cogswell FB, Gwadz RW, et al. Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax*

- infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1982 Nov;31(6):1291–3.
29. White NJ. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J*. BioMed Central Ltd; 2011 Oct 11;10(1):297.
 30. Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M. Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012 Jan 15;4(1):2012013–11.
 31. Day K. The Epidemiology of Malaria. In: *Malaria*. CRC Press; 1999. pp. 57–86. (Molecular and Clinical Aspects).
 32. Cox 2005 *Infection and Immunity*. 2005 Apr 8;:1–7.
 33. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. *Vivax malaria: neglected and not benign*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007 Dec;77(6 Suppl):79–87.
 34. Alves FP, Gil LHS, Marrelli MT, Ribolla PEM, Camargo EP, Pereira-da-Silva LH. Asymptomatic Carriers of *Plasmodium* spp. as Infection Source for Malaria Vector Mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J Med Entomol*. 2005 Sep;42(5):777–9.
 35. Butler NS, Moebius J, Pewe LL, Traoré B, Doumbo OK, Tygrett LT, et al. Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage *Plasmodium* infection. *Nat Immunol*. Nature Publishing Group; 2011 Dec 11;13(2):188–95.
 36. Costa PAC, Leoratti FMS, Figueiredo MM, Tada MS, Pereira DB, Junqueira C, et al. Induction of inhibitory receptors on T cells during *Plasmodium vivax* malaria impairs cytokine production. *J Infect Dis*. Oxford University Press; 2015 May 27;:jiv306.
 37. Costa FTM, Lopes SCP, Albrecht L, Ataíde R, Siqueira AM, Souza RM, et al. On the pathogenesis of *Plasmodium vivax* malaria: perspectives from the Brazilian field. *Int J Parasitol*. 2012 Nov;42(12):1099–105.
 38. Lacerda MVGM, Fragoso SCPS, Alecrim MGCM, Alexandre MAAM, Magalhães BMLB, Siqueira AMA, et al. Postmortem Characterization of Patients With Clinical Diagnosis of *Plasmodium vivax* Malaria: To What Extent Does This Parasite Kill? *Clin Infect Dis*. 2012 Oct 1;55(8):e67–e74.
 39. Leoratti FM de S, Trevelin SC, Cunha FQ, Rocha BC, Costa PAC, Gravina HD, et al. Neutrophil paralysis in *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(6):e1710.
 40. Lacerda MVG, Mourão MPG, Coelho HCC, Santos JB. Thrombocytopenia in malaria: who cares? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106:52–63.
 41. Baird JK. Neglect of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitol*. 2007.
 42. *Epidemiology*. Malaria prophylaxis. *BMJ*. 1983 Mar 5;286(6367):787–9.

43. Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH. A Review of Malaria Diagnostic Tools: Microscopy and Rapid Diagnostic Test (RDT). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007 Dec 1;77(6_Suppl):119–27.
44. Murphy SC, Shott JP, Parikh S, Etter P, Prescott WR, Stewart VA. Malaria Diagnostics in Clinical Trials. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2013 Nov 6;89(5):824–39.
45. Oriero EC, Jacobs J, Van Geertruyden J-P, Nwakanma D, D'Alessandro U. Molecular-based isothermal tests for field diagnosis of malaria and their potential contribution to malaria elimination. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press; 2015 Jan;70(1):2–13.
46. Goyal K, Kaur H, Sehgal A, Sehgal R. RealAmp Loop-Mediated Isothermal Amplification as a Point-of-Care Test for Diagnosis of Malaria: Neither Too Close nor Too Far. *J Infect Dis*. Oxford University Press; 2015 May 15;211(10):1686–6.
47. Dronamraju KR, Arese P. *Malaria*. Boston: Springer Science & Business Media; 2006. 1 p.
48. França TCC, Santos MGD, Figueroa-Villar JD. Malaria: historical aspects and chemotherapy. *Química Nova*. SBQ; 2008;31(5):1271–8.
49. Baird JK. Resistance to chloroquine unhinges vivax malaria therapeutics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 May 1;55(5):1827–30.
50. Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, et al. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 2014 Jul 31;371(5):411–23.
51. Peters W. The problem of drug resistance in malaria. *Parasitology*. 1985 Apr;90 (Pt 4):705–15.
52. Fungladda W, Honrado ER, Thimasarn K, Kitayaporn D, Karbwang J, Kamolratanakul P, et al. Compliance with artesunate and quinine + tetracycline treatment of uncomplicated falciparum malaria in Thailand. *Bull World Health Org*. World Health Organization; 1998;76 Suppl 1(Suppl 1):59–66.
53. Ministério da Saúde Brasil. *Guia prático de tratamento da malária no Brasil*. 2010.
54. Mehlotra R, Zimmerman P. Resistance to Antimalarial Drugs: Parasite and Host Genetic Factors. In: *Emerging Infectious Diseases of the 21st Century*. Springer US; 2006. pp. 81–124.
55. World Health Organization. *Chemotherapy of malaria* [Internet]. Geneva; 1961 [cited 2015 Oct 28]. Available from: apps.who.int/iris/bitstream/10665/40499/1/WHO_TRS_226.pdf
56. Cooper RG, Magwere T. Chloroquine: novel uses & manifestations. *Indian Journal of Medical Research*. 2008.

57. Ruebush TK, Zegarra J, Cairo J, Andersen EM, Green M, Pillai DR, et al. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* malaria in Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2003 Nov 1;69(5):548–52.
58. Baird JK. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. *Antimicrob Agents Chemother*. American Society for Microbiology; 2004 Nov;48(11):4075–83.
59. Price RN, Douglas NM, Anstey NM. New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. *Curr Opin Infect Dis*. 2009 Oct;22(5):430–5.
60. Gonçalves LA, Cravo P, Ferreira MU. Emerging *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in South America: an overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014 Aug;109(5):534–9.
61. Susan E Francis, David J Sullivan A Jr, Goldberg ADE. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. <http://dxdoiorg/101146/annurevmicro51197>. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA; 2003 Nov 28;51(1):97–123.
62. Inoue J, Lopes D, do Rosário V, Machado M. Analysis of polymorphisms in *Plasmodium falciparum* genes related to drug resistance: a survey over four decades under different treatment policies in Brazil. 2014. Available from: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1475-2875-13-372.pdf>
63. Koenderink JB, Kavishe RA, Rijpma SR, Russel FGM. The ABCs of multidrug resistance in malaria. *Trends Parasitol*. Elsevier; 2010 Sep;26(9):440–6.
64. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, et al. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell*. 2000 Oct;6(4):861–71.
65. Desowitz R. Milestones and Millstones in the History of Malaria. In: *Malaria*. CRC Press; 2014. pp. 1–16. (Molecular and Clinical Aspects).
66. John GK, Douglas NM, Seidlein von L, Nosten F, Baird JK, White NJ, et al. Primaquine radical cure of *Plasmodium vivax*: a critical review of the literature. *Malar J*. BioMed Central Ltd; 2012;11(1):280.
67. Durand S, Cabezas C, Lescano AG, Galvez M, Gutierrez S, Arrospide N, et al. Efficacy of three different regimens of primaquine for the prevention of relapses of *Plasmodium vivax* malaria in the Amazon Basin of Peru. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2014 Jul;91(1):18–26.
68. Hill DR, Baird JK, Parise ME, Lewis LS, Ryan ET, Magill AJ. Primaquine: report from cdc expert meeting on malaria chemoprophylaxis I. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2006 Sep 1;75(3):402–15.
69. Baird JK, Lacy MD, Basri H, Barcus MJ, Maguire JD, Bangs MJ, et al. Randomized,

- Parallel Placebo-Controlled Trial of Primaquine for Malaria Prophylaxis in Papua, Indonesia. *Clin Infect Dis*. 2001 Dec 15;33(12):1990–7.
70. Galappaththy GN, Tharyan P, Kirubakaran R. Primaquine for preventing relapse in people with *Plasmodium vivax* malaria treated with chloroquine. Galappaththy GN, editor. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 1996. 1 p.
 71. Llanos-Cuentas A, Lacerda MV, Rueangweerayut R, Krudsood S, Gupta SK, Kochar SK, et al. Tafenoquine plus chloroquine for the treatment and relapse prevention of *Plasmodium vivax* malaria (DETECTIVE): a multicentre, double-blind, randomised, phase 2b dose-selection study. *Lancet*. 2014 Mar 22;383(9922):1049–58.
 72. Meshnick SR, Taylor TE, Kamchonwongpaisan S. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. *Microbiol Rev*. American Society for Microbiology (ASM); 1996 Jun;60(2):301–15.
 73. Eastman RT, Fidock DA. Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. Nature Publishing Group. Nature Publishing Group; 2009 Nov 2;7(12):864–74.
 74. Sagara I, Fofana B, Gaudart J, Sidibe B, Togo A, Toure S, et al. Repeated artemisinin-based combination therapies in a malaria hyperendemic area of Mali: efficacy, safety, and public health impact. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2012 Jul;87(1):50–6.
 75. Taylor WRJ, White NJ. Antimalarial drug toxicity: a review. *Drug Saf*. 2004;27(1):25–61.
 76. Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM, et al. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med*. 2008 Dec 11;359(24):2619–20.
 77. Tilley L, Straimer J, Gnädig NF, Ralph SA, Fidock DA. Artemisinin Action and Resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol*. Elsevier; 2016 Sep;32(9):682–96.
 78. Dondorp AM, Yeung S, White L, Nguon C, Day NPJ, Socheat D, et al. Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group; 2010 Apr 1;8(4):272–80.
 79. Loiola CCP, da Silva CJM, Tauil PL. Malaria control in Brazil: 1965 to 2001. *Rev Panam Salud Publica*. 2002 Apr;11(4):235–44.
 80. Cruz Marques A. Human migration and the spread of malaria in Brazil. *Parasitology Today*. 1987 Jun;3(6):166–70.
 81. Akhavan D, Musgrove P, Abrantes A. Cost-effective malaria control in Brazil: cost-effectiveness of a malaria control program in the Amazon Basin of Brazil, 1988–1996. *Social Science & Medicine*. 1999;(49):1385–99.

82. Nabarro DN, Tayler EM. The“ roll back malaria” campaign. *Science*. 1998;280(5372):2067–8.
83. Assembly OG. Road map towards the implementation of the United Nations Millennium Declaration: report of the Secretary-General. In: Road map towards the implementation of the United Nations Millennium Declaration: report of the Secretary-General. United Nations; 2001.
84. Conn VS, Ruppam TM, Chan KC, Dunbar-Jacob J, Pepper GA, De Geest S. Packaging interventions to increase medication adherence: systematic review and meta-analysis. *Current Medical Research and Opinion*. Informa Healthcare; 2014 Oct 24;31(1):145–60.
85. World Health Organization. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. Geneva : World Health Organization; 2009.
86. Ratcliff A, Siswantoro H, KENANGALEM E, Wuwung M, Brockman A, Edstein MD, et al. Therapeutic response of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* to chloroquine and sulfadoxine–pyrimethamine in southern Papua, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. Oxford University Press; 2007 Apr 1;101(4):351–9.
87. White NJ. The assessment of antimalarial drug efficacy. *Trends Parasitol*. 2002 Oct;18(10):458–64.
88. Price RN, Seidlein von L, Valecha N, Nosten F, Baird JK, White NJ. Global extent of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2014 Oct;14(10):982–91. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70855-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70855-2)
89. Common Terminology Criteria for Adverse Events. 2010. 1 p.
90. Marques MM, Costa MRF, Santana Filho FS, Vieira JLF, Nascimento MTS, Brasil LW, et al. *Plasmodium vivax* chloroquine resistance and anemia in the western Brazilian Amazon. *Antimicrob Agents Chemother*. American Society for Microbiology; 2014;58(1):342–7.
91. Villalobos-Salcedo JM, Tada MS, Kimura E, Menezes MJ, Pereira da Silva LH. In-vivo sensitivity of *Plasmodium vivax* isolates from Rondônia (western Amazon region, Brazil) to regimens including chloroquine and primaquine. *Ann Trop Med Parasitol*. 2000 Dec;94(8):749–58.
92. Moreno Pérez DA, Ruíz JA, Patarroyo MA. Reticulocytes: *Plasmodium vivax* target cells. *Biology of the Cell*. WILEY-VCH Verlag; 2013 Jun 1;105(6):251–60.
93. McQueen PG, McKenzie FE. Competition for red blood cells can enhance *Plasmodium vivax* parasitemia in mixed-species malaria infections. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. NIH Public Access; 2006 Jul;75(1):112–25.
94. Zubairi ABS, Nizami S, Raza A, Mehraj V, Rasheed AF, Ghanchi NK, et al. Severe *Plasmodium vivax* Malaria in Pakistan. *Emerging Infect Dis*. 2013

- Nov;19(11):1851–4.
95. Antinori S, Milazzo L, Ridolfo AL, Galimberti L, Corbellino M. Severe *Plasmodium vivax* Malaria: Fact or Fiction? *Clin Infect Dis*. 2012 Dec;55(11):1581–3.
 96. Karunaweera ND, Wijesekera SK, Wanasekera D, Mendis KN, Carter R. The paroxysm of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitol*. 2003 Apr 1;19(4):188–93.
 97. Oakley MS, Gerald N, McCutchan TF, Aravind L, Kumar S. Clinical and molecular aspects of malaria fever. *Trends Parasitol*. Elsevier Ltd; 2011 Oct 1;27(10):442–9.
 98. Gonçalves RM, Scopel KKG, Bastos MS, Ferreira MU. Cytokine balance in human malaria: does *Plasmodium vivax* elicit more inflammatory responses than *Plasmodium falciparum*? Snounou G, editor. *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2012;7(9):e44394.
 99. Gazzinelli RT, Kalantari P, Fitzgerald KA, Golenbock DT. Innate sensing of malaria parasites. *Nature Publishing Group*. 2014 Nov;14(11):744–57.
 100. Mendonça VRR, Queiroz ATL, Lopes FM, Andrade BB, Barral-Netto M. Networking the host immune response in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J*. 2013;12:69–9.
 101. Oakley MS, Gerald N, McCutchan TF, Aravind L, Kumar S. Clinical and molecular aspects of malaria fever. *Trends Parasitol*. Elsevier Ltd; 2011 Oct 1;27(10):442–9.
 102. Mendonça VRR, Andrade BB, Souza LCL, Magalhães BML, Mourão MPG, Lacerda MVG, et al. Unravelling the patterns of host immune responses in *Plasmodium vivax* malaria and dengue co-infection. *Malar J*. 2nd ed. BioMed Central Ltd; 2015;14(1):315.
 103. Mourão MPG, Bastos M de S, Figueiredo RMP de, Gimaque JB de L, Alves VDCR, Saraiva MDGG, et al. Arboviral diseases in the Western Brazilian Amazon: a perspective and analysis from a tertiary health & research center in Manaus, State of Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop*. SBMT; 2015;48 Suppl 1:20–6.
 104. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging Infect Dis*. 2015 Oct;21(10):1885–6.
 105. Gallego V, Berberian G, Lloveras S, Verbanaz S, Chaves TSS, Orduna T, et al. The 2014 FIFA World Cup: communicable disease risks and advice for visitors to Brazil--a review from the Latin American Society for Travel Medicine (SLAMVI). *Travel Medicine and Infectious Disease*. Elsevier; 2014 May;12(3):208–18.
 106. de Oliveira SV, Escobar LE, Peterson AT, Gurgel-Gonçalves R. Potential geographic distribution of hantavirus reservoirs in Brazil. Baldanti F, editor. *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2013;8(12):e85137.
 107. Amaral MSC, Estevam GK, Penatti M, Lafontaine R, Lima ICG, Spada PKP, et al. The prevalence of norovirus, astrovirus and adenovirus infections among

- hospitalised children with acute gastroenteritis in Porto Velho, state of Rondônia, western Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz*; 2015 Apr;110(2):215–21.
108. Sánchez-Arcila JC, Perce-da-Silva D de S, Vasconcelos MPA, Rodrigues-da-Silva RN, Pereira VA, Aprígio CJL, et al. Intestinal parasites coinfection does not alter plasma cytokines profile elicited in acute malaria in subjects from endemic area of Brazil. *Mediators Inflamm*. 2014;2014(5):857245.
 109. Cardoso MA, Ferreira MU, Camargo LM, Szarfarc SC. [Anemia in a population from an endemic area of malaria, Rondônia (Brazil)]. *Rev Saude Publica*. 1992 Jun 1;26(3):161–6.
 110. de Pina Costa A, da Silveira Bressan C, Pedro RS, Valls-de-Souza R, da Silva S, de Souza PR, et al. [Delayed diagnosis of malaria in a dengue endemic area in the Brazilian extra-Amazon: recent experience of a malaria surveillance unit in state of Rio de Janeiro]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010 Aug 1;43(5):571–4.
 111. Abdon NP, Pinto A, Silva R. Avaliação da resposta aos esquemas de tratamento reduzidos para malária vivax. *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2001;34(4):343–8.
 112. Naing C, Aung K, Win D-K, Wah MJ. Efficacy and safety of chloroquine for treatment in patients with uncomplicated *Plasmodium vivax* infections in endemic countries. *Trans R Soc Trop Med Hyg. Oxford University Press*; 2010 Nov;104(11):695–705.
 113. Thanh PV, Hong NV, Van NV, Louisa M, Baird K, Xa NX, et al. Confirmed *Plasmodium vivax* Resistance to Chloroquine in Central Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother. American Society for Microbiology*; 2015 Dec;59(12):7411–9.
 114. Gonzalez-Ceron L, Rodriguez MH, Sandoval MA, Santillan F, Galindo-Virgen S, Betanzos AF, et al. Effectiveness of combined chloroquine and primaquine treatment in 14 days versus intermittent single dose regimen, in an open, non-randomized, clinical trial, to eliminate *Plasmodium vivax* in southern Mexico. *Malar J*. 3rd ed. *BioMed Central*; 2015;14(1):426.
 115. Valecha N, Savargaonkar D, Srivastava B, Rao BHK, Tripathi SK, Gogtay N, et al. Comparison of the safety and efficacy of fixed-dose combination of arterolane maleate and piperazine phosphate with chloroquine in acute, uncomplicated *Plasmodium vivax* malaria: a phase III, multicentric, open-label study. *Malar J*. *BioMed Central*; 2016 Jan 27;15(1):1.
 116. Chattopadhyay R, Mahajan B, Kumar S. Assessment of safety of the major antimalarial drugs. *Expert Opin Drug Saf*. 2007 Sep;6(5):505–21.
 117. AlKadi HO. Antimalarial drug toxicity: a review. *Chemotherapy*. 2007;53(6):385–91.
 118. da Silva Simões Costa Branco Neves MV. Estudio de los efectos ototóxicos en 725 pacientes tratados con antimaláricos en el Hospital Central de Maputo (mozambique). [Barcelona]; 2005. pp. 1–264.

119. Bortoli R, Santiago M. Chloroquine ototoxicity. *Clin Rheumatol*. Springer-Verlag; 2007 Jun 27;26(11):1809–10.
120. Ballut PC, Siqueira AM, Orlando AC, Alexandre MA, Alecrim MGC, Lacerda MV. Prevalence and risk factors associated to pruritus in *Plasmodium vivax* patients using chloroquine in the Brazilian Amazon. *Acta Trop*. 2013 Dec;128(3):504–8.
121. Mnyika KS, Kihamia CM. Chloroquine-induced pruritus: its impact on chloroquine utilization in malaria control in Dar es Salaam. *J Trop Med Hyg*. 1991 Feb;94(1):27–31.
122. Ajayi AA, Oluokun A, Sofowora O, Akinleye A, Ajayi AT. Epidemiology of antimalarial-induced pruritus in Africans. *Eur J Clin Pharmacol*. 1989;37(5):539–40.
123. Andrade JG de, Andrade ALSS de, Araujo ESO, Oliveira RM, Silva SA, Martelli CMT, et al. A randomized clinical trial with high dose of chloroquine for treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1992;34(5):467–73.
124. Bell D. Current issues in the treatment of uncomplicated malaria in Africa. *British Medical Bulletin*. 2004 Dec 13;71(1):29–43.
125. Gama H, Ismael A, Sitori F, Matola A, Barros H, Lunet N. Factors associated with chloroquine-induced pruritus during malaria treatment in Mozambican university students. *Gac Sanit*. 2009 Jul;23(4):306–10.
126. Bloland PB. Drug resistance in malaria [Internet]. World Health Organization, editor. Malaria Epidemiology Branch, Centers for Disease Control and Prevention Chamblee, GA, United States of America. Available from: <http://www.who.int/emc>
127. Adebayo RA, Sofowora GG, Onayemi O, Udoh SJ, Ajayi AA. Chloroquine-induced pruritus in malaria fever: contribution of malaria parasitaemia and the effects of prednisolone, niacin, and their combination, compared with antihistamine. *Br J Clin Pharmacol*. Blackwell Science Ltd; 1997 Aug 1;44(2):157–61.
128. Aghahowa SE, Obianwu HO, Isah AO, Arhewoh IM. Chloroquine-induced Pruritus. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Medknow Publications; 2010;72(3):283–9.
129. Ballut PC, Siqueira AM, Orlando ACB, Alexandre MAA, Alecrim MGC, Lacerda MVG. Prevalence and risk factors associated to pruritus in *Plasmodium vivax* patients using chloroquine in the Brazilian Amazon. *Acta Trop*. 2013 Dec;128(3):504–8.
130. Maslove DM, Mnyusiwalla A, Mills EJ, McGowan J, Attaran A, Wilson K. Barriers to the effective treatment and prevention of malaria in Africa: A systematic review of qualitative studies. *BMC Int Health Hum Rights*. BioMed Central Ltd; 2009;9(1):26.
131. Sung YH, Park JM. [A case of malarial hepatitis by *Plasmodium vivax*]. *Korean J Gastroenterol*. 2010 Oct 31;56(5):329–33.

132. Castro-Gomes T, Mourão LC, Melo GC, Monteiro WM, Lacerda MVG, Braga ÉM. Potential immune mechanisms associated with anemia in *Plasmodium vivax* malaria: a puzzling question. *Infect Immun*. 2014 Oct;82(10):3990–4000.
133. Hwang J, Alemayehu BH, Reithinger R, Tekleyohannes SG, Takele Teshi, Birhanu SG, et al. In vivo efficacy of artemether-lumefantrine and chloroquine against *Plasmodium vivax*: a randomized open label trial in central Ethiopia. Seidlein von L, editor. *PLoS ONE*. 2013;8(5):e63433.
134. Simões LR, Alves ER, Ribatski-Silva D, Gomes LT, Nery AF, Fontes CJF. Factors associated with recurrent *Plasmodium vivax* malaria in Porto Velho, Rondônia State, Brazil, 2009. *Cad Saude Publica*. 2014 Jul;30(7):1403–17.
135. Ducharme J, Farinotti DR. Clinical Pharmacokinetics and Metabolism of Chloroquine. *Clinical Pharmacokinetics*. Springer International Publishing; 1996;31(4):257–74.
136. Siqueira A. Combinação de dose fixa de artesunato-amodiaquina versus cloroquina para o tratamento de fase sanguínea de infecção não-complicada de *Plasmodium vivax*: Ensaio clínico de fase 3, randomizado, aberto, de não- inferioridade. [Manaus]; 2014. pp. 1–308.
137. Añez A, Moscoso M, Laguna Á, Garnica C, Melgar V, Cuba M, et al. Resistance of infection by *Plasmodium vivax* to chloroquine in Bolivia. *Malar J. BioMed Central*; 2015;14(1):261.
138. Rishikesh K, Kamath A, Hande MH, Vidyasagar S, Acharya RV, Acharya V, et al. Therapeutic assessment of chloroquine-primaquine combined regimen in adult cohort of *Plasmodium vivax* malaria from a tertiary care hospital in southwestern India. *Malar J. BioMed Central*; 2015;14(1):310.
139. Getachew S, Thriemer K, Auburn S, Abera A, Gadisa E, Aseffa A, et al. Chloroquine efficacy for *Plasmodium vivax* malaria treatment in southern Ethiopia. *Malar J*. 2nd ed. *BioMed Central*; 2015;14(1):525.
140. Ould Ahmedou Salem MS, Mohamed Lemine YO, Deida JM, Lemrabott MAO, Ouldabdallahi M, Ba MDD, et al. Efficacy of chloroquine for the treatment of *Plasmodium vivax* in the Saharan zone in Mauritania. *Malar J. BioMed Central*; 2015;14(1):39.
141. Cheoymang A, Ruenweerayut R, Muhamad P, Rungsahirunrat K, Na-Bangchang K. Patients' adherence and clinical effectiveness of a 14-day course of primaquine when given with a 3-day chloroquine in patients with *Plasmodium vivax* at the Thai-Myanmar border. *Acta Trop*. 2015 Dec;152:151–6.
142. Gomes MDSM, Vieira JLF, Machado RLD, Nacher M, Stefani A, Musset L, et al. Efficacy in the treatment of malaria by *Plasmodium vivax* in Oiapoque, Brazil, on the border with French Guiana: the importance of control over external factors. *Malar J. BioMed Central Ltd*; 2015;14(1):402.
143. Höglund R, Moussavi Y, Ruengweerayut R, Cheomung A, Äbelö A, Na-Bangchang K. Population pharmacokinetics of a three-day chloroquine treatment in patients

- with *Plasmodium vivax* infection on the Thai-Myanmar border. *Malar J.* 2016;15(1):129.
144. Saravu K, Kumar R, Ashok H, Kundapura P, Kamath V, Kamath A, et al. Therapeutic Assessment of Chloroquine-Primaquine Combined Regimen in Adult Cohort of *Plasmodium vivax* Malaria from Primary Care Centres in Southwestern India. Langsley G, editor. *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2016;11(6):e0157666.
 145. Yuan L, Wang Y, Parker DM, Gupta B, Yang Z, Liu H, et al. Therapeutic responses of *Plasmodium vivax* malaria to chloroquine and primaquine treatment in northeastern Myanmar. *Antimicrob Agents Chemother.* American Society for Microbiology; 2015 Feb;59(2):1230–5.
 146. Wangchuk S, Drukpa T, Penjor K, Peldon T, Dorjey Y, Dorji K, et al. Where chloroquine still works: the genetic make-up and susceptibility of *Plasmodium vivax* to chloroquine plus primaquine in Bhutan. *Malar J.* 3rd ed. BioMed Central; 2016;15(1):277.
 147. Zuluaga-Idárraga L, Blair S, Akinyi Okoth S, Udhayakumar V, Marcet P, Escalante AA, et al. *Plasmodium vivax* malaria recurrence after radical treatment with chloroquine-primaquine standard regimen in Turbo, Colombia: Results from a prospective study. *Antimicrob Agents Chemother.* American Society for Microbiology; 2016 May 16;:AAC.00186–16.
 148. Orton L, Barnish G. Unit-dose packaged drugs for treating malaria (review). *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2005.

8 ANEXOS

8.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Anexo II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Neste momento, você está sendo convidado (a) a participar desta pesquisa por estar com malária provocada por *Plasmodium vivax* e este texto explica o que será realizado. Você receberá todas as informações que desejar, por favor sinta-se a vontade em fazer qualquer pergunta. A malária é reconhecida como um grave problema para a saúde e atinge quase a metade (40%) da população em mais de 100 países. Ela é transmitida através da picada de um mosquito doente.

Se não for tratada, a doença pode se tornar uma ameaça à vida. Em muitas partes do mundo, a malária ficou resistente a alguns medicamentos. Isso pode acontecer quando o paciente não realiza o tratamento completo. Se você aceitar a participar desta pesquisa, você receberá uma cartela com os medicamentos para o tratamento da malária que estamos avaliando, fazendo com que você entenda melhor o tratamento e tome os medicamentos corretamente.

Por que este estudo está sendo realizado?

Trata-se de uma avaliação de uma nova apresentação de medicamentos para tratamento da malária que podem facilitar os pacientes com malária vivax a tomar corretamente. É importante dizer que os medicamentos desta avaliação são os mesmos utilizados pelo Ministério da Saúde no tratamento de malária vivax.

Quando o paciente não toma o tratamento completo a malária não sai completamente do sangue. Se o mosquito picar esta pessoa o mosquito vai ficar doente e vai passar a malária para outra pessoa da sua comunidade. Em um ambiente de uso incorreto dos tratamentos propostos a resistência aos medicamentos também possui maior chance de crescer.

O objetivo principal desta avaliação é verificar a eficácia terapêutica e segurança desta cartela de cloroquina 150 mg e primaquina 15 mg. Só podem participar desta avaliação pacientes com idade entre 18 e 70 anos ou na faixa de peso entre 50 e 90 Kg.

Período de Acompanhamento: Você será acompanhado por 28 dias, onde será examinado em consultas domiciliares realizadas pela equipe envolvida no projeto, composta por Médicos, Enfermeiros e Técnicos de Enfermagem. É importante que fique claro que você receberá um calendário de visitas com datas agendadas e horários de acordo com sua disponibilidade. Lembramos que as visitas programadas acontecerão de acordo com o cronograma de estudo.

Procedimentos

Se você decidir participar deste estudo, você receberá tratamento em forma de uma cartela composta de comprimidos revestidos de Cloroquina 150 mg e Primaquina 15 mg. Você será tratado e monitorado por 28 dias, lembrando que o tratamento poderá ter a duração de 7 a 8 dias, levando em conta o peso do paciente avaliado. As doses serão por via oral, única, tomadas diariamente. Os demais dias serão para acompanhamento e consultas com a equipe.

No dia da primeira consulta (dia 0) você vai ser examinado pela equipe de saúde envolvida no projeto, além de retirar sangue da ponta do dedo – aproximadamente 9 gotas; e na veia do braço realizar outros exames e verificar se você tem anemia. Este procedimento não é específico para a pesquisa, mas é a rotina do ambulatório de malária do CEPEM. Caso você seja mulher, também vai fazer um teste de gravidez e receberá orientações acerca dos métodos contraceptivos. Essa primeira visita é muito importante para saber se você pode participar do estudo ou não.

Depois dessa primeira visita, você vai receber visitas em mais 7 dias. Cada visita tem um tipo de avaliação programada.

O que eu preciso para participar do estudo? (critérios de inclusão)

É preciso:

- Ter idade entre 18 e 70 anos e peso entre 50 e 90 Kg;
- Estar com malária causada apenas por P. vivax confirmado por lâmina;
- Contagem de parasitos assexuados >250/ μ l;
- Apresentar febre (>37,5°C) ou história de febre durante dois dias antes do recrutamento.
- Conseguir engolir os medicamentos em estudo;
- Ter disponibilidade e desejo de atender ao cronograma de avaliação do estudo;
- Não estar com anemia;
- Concordar e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Por que eu não poderia participar do estudo? (critérios de exclusão)

Você não pode participar do estudo em algum dos casos abaixo:

- Presença de condições clínicas relacionadas à malária vivax que requerem hospitalização (coma, dificuldade respiratória ou anemia grave);
- Presença de condições febris devido a outra doença além da malária (exemplo, sarampo, infecção aguda do trato respiratório, diarreia com desidratação) ou outras comorbidades crônicas ou grave (por exemplo doença renal, cardíaca ou hepática crônica, e HIV/SIDA);
- Se você estiver usando algum medicamento que o médico julgue que não é bom para a avaliação;
- Se você apresentar alergia a algum medicamento que será usado.
- Se você estiver grávida ou estiver amamentando;
- Se você tiver feito outro tratamento para malária em menos de 63 dias.
- Se você estiver com anemia importante (hemoglobina <7,0 mg/dl).

Por que o médico me afastaria antecipadamente do estudo?

Você pode ser afastado antecipadamente do estudo caso seja sua vontade, a qualquer momento. Em caso de você desistir de participar, não será penalizado (a) de forma alguma e receberá normalmente o tratamento distribuído pelo Ministério da Saúde. Além disso, há outros motivos que podem te afastar do estudo:

- O não-comparecimento ou perda de contato durante os três primeiros dias de estudo;
- O aparecimento de eventos indesejados sérios ou alterações nos seus exames que o médico julgue que é melhor a interrupção do tratamento;
- Alergia aos produtos utilizados;
- Caso você tome algum outro medicamento contra malária ou algum antibiótico com comprovada ação contra a malária durante o período de avaliação;



- Em caso de você ter malária grave ou no caso de você não ter preenchido os critérios de inclusão e ter sido incluído por engano (pode ser necessário que você use um outro medicamento);
- Ocorrência de outra doença ao longo do tratamento.

Riscos

Os riscos deste estudo são, basicamente, os possíveis eventos indesejados dos medicamentos utilizados. Além disso, existem os riscos que fazem parte dos procedimentos médicos como, por exemplo, o incômodo ao “espetar” a ponta do dedo para retirada de sangue na realização dos exames, coleta de sangue.

Coleta de sangue: Os riscos de coletar sangue são muito pequenos e podem incluir tonturas, dor, manchas arroxeadas ou infecção. Você pode esperar uma pequena dor de picada que pode durar por alguns segundos quando furar o dedo ou o braço para coletar sangue. Precisamos de um total de 30 ml de sangue (cerca de 2 colheres de sopa) para o estudo completo. Esta quantidade de sangue não é suficiente para causar anemia.

Existem riscos de danos físicos ou desconforto causado pelos remédios, incluindo dor no estômago, vômitos, diarreia, dor de cabeça, tonturas, pesadelos e dificuldade para dormir. Geralmente, estes efeitos secundários são leves e desaparecem sem tratamento. Efeitos mais graves como vômitos frequentes, erupções cutâneas graves, ou problemas cardíacos, podem ocorrer. Se isso acontecer, interromperemos o tratamento. A maioria dos pacientes não apresentam problemas, mas este estudo vai reforçar nosso conhecimento sobre a segurança desses medicamentos.

Vamos acompanhar você para verificar se ocorrem efeitos secundários quando você toma os remédios. Se você se sentir mal ou ficar doente quando voltar para casa, você deve comunicar a equipe de saúde imediatamente para ser avaliado (a), mesmo que não tenha sido convidado a voltar no mesmo dia.

Custos a você

Sua participação neste estudo não ocasionará em custos adicionais para você. Você não receberá nenhum pagamento para participar.

Benefícios

A participação do estudo poderá implicar em benefícios como a maior chance de tomar o medicamento de forma adequada. Esse benefício é diretamente relacionado a uma maior chance de sucesso do tratamento e a consequente cura da malária.

Confidencialidade

Os seus dados são confidenciais. Apenas algumas pessoas podem ver os registros e vir a ter acesso ao seu histórico médico, que inclui o Comitê de Ética e Pesquisa, a equipe do estudo, os monitores do estudo, as empresas farmacêuticas que patrocinam o estudo – e seus representantes, desde que haja a concordância do seu médico responsável e do pesquisador principal, assim como da autoridade responsável e respeitados as regulamentações do Código de Ética do Conselho Federal de Medicina, as resoluções do mesmo órgão sobre auditorias médicas e a legislação brasileira que visam proteger o sujeito da pesquisa.

Direitos dos pacientes

Sua participação neste estudo é completamente voluntária. Você poderá decidir se quer participar ou se quer se afastar a qualquer momento. Sua decisão não terá qualquer impacto na participação em outros estudos e não resultará em nenhuma penalidade ou perda dos benefícios aos quais você teria direito. Você ainda poderá receber os medicamentos para tratar a malária externamente a este estudo.

3. 

Este projeto foi revisado e aprovado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, do Brasil para assegurar a proteção do bem-estar e dos direitos humanos dos envolvidos que participam neste estudo.

Por favor, selecione uma das caixas abaixo para indicar se você permite armazenar amostras para posteriores estudos e envio para outros estados dentro do território nacional (Brasil).

() SIM, EU dou permissão para armazenamento das amostras colhidas para este e posteriores estudos realizados dentro do território nacional (Brasil).

() NÃO, EU não dou permissão para armazenamento das amostras colhidas para este e posteriores estudos realizados dentro do território nacional (Brasil).

Contatos

Se você tiver perguntas ou dúvidas sobre participação no estudo mais tarde, pode falar com nossa equipe. As ligações podem ser realizadas em telefonema a cobrar.

A qualquer momento, em caso de dúvidas a respeito do estudo, você pode entrar em contato com:

Dr. Dhélio Batista Pereira (Tel. 69 3216-5442)

Dr. Mauro Shugiro Tada (Tel. 69 3216-5442)

Concordo em participar como voluntário do Estudo de avaliação de eficácia e segurança de tratamentos baseados em derivados da artemisinina para malária por Plasmodium vivax não complicada. Fui devidamente informado (a) e esclarecido pelo pesquisador sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Nome do participante: _____

Data: _____

Assinatura do participante/responsável: _____

RG: _____

Responsável pelo

recrutamento: _____ Data: _____

Assinatura: _____

Testemunha: _____ Data: _____

Assinatura: _____

RG: _____

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CEP/CEPEM/IOCRUZ, em reunião realizada no dia 16 de Abril de 2013.

MSc, Flávia Mariano Batista
Coordenadora CEP/CEPEM

Porto Velho-RO

8.2 PREPARAÇÃO E LEITURA DE LÂMINAS - POP



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de pesquisa em Medicina tropical - CEPEM
 Laboratório de Pesquisa Clínica



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO
--

TÍTULO: CONTAGEM DIFERENCIAL, CONFEÇÃO, COLORAÇÃO PARA DETECÇÃO DE <i>PLASMODIUM</i> ssp.
--

CÓDIGO: POP 018/2.0

ÍNDICE

1	Objetivo.....	2
2	Campo de aplicação.....	2
3	Responsabilidades.....	2
3.1	Elaboração: Gerência da Qualidade.....	2
3.2	Análise Crítica: Gerência da Qualidade.....	2
3.3	Aprovação: Garantia da Qualidade e Coordenação.....	2
3.4	Treinamento: Gerência da Qualidade.....	2
3.5	Implementação: Plataforma de Pesquisa Clínica e colaboradores.....	2
4	Materiais Necessários.....	2
5	Responsabilidades.....	3
6	Coleta e Identificação das Amostras.....	3
7	Recepção das Amostras.....	3
8	Coloração.....	4
9	Armazenamento de Reagentes.....	4
10	Leitura.....	5
11	Armazenamento de Lâminas.....	8
12	Anexos.....	9
13	Distribuição.....	9
14	Referencias.....	9
15	Controle de Qualidade.....	9



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de pesquisa em Medicina tropical - CEPEM
 Laboratório de Pesquisa Clínica



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

TÍTULO: CONTAGEM DIFERENCIAL, CONFECÇÃO, COLORAÇÃO PARA DETECÇÃO DE *PLASMODIUM* spp.

**CÓDIGO:
POP 018/2.0**

1. Objetivo

Este procedimento tem o objetivo de fornecer orientações próprias e padronizadas para descrever os procedimentos para preparo, contagem diferencial, confecção, coloração, leitura e registro de resultado de lâminas para detecção de *Plasmodium* spp. utilizando gota espessa e esfregaço para os estudos e manejo de casos. De modo que todo atendimento seja de alta qualidade para a produção de resultados confiáveis e úteis durante a análise laboratorial.

2. Campo de aplicação

É aplicado nos projetos do Laboratório de Pesquisa Clínica e outros projetos do centro de Pesquisa em Medicina tropical – CEPEM. Com coletas de amostras biológicas para estudos farmacocinéticos de fármacos e metabólitos e outros.

3. Responsabilidades

3.1 Elaboração: Gerência da Qualidade

3.2 Análise Crítica: Gerência da Qualidade

3.3 Aprovação: Garantia da Qualidade e Coordenação

3.4 Treinamento: Gerência da Qualidade

3.5 Implementação: Plataforma de Pesquisa Clínica e colaboradores

4. Materiais Necessários

- Microscópico
- Lâminas
- Óleo Imersão

5. Responsabilidades

Equipe encarregada da coleta das amostras, técnicos e microscopistas, chefia do laboratório.

6. Coleta e identificação das amostras

- Proceda a coleta das lâminas e a identificação das mesmas conforme especificados no POP Coleta de amostras de punção digital.
- Confeccione uma gota espessa homogênea de 1,5 x 1,0 cm na lâmina de vidro, conforme especificado no POP Coleta de amostras de punção digital.





Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de pesquisa em Medicina tropical - CEPEM
 Laboratório de Pesquisa Clínica



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

TÍTULO: CONTAGEM DIFERENCIAL, CONFECÇÃO, COLORAÇÃO PARA DETECÇÃO DE PLASMODIUM ssp.

**CÓDIGO:
POP 018/2.0**

Uma **Ficha de registro de amostras de laboratório** será preenchida no momento da coleta da lâmina no local da coleta:

- Cada estudo tem uma diferente **Ficha de registro de amostras de laboratório a qual deve ser apropriadamente preenchida.**

7. Recepção de amostras no laboratório

- As lâminas serão levadas inicialmente para o laboratório do CEPEM onde serão devidamente coradas e será realizada a leitura rápida.
- Para leitura de densidade parasitária, as lâminas serão enviadas ao laboratório da Gerência de Malária junto com:
 - O registro de amostra de laboratório para cada paciente
 - Os formulários de resultados de leitura de lâmina (primeira e segunda leitura) para cada paciente.
- Quando as amostras chegarem ao laboratório, a pessoa encarregada da recepção checará se todas as amostras registradas na **Ficha de registro de amostras de laboratório** foram entregues.
- A entrada das amostras no laboratório será registrada de acordo com os procedimentos de cada laboratório (específico para cada local).
- A **Ficha de registro de amostras de laboratório** será arquivada.
- Após a recepção, caso não seja realizada a leitura da densidade parasitária no mesmo momento da chegada, estas serão armazenadas conforme procedimento descrito.

8. Coloração

8.1. Reagentes

Azul de metileno fosfatado
 Solução alcoólica de Giemsa estoque
 Solução alcoólica de Giemsa diluída 1:10
 Água tamponada

8.2 Preparação

Azul de metileno fosfatado

Azul de metileno medicinal em pó	${}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}$	200 mg
Fosfato de sódio monobásico	NaH_2PO_4	600 mg
Fosfato de potássio bibásico	K_2HPO_4	200 mg
Água destilada	H_2O	250 mL

Filtrar para retirar as impurezas

Solução alcoólica de Giemsa estoque

Corante Giemsa em pó	$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{ClN}_3\text{S}$	750 mg
Álcool metílico PA	CH_3OH	65 mL
Glicerina PA	$\text{CH}_2(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$	35 mL

Agitar bem (várias vezes por dia) em garrafa contendo pérolas de vidro.



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de pesquisa em Medicina tropical - CEPEM
 Laboratório de Pesquisa Clínica



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

TÍTULO: CONTAGEM DIFERENCIAL, CONFECÇÃO, COLORAÇÃO PARA DETECÇÃO DE *PLASMODIUM* ssp.

**CÓDIGO:
POP 018/2.0**

Manter o recipiente tampado em forma de estoque.
 Filtrar quando necessário.

Solução alcoólica de Giemsa diluída 1:10

Solução alcoólica de Giemsa estoque	1 gota
Água tamponada	1mL

Água tamponada

Fosfato bibásico de sódio	Na ₂ HPO ₄	6 g
Fosfato monobásico de potássio	KH ₂ PO ₄	4 g

Misturar em gral de porcelana.
 Diluir 1 g da mistura em 1000 mL de água destilada.

9. Armazenamento dos reagentes

Os reagentes utilizados nesse procedimento devem ser armazenados em temperatura ambiente.

9.1. Procedimentos no caso de gota espessa

1ª fase: Desemoglobinização pela solução hipotônica de azul de metileno.

- Aplicar a solução de azul de metileno fosfatado sobre a gota espessa de sangue, por três segundos.
- Enxaguar a lâmina com água tamponada (sem jato forte).

2ª fase: Coloração pela solução de Giemsa para coloração da gota espessa.

- As lâminas devem ser coradas dentro de 72 horas com uma solução de Giemsa a 10% com água tamponada.
- Colocar a lâmina com o lado da gota voltada para a superfície da placa de coloração.
- Preparar uma solução de Giemsa na proporção de uma gota de corante para 1ml (1 gota) de água tamponada. Homogeneizar
- Aplicar esta solução na placa côncava de coloração, sob a lâmina invertida.
- Deixar corar por 10 minutos.
- Enxaguar com água da torneira (sem jato forte).
- Secar ao calor suave ou sob ventilação.

9.1.1 Procedimento coloração do esfregaço método Giemsa

- Fixar o esfregaço com álcool metílico por um minuto.
- Deixar secar.
- Colocar a lâmina invertida sobre a placa de coloração.
- Despejar a diluição do corante de Giemsa na proporção de uma gota do corante para 1ml de água tamponada.
- Deixar corar por 20 a 30 minutos.
- Enxaguar com jato forte de água da torneira.



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de pesquisa em Medicina tropical - CEPEM
 Laboratório de Pesquisa Clínica



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

TÍTULO: CONTAGEM DIFERENCIAL, CONFECÇÃO, COLORAÇÃO PARA DETECÇÃO DE *PLASMODIUM* ssp.

**CÓDIGO:
POP 018/2.0**

- Secar ao calor suave ou sob ventilação.
- 9.1.2 **Montagem das lâminas** (no caso da leitura da densidade parasitária não for realizada no mesmo dia da coloração, realizar a montagem, como segue):
 - Pingar duas a três gotas de Entelan® em cada lâmina.
 - Colocar uma lamínula sobre as gotas.
 - Deixar secar sob temperatura ambiente.
- 9.1.3 **Controle de qualidade da coloração de lâminas**
 - A solução de Giemsa deve ser controlada antes do uso. Isto é realizado preparando a solução de Giemsa 1:10 que será usada e corando uma lâmina sabidamente positiva. Não deve haver coloração das hemácias.
 - Cada nova preparação de Giemsa deve ser submetida a controle de qualidade.
 - O tampão de pH deve ser checado utilizando pH ou fita, estando o pH a 7,2. O pH deve ser ajustado se necessário. O tampão deve ser analisado ao menos cada duas semanas se for preparado em grandes quantidades.

10. Leitura

- Antes do início da contagem, o equivalente a 0,25 µl de sangue (aproximadamente 100 campos utilizando uma ocular de 10X e uma objetiva de 100X) deverá ser examinado para determinar a espécie do parasita e estágios que possam estar presentes.
- Coloque uma gota de óleo de imersão sobre a lamínula.
- Ligue o microscópio. Cheque a presença de ocular de 10X.
- Com o condensador elevado, a lâmina corada é colocada no suporte e a fonte de luz é ajustada visibilizando pela ocular e pela objetiva de 100X.
- Ao mover lentamente a objetiva de imersão, uma camada de óleo será formada entre a lâmina e a lente. O ajuste fino é usado para focar o campo; a lente não deve tocar a lâmina.
- O exame microscópico deve ser sistemático e padronizado. Ele deve iniciar pela extremidade esquerda da lâmina. A leitura é iniciada da periferia do campo e termina no centro. Quando o campo está lido, move-se a lâmina longitudinalmente para examinar os campos adjacentes. Move-se a lâmina verticalmente para que outra fileira/largura seja lida. Há cerca de 100 campos em um eixo de 2 cm da lâmina;
- No início será realizada a leitura rápida das lâminas para guiar o tratamento e, após, será feita a quantificação da densidade parasitária para determinar o resultado final.

10.1 Leitura rápida

- As lâminas serão lidas imediatamente após a coleta para guiar o tratamento. Tal leitura será realizada tanto no posto de saúde / hospital, quanto para as lâminas que sejam levadas diretamente para o laboratório.
- A leitura rápida será realizada conforme a prática padrão em cada centro.



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de pesquisa em Medicina tropical - CEPEM
 Laboratório de Pesquisa Clínica



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

TÍTULO: CONTAGEM DIFERENCIAL, CONFECÇÃO, COLORAÇÃO PARA DETECÇÃO DE *PLASMODIUM ssp.*

**CÓDIGO:
POP 018/2.0**

- Os resultados da leitura rápida serão transcritos no formulário apropriado de cada estudo

10.2. Leitura da densidade parasitária: parasitos por μ l

- Uma vez coradas, as lâminas serão colocadas em caixas e distribuídas com o formulário de primeira leitura de lâmina ao microscopista que realizará a primeira leitura.
- Para contagem de parasitos e leucócitos separadamente, dois contadores devem ser usados, um para as formas assexuadas do parasito e outro para os leucócitos. Caso detecte-se infecção mista, um outro contador deverá ser utilizado para a contagem de formas da outra espécie.
- Determinando uma lâmina como negativa**
 - O microscopista contará parasitas até alcançar 500 leucócitos. Se nenhum parasita tiver sido encontrado, uma vez que 500 leucócitos tiverem sido contados, a lâmina será considerada negativa.
- Caso sejam vistas formas assexuadas de *Plasmodium ssp.***
 - O microscopista contará parasitas até que o mínimo de 500 leucócitos ou 500 parasitas seja alcançados (qualquer um que ocorrer primeiro).
 - Se nenhum parasita tiver sido encontrado, uma vez que 500 leucócitos tiverem sido contados, a lâmina será considerada negativa.
 - A contagem de parasitos ou leucócitos não será interrompida até que o campo inteiro seja lido.
 - Este método será usado tanto para infecções únicas ou mistas por *Plasmodium*. No segundo caso, os parasitas de cada espécie deverão ser contados separadamente.
 - A contagem parasitária em relação à contagem de leucócitos pode ser convertida a parasitos por μ l usando a seguinte fórmula matemática:

$$\text{N}^\circ \text{ de parasitos} \times 6000 / \text{N}^\circ \text{ de leucócitos} = \text{parasitos por } \mu\text{l}$$

- Esta fórmula será calculada para cada espécie de parasito encontrada.
- Caso o número de leucócitos para cada participante seja conhecido, a densidade pode ser calculada mais precisamente com a seguinte fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de parasitos} \times \text{N}^\circ \text{ de leucócitos reais} / \text{N}^\circ \text{ de leucócitos} = \text{parasitos por } \mu\text{l}$$

- A contagem de gametócitos será feita de forma específica para cada espécie.
- Após a primeira leitura, as lâminas serão mantidas na mesma ordem na bandeja ou caixa para serem lidas posteriormente por outro microscopista. As lâminas serão entregues conjuntamente com o formulário de segunda leitura de lâmina ao microscopista que realizará a segunda leitura, assegurando-se que não seja a mesma pessoa que realizou a primeira leitura e que esta pessoa não tenha acesso aos resultados no formulário de primeira leitura de lâmina.

COPIA CONTROLADA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de pesquisa em Medicina tropical - CEPEM
 Laboratório de Pesquisa Clínica



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

TÍTULO: CONTAGEM DIFERENCIAL, CONFECÇÃO, COLORAÇÃO PARA DETECÇÃO DE PLASMODIUM ssp.

**CÓDIGO:
POP 018/2.0**

10. 3. Registro dos resultados

- O microscopista registrará os resultados da leitura em μl nos formulários de primeira e segunda leitura de lâmina. A primeira seção do formulário, incluindo a etiqueta de identificação da amostra, já haverá sido preenchida no momento da coleta da amostra. A seção de Resultados será preenchida pelo microscopista com a seguinte informação:
 - Caso a lâmina for negativa, o número de campos examinados será registrado (deve ser 200) e o número de parasitos deverá ser 0 para todas as espécies.
 - Caso a lâmina for positiva, o número de leucócitos contados e o número de formas assexuadas de parasitos contados para cada espécie deverão ser registrados.
 - O número de gametócitos para cada espécie também deverá ser registrado.
 - Caso a lâmina não possa ser lida, o motivo deverá ser registrado (não encontrada, quebrada, má qualidade).
 - O microscopista assinará e datará o formulário com a data da leitura e registrará seu código do estudo.
 - O microscopista que realizar a primeira leitura registrará os resultados no formulário de primeira leitura de lâmina e o que realizar a segunda leitura registrará os resultados no formulário de segunda leitura de lâmina
 - Os formulários **Resultado de primeira leitura** e **Resultado de segunda leitura** serão enviados diariamente ao centro de registro de dados para serem inseridos nas bases de dados. Tais formulários serão então armazenados pelos investigadores.

10.4 - Cálculo da densidade parasitária e controle de qualidade interna

- Todas as lâminas serão lidas duas vezes independentemente e os resultados registrados em diferentes formulários de resultados de leitura de lâmina (primeira e segunda leituras), que serão inseridos nas bases de dados.
- As lâminas que caírem nos seguintes critérios deverão ser lidas uma terceira vez (Figura 1):
 - Uma lâmina é negativa e uma lâmina é positiva
 - Ambas as lâminas positivas, mas há >50% de discordância na densidade em 2 leituras.
- No laboratório a lâmina será retirada da posição na caixa correspondente e será lida a terceira vez por um microscopista diferente.
- O microscopista que realiza a terceira leitura registrará os resultados no impresso, que será então devolvido ao centro de dados e inserido nas bases de dados.
- O resultado definitivo (após a segunda leitura se há concordância ou após a terceira leitura se houve discordância entre as duas primeiras leituras) será calculado como segue abaixo:



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de pesquisa em Medicina tropical - CEPEM
 Laboratório de Pesquisa Clínica



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

TÍTULO: CONTAGEM DIFERENCIAL, CONFECÇÃO, COLORAÇÃO PARA DETECÇÃO DE *PLASMODIUM* ssp.

**CÓDIGO:
POP 018/2.0**

- Se as duas leituras são negativas, o resultado final será negativo.
- Se as duas lâminas são positivas e haja concordância, o resultado final será a média geométrica das duas leituras.
- Se uma leitura seja positiva e a outra negativa e a terceira leitura é positiva, o resultado final será a média geométrica das duas densidades positivas. Se a terceira leitura é negativa, o resultado final será negativo.
- Se as três leituras são positivas, o resultado final será a média geométrica das duas leituras com densidades mais próximas.
- Todos os resultados de leituras de lâminas serão armazenados pelos investigadores.

11. Armazenamento das lâminas

- As lâminas serão levadas a um(a) técnico(a) de laboratório designado(a). Este deverá conferir conjuntamente com o investigador que as trouxe a presença das lâminas e o correto preenchimento dos formulários correspondentes.
- Em seguida uma das lâminas (2ª lâmina) deverá ser armazenada nas caixas apropriadas, sendo o local da lâmina registrado nos formulários de **Resultado de primeira leitura de lâmina e Resultado de segunda leitura de lâmina**. As caixas serão numeradas à medida que forem preenchidas. As datas das lâminas que ocuparem a primeira e a última posição em cada caixa deverão estar escritas no exterior da caixa.
- A partir do registro da posição das lâminas nas caixas, o microscopista retirará as lâminas à medida que realizar as leituras de densidade parasitária.
- O segundo microscopista deverá atentar para o número da caixa e a posição da lâmina detalhados na ficha de **Resultado de segunda leitura de lâmina** para recolocar a lâmina na posição correta após a leitura.
- As duas leituras (primeira e segunda leitura) serão feitas na primeira das lâminas, e por microscopistas diferentes.
- Caso uma terceira leitura seja necessária, a lâmina será retirada da caixa e colocada novamente na mesma posição quando a terceira leitura for encerrada.
- A segunda lâminas será mantida numa caixa de lâminas similar a caixa onde estarão guardadas as primeiras lâminas e serão também posicionadas e armazenadas no laboratório, sendo usadas apenas no caso de perda ou quebra da primeira lâmina. As datas das lâminas que ocuparem a primeira e a última posição em cada caixa deverão estar escritas no exterior da caixa. As segundas lâminas se posicionam também na sua caixa como no caso das primeiras lâminas, mas só será usada se for necessário.
- As caixas de armazenamento devem ser mantidas num local trancado no laboratório, sob condições apropriadas de temperatura e umidade e protegidas de luz direta.

12. Anexos

há documentos anexos (Resumo da determinação final da parasitemia pag. 10).



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de pesquisa em Medicina tropical - CEPEM
 Laboratório de Pesquisa Clínica



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

TÍTULO: CONTAGEM DIFERENCIAL, CONFECÇÃO, COLORAÇÃO PARA DETECÇÃO DE *PLASMODIUM ssp.*

**CÓDIGO:
POP 018/2.0**

13. Distribuição

Sala de processamento de amostras Biológicas - 01

14. Referências

- Protocolo do Estudo PCL 05/11
- Boas Práticas Clínicas, Documento das Américas
- MS- Ministério da Saúde
- WHO manual for malaria diagnostic in developing countries.
- Diagnoses and management of severe falciparum malaria. WHO/CDS/CPE/SMT/2000.4
- Diagnostic procedures for blood specimens. Diagnostic for Parasitic Diseases, CDC, Atlanta.
- Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde; 2005.

15. CONTROLE DE QUALIDADE

Título	Contagem diferencial, confecção, coloração e leitura de lâminas para detecção de <i>Plasmodium ssp.</i>
Escrito por	Élison Carvalho Souto e Rosilene Ruffato
Revisado por:	Francisco Lurdevanhe S. Rodrigues 03.02.2013
Aprovado por Data & assinatura	



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de pesquisa em Medicina tropical - CEPEM
 Laboratório de Pesquisa Clínica



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	
TÍTULO: CONTAGEM DIFERENCIAL, CONFEÇÃO, COLORAÇÃO PARA DETECÇÃO DE <i>PLASMODIUM</i> ssp.	CÓDIGO: POP 018/2.0

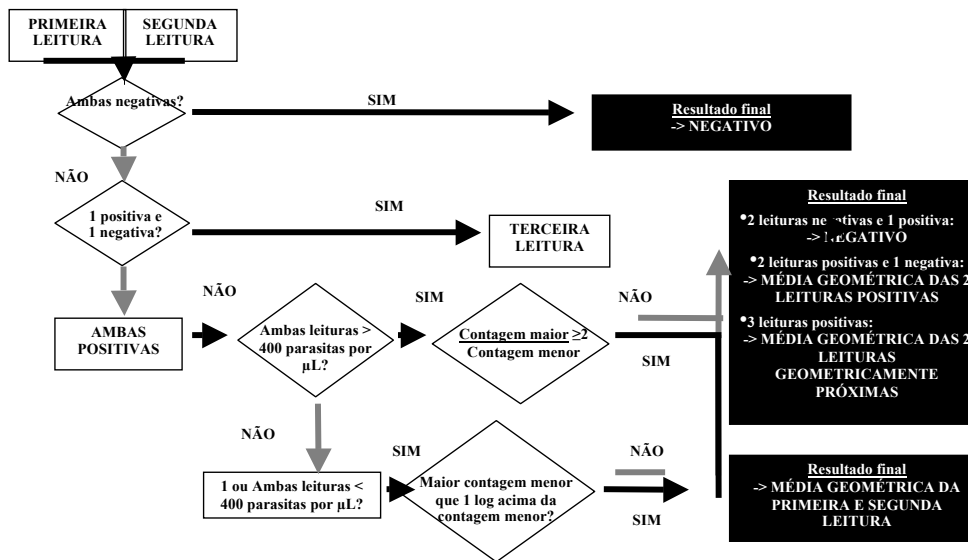
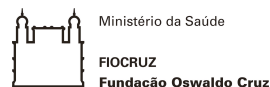


Figura 1. Resumo da determinação final de parasitemia

8.3 GRADUAÇÃO DE GRAVIDADE DE EVENTO ADVERSO E DIRETRIZES PARA A GRADUAÇÃO DE ACHADOS EM EXAMES FÍSICOS



Anexo II

Tabela de Classificação da Intensidade de Eventos Adversos

Esta tabela tem o objetivo de descrever a terminologia a ser usada no relatório de eventos adversos. Uma escala de classificação (intensidade) é fornecida para cada evento adverso. Para qualquer evento adverso que ocorra, uma escala deve ser atribuída. A classificação deve ser atribuída de acordo com as normas especificadas aqui. Um relatório de evento adverso deve ser preenchido para todos os eventos adversos sérios (EAS). Todos os graus 4 ou 5, e quaisquer eventos adversos de grau 3 em destaque em cinza abaixo.

1. Comentários relativos a utilização destas tabelas

- Tabelas de toxicidade padronizadas e freqüentemente utilizadas (Critérios de Toxicidade Comuns do Instituto Nacional do Câncer (NCI) e da Organização Mundial da Saúde (OMS).

2. Abreviaturas: abreviaturas utilizadas na tabela:

LSN = Limite Superior do Normal

LIN = Limite Inferior do Normal

R_x = Terapia

Nec = Necessário

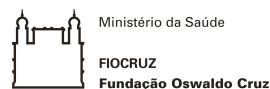
Mod = Moderado

IV = Intravenoso

AVD = Atividades da Vida Diária

Dim = Diminui

Estudo de avaliação de eficácia e segurança de tratamentos baseados em derivados da artemisinina para tratamentos de malária por *Plasmodium vivax* não complicada



3. Estimativa de grau de gravidade

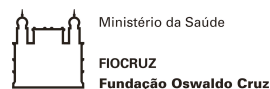
Para anomalias não encontradas em outros lugares na tabela de toxicidade, use a escala abaixo para estimar o grau de gravidade:

GRAU 1	Leve	Desconforto transitório ou leve (<48 horas), sem intervenção médica/terapia necessária
GRAU 2	Moderado	Limitação leve a moderada da atividade - alguma assistência pode ser necessária, nenhuma ou mínima intervenção médica/terapia necessária
GRAU 3	Sério	Limitação marcada da atividade, geralmente algum tipo de assistência necessária; intervenção médica/terapia necessária, possíveis internações
GRAU 4	Risco de morte	Limitação extrema da atividade, assistência significativa exigida; intervenção médica significativa/terapia necessária, a internação ou cuidados paliativos provável
GRAU 5	Morte	

4. EAs sérios e potencialmente fatais

QUALQUER evento clínico considerado sério ou com risco de morte pelo clínico deve ser considerado um evento de grau 4. Os eventos clínicos considerados graves ou potencialmente fatais incluem, mas não estão limitados a: convulsões, coma, tetania, cetoacidose diabética, coagulação intravascular disseminada, petéquias difusas, paralisia, psicose aguda, depressão grave.

Estudo de avaliação de eficácia e segurança de tratamentos baseados em derivados da artemisinina para tratamentos de malária por *Plasmodium vivax* não complicada



Texto em negrito e destaque cinza na tabela indica um EA que deve ser relatado como um EAS.

Item	Grau 1 toxicidade (leve)	Grau 2 toxicidade (moderado)	Grau 3 toxicidade (severo)	Grau 4 toxicidade (risco de morte)
HEMATOLOGIA				
Hemoglobina	9.5 - 10.5 gm/dl	8.0 - 9.4 gm/dl	6.5 - 7.9 gm/dl	< 6.5 gm/dl
Contagem absoluta de neutrófilos	1000-1500/mm ³	750-999/mm ³	500-749/mm³	<500/mm ³
Plaquetas	75000-99000/mm ³	50000-74999/mm ³	20000-49000/mm³	<20000/mm ³
O tempo de protrombina (tp)	1.01 - 1.25 x uln	1.26-1.5 x uln	1.51 -3.0 x uln	>3 x uln
Tromboplastina parcial ativada (TPA)	1.01 -1.66 x uln	1.67 - 2.33 x uln	2.34 - 3 x uln	> 3 x uln
Fibrinogênio	0.75 - 0.99 x lln	0.50 - 0.74 x lln	0.25 - 0.49 x lln	< 0.25 x lln
Produto da degradação da Fibrina	20-40 mcg/ml	41-50 mcg/ml	51-60 mcg/ml	> 60 mcg/ml
Metemoglobina	5 - 9.9 %	10.0 - 14.9 %	15.0 - 19.9%	> 20 %
Cid (coagulação intravascular disseminada) *		Os resultados do laboratório sem sangramento	Os resultados laboratoriais e sangramento	Os resultados do laboratórios, com risco de morte ou consequências incapacitantes (por exemplo, hemorragia CNS, lesão de órgão ou hemodinamicam

Estudo de avaliação de eficácia e segurança de tratamentos baseados em derivados da artemisinina para tratamentos de malária por *Plasmodium vivax* não complicada



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

				ente significativa perda de sangue)
ENZIMAS HEPÁTICAS				
Ast (sgot)	1.25 - 2.5 x uln	2.6 - 5 x uln	5.1 - 10 x uln	> 10 x uln
Alt (sgpt)	1.25 - 2.5 x uln	2.6 - 5 x uln	5.1 - 10 x uln	> 10 x uln
Ggt	1.25 - 2.5 x uln	1.6 - 5 x uln	5.1 - 10 x uln	> 10 x uln
Fosfatase alcalina	1.25 - 2.5 x uln	1.6 - 5 x uln	5.1 - 10 x uln	> 10 x uln
Amilase	1.1 - 1.5 x uln	1.6 - 2.0 x uln	2.1 - 5.0 x uln	> 5.1 x uln
Pancreatite *	Assintomática, a elevação da enzima e/ou achados radiológicos	Sintomático, intervenção médica indicada	Radiologia intervencionista ou intervenção cirúrgica indicada	Consequências risco de morte (por exemplo, insuficiência circulatória, hemorragias, sepse)
QUÍMICAS				
Hiponatremia	130-135 meq/l	123-129 meq/l	116-122 meq/l	< 116 ou alterações do estado mental ou convulsões
Hipernatremia	146-150 meq/l	151-157 meq/l	158-165 meq/l	> 165 meq/l ou alterações do estado mental ou convulsões
Hipocalemia	3.0 - 3.4 meq/l	2.5 - 2.9 meq/l	2.0 - 2.4 meq/l	< 2.0 meq/l
Hipercalemia	5.6 - 6.0 meq/l	6.1 - 6.5 meq/l	6.6 - 7.0 meq/l	> 7.0 meq/l ou arritmia risco de morte
Hipoglicemia	55-64 mg/dl	40-54 mg/dl	30-39 mg/dl	<30 mg/dl ou

Estudo de avaliação de eficácia e segurança de tratamentos baseados em derivados da artemisinina para tratamentos de malária por *Plasmodium vivax* não complicada

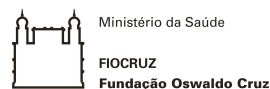


Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

				alterações do estado mental ou coma
Hiperglicemia (anote se em jejum)	116 - 160 mg/dl	161- 250 mg/dl	251 - 500 mg/dl	> 500 mg/dl ou cetoacidose ou convulsões
Hipocalcemia (correto para albumina)	8.4 - 7.8 mg/dl	7.7 - 7.0 mg/dl	6.9 - 6.1 mg/dl	< 6.1 mg/dl arritmia risco de morte ou tetania
Hipercalcemia (correto para albumina)	10.6 - 11.5 mg/dl	11.6 - 12.5 mg/dl	12.6 - 13.5 mg/dl	> 13.5 mg/dl arritmia risco de morte
Hipomagnesemia	1.4 - 1.2 meq/l	1.1 - 0.9 meq/l	0.8 - 0.6 meq/l	< 0.6 meq/l arritmia risco de morte
Hipofosfatemia	2.0 - 2.4 mg/dl	1.5 -1.9 mg/dl or replacement rx required	1.0 -1.4 mg/dl	< 1.0 mg/dl ou arritmia risco de morte
Hiperbilirrubinemia	1.1 - 1.5 x uln	1.6 - 2.5 x uln	2.6 - 5 x uln	> 5 x uln
Uréia	1.25 - 2.5 x uln	2.6 - 5 x uln	5.1 - 10 x uln	> 10 x uln
Creatinina	1.1 x 1.5 x uln	1.6 - 3.0 x uln	3.1 - 6 x uln	> 6 x uln ou diálise necessária
Lipase*	>uln - 1.5 x uln	>1.5 - 2.0 x uln	>2.0 - 5.0 x uln	>5.0 x uln
URINÁLISE				
Proteinúria	1+ or < 0.3% or <3g/l or 200 mg - 1 gm perda/dia	2 -3 + or 0.3 - 1.0% or 3-10 g/l 1- 2 gm perda/dia	4+ or > 1.0% or > 10 g/l	A síndrome nefrótica ou >3/5gm perda/dia
Hematuria	Microscópica só	Grosso, sem coágulos	Grosso	Transfusão obstrutiva ou

Estudo de avaliação de eficácia e segurança de tratamentos baseados em derivados da artemisinina para tratamentos de malária por *Plasmodium vivax* não complicada



			+coágulos	necessária
DISFUNÇÃO CARDÍACA				
O ritmo cardíaco		Assintomático, sinais transitórios, rx não necessário	Recorrente / persistente; rx não necessário	Tratamento necessário
Hipertensão	Incremento transitório > 20 mm; não rx	Recorrente, crônico, > 20 mm, rx necessário	Rx aguda necessário, não internação	Internação necessária
Hipotensão	Hipotensão ortotástica transitória	Sintomas corrigíveis com flúidos orais rx	Flúidos IV necessário; hospitalização não necessária	Internação necessária
Pericardite	Efusão mínima	Efusão leve/moderado assintomático, não rx	Effusão sintomático; dor; mudanças no ekg	Tamponamento; pericardiocentese ou cirurgia necessária
Hemorragia, perda de sangue	Microscópica/oculto	Leve, sem transfusão	Perda de sangue grossa; 1-2 unidades transfundidas	Perda maciça de sangue;> 3 unidades transfundidas
Intervalo prolongado de qtc*	Qtc >0.45 - 0.47 second	Qtc >0.47 - 0.50 segundo; >=0.06 segundo acima da basal	Qtc >0.55 segundo	Qtc >0.55 segundo; sinais ou sintomas potencialmente fatais (por exemplo, arritmias, ICC, hipotensão,

Estudo de avaliação de eficácia e segurança de tratamentos baseados em derivados da artemisinina para tratamentos de malária por *Plasmodium vivax* não complicada

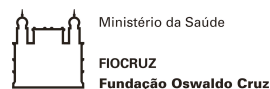


Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

				síncope choque); torsades de pontes
RESPIRATÓRIO				
Tosse	Transitório- não rx	Tosse associada com o tratamento; rx local	Descontrolada	
Broncoespasmo, aguda	Transitório; não rx < 80% - 70% VEF 1 (ou pico de fluxo)	Requer rx normaliza com broncodilatador; fev1 50% - 70% (ou pico de fluxo)	Sem normalização com broncodilatador	Cianose: fev1 < 25% (ou pico de fluxo) or intubado
Síndrome da angústia respiratória do adulto*			Presente, intubação não indicada	Presente, intubação indicada
Hipoxia*		Diminuição da saturação de o(2) com exercício (por exemplo, oxímetro de pulso <88%), oxigênio suplementar intermitente	Diminuição da saturação de o(2)em repouso; oxigênio contínuo indicado	Risco de morte; intubação ou ventilação indicado
Efusão pleural (não-maligna) *	Assintomatica	Sintomático, intervenção tais como diuréticos ou até 2 Toracocenteses terapêuticas indicadas	Sintomático e de oxigênio suplementar,> 2 toracocenteses terapêuticas, drenagem, ou pleurodese indicado	Risco de morte (por exemplo, causando instabilidade hemodinâmica ou suporte ventilatório indicado)

Estudo de avaliação de eficácia e segurança de tratamentos baseados em derivados da artemisinina para tratamentos de malária por *Plasmodium vivax* não complicada



Pneumonite / infiltrado pulmonar*	Assintomáticos, apenas achados radiológicos	Sintomático, não interferindo com a AVD	Sintomático, interferindo com a AVD; o(2) indicado	Risco de morte; suporte ventilatório indicado
GASTROINTESTINAL				
Estomatite	Desconforto leve, não limites na atividade	Alguns limites de comer/beber	Comer/falar muito limitado	Requer fluidos IV
Náuseas	Desconforto leve, consumo razoável mantido	Desconforto moderado; consumo diminuiu significativamente; alguma atividade limitada	Desconforto grave, nenhuma entrada significativa; atividades limitadas	Consumo de líquidos mínimos
Vômitos	Emesis transitório	Vômitos ocasionais/moderados	Hipotensão ortostática ou necessários fluidos IV	Choque hipotensivo ou hospitalização necessário para terapia com fluidos IV
Obstipação	Leve	Moderado	Grave	Distensões com vômitos
Diarréia	3-4 fezes moles transitórios/dia	5-7 fezes moles/dia	Hipotensão ortostática ou > 7 fezes moles/dia ou necessários fluidos IV	Choque hipotensivo ou necessário internação para terapia com flúido IV

Estudo de avaliação de eficácia e segurança de tratamentos baseados em derivados da artemisinina para tratamentos de malária por *Plasmodium vivax* não complicada

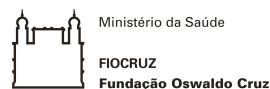


Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

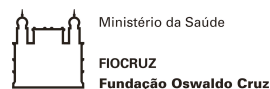
Dor abdominal *	Dor leve que não interfere com a função	Dor moderada, dor ou analgésicos interferindo com a função, mas não interferir com a AVD	Dor severa, dor ou analgésicos interferindo gravemente com a AVD	Incapacitante
Anorexia*	Perda de apetite sem alteração nos hábitos alimentares	Consumo oral alterado sem perda significativa de peso ou desnutrição; suplementos nutricionais orais indicados	Associada com perda significativa de peso ou desnutrição (por exemplo, insuficiência calórica oral e/ou a consumo de líquidos); fluidos IV, alimentação enteral ou NPT indicada	Conseqüências de risco de morte
NEURO & NEUROMUSCULARES				
Neuro-cerebelar	Disdiadococinesia leve incoordenação	Tremor de intenção, dismetria, fala atrapalhada, nistagmo	Ataxia locomotor se associado aos sinais físicos e persistentes de danos cerebelares	Incapacitante
Humor	Ansiedade leve ou depressão	Ansiedade ou depressão moderada e terapia necessária	Ansiedade grave ou mania ou depressão	Psicose aguda; incapacitação, requer

Estudo de avaliação de eficácia e segurança de tratamentos baseados em derivados da artemisinina para tratamentos de malária por *Plasmodium vivax* não complicada



	Ansiedade moderada ou depressão		associada com indicadores biológicos ou idéias suicidas; necessidade de assistência	internação
Controle neuro	Dificuldade leve de concentração; não Rx; confusão leve/agitação; AVD afetadas	Confusão moderado/agitação alguma limitação da AVD; Rx mínimo	Confusão grave/agitação; precisa de assistência para a AVD; terapia necessária	Psicose tóxica; internação
Força muscular	Fraqueza subjetiva sem sintomas objectivos/sinais	Sinais objetivos leves/sintomas não diminuem em função	Fraqueza objetiva; funções limitadas	Paralisia
Tontura *	Com os movimentos da cabeça ou nistagmo apenas, não interfere com a função	Interfere com a função, mas não interfere com a AVD	Interfere com AVD	Incapacitante
Ataques*		Um ataque generalizado breve; ataque(s) bem controlados pelos anticonvulsivantes ou ataques infreqüentes de motor focal não interfere com a AVD	Ataques em que a consciência é alterada; desordem de convulsões mal controlada, com o avanço de ataques generalizados, apesar da	Ataques de qualquer tipo que são prolongados, repetitivos ou de difícil controle (por exemplo, estado epiléptico, epilepsia de difícil controle)

Estudo de avaliação de eficácia e segurança de tratamentos baseados em derivados da artemisinina para tratamentos de malária por *Plasmodium vivax* não complicada



			intervenção médica	
Sonolência/depressão do nível de consciência*		Sonolência ou sedação interferindo com a função, mas não interfere com a AVD	Obnubilação ou estupor; difícil de despertar; interferir com AVD	Coma
Encefalopatia *		Sinais ou sintomas leves, não interferindo com a AVD	Sinais ou sintomas interferindo AVD; internação indicada	Risco de morte; incapacitante
Síncope (desmaio)*			Presente	Consequentes risco de morte
OUTROS PARÂMETROS				
Febre: oral, > 12 horas	37.7 - 38.5 c ou 100.0 - 101.5 f	38.6 - 39.5 c ou 101.6 - 102.9 f	39.6 - 40.5 c ou 103 - 105 f	> 40 c ou > 105 f
Dor de cabeça	Leve, Sem terapia de Rx	Transitório, moderado; necessário Rx	Grave; responde à terapia narcótica inicial	Intratável; necessário repetir a terapia narcótica
Fadiga	Não diminuição no AVD	Atividade normal diminui 25- 50%	Atividade normal diminui 50%; não pode trabalhar	Incapaz de autocuidar
Reação alérgica	Prurido sem erupção da pele	Urticária localizada	Urticária generalizada, angioedema	Anafilaxia
Reação local	Sensibilidade ou	Induração <10 cm ou	Induração > 10	Necrose

Estudo de avaliação de eficácia e segurança de tratamentos baseados em derivados da artemisinina para tratamentos de malária por *Plasmodium vivax* não complicada



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

	eritema	flebite ou inflamação	cm ou ulceração	
Mucocutânea	Eritema, prurido	Difusa, exantema máculo papular, Descamação seca	Vesiculação, altitude, descamação húmida, ou ulceração	Dermatite esfoliativa, envolvimento das mucosas ou eritema, Stevens-Johnson multiforme ou suspeita ou necrose requerendo cirurgia
Insônia *	Dificuldade ocasional de dormir, não interferindo com a função	Dificuldade de dormir, interferindo com a função, mas não interfere com a AVD	Dificuldade de dormir freqüente, interferindo com a AVD	Incapacitante
Zumbido *		Zumbido não interferindo com a AVD	Zumbido persistente (> 2-3 dias) interferindo com AVD	Incapacitante
Visão turva *	Sintomático, não interferindo com a função	Sintomático e de interferir com a função, mas não interfere com AVD	Sintomático e interferindo com AVD	Incapacitante

Estudo de avaliação de eficácia e segurança de tratamentos baseados em derivados da artemisinina para tratamentos de malária por *Plasmodium vivax* não complicada

8.4 CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA



GOVERNO DO ESTADO DE RONDÔNIA
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
CENTRO DE PESQUISA EM MEDICINA TROPICAL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Ofício 06/CEP/CEPEM

Porto Velho, 11 de Fevereiro de 2011.

Sr. Pesquisador

Dr. Dhélio Batista Pereira

Centro de Pesquisa em Medicina Tropical - CEPEM

Assunto: “Encaminhamento de Parecer”

Encaminhamos em anexo, o parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical, referente ao protocolo de pesquisa: “**Estudo de eficácia e segurança de um novo Co-blister de Cloroquina e Primaquina para tratamento de malária por *Plasmodium vivax* não complicada**”, Folha de Rosto SISNEP nº 399431, Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) nº 0001.0.046.000-11.

Colocamo-nos à disposição para qualquer esclarecimento.

Atenciosamente,

Dra. Carla Freire Celedonio Fernandes
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Centro de Pesquisa em Medicina Tropical –CEPEM
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos- CEP
Aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP
Av. Guaporé, 215 - Lagoa Telefone: 3219-6012 / 3216-5442
Porto Velho – RO





GOVERNO DO ESTADO DE RONDÔNIA
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
CENTRO DE PESQUISA EM MEDICINA TROPICAL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

REF.: Parecer 01/11 CEP/CEPEM
Registro CAAE: 0001.0.046.000-11

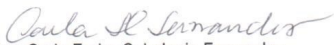
Porto Velho, 16 de Fevereiro de 2011.

Ilmo Dr. Dhélio Batista Pereira
Instituição: CEPEM

Sr. Pesquisador, em sua Primeira reunião realizada no dia 10 de Fevereiro de 2011, a Comissão de Ética do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical - CEPEM, atendendo sua solicitação, analisou o projeto sob sua responsabilidade intitulado: "**Estudo da eficácia e segurança de um novo Co-blister de Cloroquina e Primaquina para tratamento de malária por *Plasmodium vivax* não complicada**". Informo que, após análise e discussão a Comissão de Ética considerou **APROVADO**, o citado projeto.

De acordo com o item VII.13.d, da resolução CNS nº 196/96, V.Sa. deve encaminhar a nossa secretaria relatórios parcial e final do referido projeto enquanto durar a pesquisa.

Atenciosamente,


Dra. Carla Freire Celedonio Fernandes
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa



Ofício 08/CEP/CEPEM

Porto Velho, 16 de Abril de 2013.

Sr. Pesquisador

Dr. Dhélio Batista Pereira

Centro de Pesquisa em Medicina Tropical - CEPEM

Assunto: “Encaminhamento de Parecer”

Encaminhamos em anexo, o parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical, referente ao protocolo de pesquisa, anterior a Plataforma Brasil, intitulado: “**Estudo de eficácia e segurança de um novo Co-blister de Cloroquina e Primaquina para tratamento de malária por *Plasmodium vivax* não complicada**”, Folha de Rosto SISNEP nº 399431, Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) nº 0001.0.046.000-11 e que agora possui o nº do CAAE: 14687813.2.0000.0011.

Colocamo-nos à disposição para qualquer esclarecimento.

Atenciosamente,

MSc. Flávia Serrano Batista
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
Centro de Pesquisa em Medicina Tropical

Centro de Pesquisa em Medicina Tropical –CEPEM
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos- CEP
Aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP
Av. Guaporé, 215 - Lagoa Telefone: 3219-6012 / 3216-5442
Porto Velho – RO





REF.: Parecer 02/13 CEP/CEPEM
Nº do CAAE: 14687813.2.0000.0011

Porto Velho, 16 de Abril de 2013.

Ilmo. Dr. Dhélio Batista Pereira
Instituição: CEPEM

Sr. Pesquisador, em sua Quarta Reunião realizada no dia **16 de Abril de 2013**, a Comissão de Ética do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical - CEPEM, atendendo sua solicitação de modificação em projeto de pesquisa, analisou o projeto sob sua responsabilidade intitulado: **"Estudo de eficácia e segurança de um novo Co-blister de Cloroquina e Primaquina para tratamento de malária por *Plasmodium vivax* não complicada"**. Informo que, após análise e discussão a Comissão de Ética considerou **Aprovado**, as modificações constantes no relatório de modificações encaminhadas ao CEP, conforme consta em anexo.

De acordo com o item VII.13.d, da resolução CNS nº 196/96, V.Sª. deve encaminhar a nossa secretaria relatórios parcial e final do referido projeto enquanto durar a pesquisa.






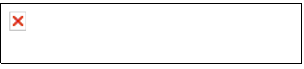
Atenciosamente,

MSc. Flávia Seryano Batista
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
Centro de Pesquisa em Medicina Tropical

8.5 APROVAÇÃO DO PROJETO NA ANVISA

Sistema de Arrecadação - Acesso - Caixa Postal

Página 1 de 2

Ministério da Saúde									
		Caixa Postal							
Institucional	Anvisa Divulga	Serviços	Áreas de Atuação						
Legislação									
									
DE: GG MED ASSUNTO: Comunicado Especial 188/2012 - 0896111125		ENVIADA EM: 05/11/2012 14:30:33							
 Gerência Geral de Medicamentos - GG MED Gerência de Avaliação da Segurança e Eficácia - GESEF COMUNICADO ESPECIAL EM PESQUISA CLÍNICA Nº 188/2012 Expediente do CE: 0896111125 Brasília, 05/11/2012 Empresa: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Prezado(a) Senhor(a), O Projeto de Pesquisa Clínica, foi analisado e aprovado por esta gerência. Considerando que o mesmo está de acordo com a RDC 39/08, bem como as demais normas que regulamentam a pesquisa clínica em nosso país, autorizamos a sua execução no(s) centro(s) abaixo especificado(s):									
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Local de Realização do Estudo</th> <th>Investigador</th> <th>Expediente</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>CENTRO DE MEDICINA TROPICAL DE RONDONIA</td> <td>DHELIO BATISTA PEREIRA</td> <td>532619112</td> </tr> </tbody> </table>		Local de Realização do Estudo	Investigador	Expediente	CENTRO DE MEDICINA TROPICAL DE RONDONIA	DHELIO BATISTA PEREIRA	532619112		
Local de Realização do Estudo	Investigador	Expediente							
CENTRO DE MEDICINA TROPICAL DE RONDONIA	DHELIO BATISTA PEREIRA	532619112							
ESTUDO Protocolo Clínico: Co-Blister Vivax Far I Processo: 25351380644201189 Expediente da Anuência: 532619112 Título do Estudo: ESTUDO DE EFICÁCIA E SEGURANÇA DE UM NOVO CO-BLISTER DE CLOROQUINA E PRIMAQUINA PARA TRATAMENTO DE MALÁRIA POR PLASMODIUM VIVAX NÃO COMPLICADA Assunto da Anuência: ENSAIOS CLÍNICOS - Anuência em Processo de Pesquisa Clínica - Medicamentos									
DESCRIÇÃO DO ESTUDO Fase do Estudo: III Medicamento / Produto: CLOROQUINA + PRIMAQUINA Classe Terapêutica: ANTIMALÁRICOS CID 10: B51 - Malária por Plasmodium vivax Observação: TRATANDO-SE DE NOVA ASSOCIAÇÃO, ESCLARECEMOS QUE APENAS ESSE ESTUDO PODERÁ NÃO SER SUFICIENTE PARA O REGISTRO. OS CRITÉRIOS PARA A APROVAÇÃO DO REGISTRO SERÃO DEFINIDOS, CONFORME ENQUADRAMENTO DO MEDICAMENTO, DESCRITO NO GUIA DE NOVAS ASSOCIAÇÕES.									

8.6 LISTA DE PRODUÇÃO ESCRITA DURANTE O PERÍODO

1. Costa PAC, Leoratti FMS, Figueiredo MM, Tada MS, Pereira DB, Junqueira C, et al. Induction of inhibitory receptors on T cells during *Plasmodium vivax* malaria impairs cytokine production. *J Infect Dis*. Oxford University Press; 2015 May 27;:jiv306.
2. Hojo-Souza NS, Pereira DB, Mendes TA, Passos LS, Gazzinelli-Guimarães AC, Gazzinelli-Guimarães PH, et al. CD4+ T cells apoptosis in *Plasmodium vivax* infection is mediated by activation of both intrinsic and extrinsic pathways. *Malar J*. 2015 Jan 5;14(1):5.
3. Hojo-Souza NS, Pereira DB, Passos LSA, Gazzinelli-Guimarães PH, Cardoso MS, Tada MS, et al. Phenotypic profiling of CD8(+) T cells during *Plasmodium vivax* blood-stage infection. *BMC Infect Dis* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2015;15(1):35.
4. Antonelli LRV, Leoratti FMS, Costa PAC, Rocha BC, Diniz SQ, Tada MS, et al. The CD14+CD16+ Inflammatory Monocyte Subset Displays Increased Mitochondrial Activity and Effector Function During Acute *Plasmodium vivax* Malaria. Stevenson MM, editor. *PLoS Pathog*. 2014 Sep 18;10(9):e1004393.
5. Ataíde MA, Andrade WA, Zamboni DS, Wang D, Souza MDC, Franklin BS, et al. Malaria-Induced NLRP12/NLRP3-Dependent Caspase-1 Activation Mediates Inflammation and Hypersensitivity to Bacterial Superinfection. Sibley LD, editor. *PLoS Pathog*. 2014 Jan 16;10(1):e1003885.
6. Aguiar ACC, Pereira DB, Amaral NS, De Marco L, Krettli AU. *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* ex vivo susceptibility to anti-malarials and gene characterization in Rondônia, West Amazon, Brazil. *Malar J*. 2014 Jan 1;13(1):73–3.
7. Costa JDN, Zanchi FB, Rodrigues FLDS, Honda ER, Katsuragawa TH, Pereira DB, et al. Cross-reactive anti-PfCLAG9 antibodies in the sera of asymptomatic parasite carriers of *Plasmodium vivax*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2013 Feb;108(1):98–105.

8. Vasconcelos M, Pereira DB, R RP, Villalobos-Salcedo JM. Clinic and laboratory analysis of patients with hepatitis delta in Amazon region, Brazil. *Journal of Medicine and Medical Science*. 2012;3(4) pp.263-269, April 2012(4):263–9.
9. Leoratti FM de S, Trevelin SC, Cunha FQ, Rocha BC, Costa PAC, Gravina HD, et al. Neutrophil paralysis in *Plasmodium vivax* malaria. Rodrigues MM, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. Public Library of Science; 2012;6(6):e1710.

Publicação de artigo dos resultados da tese:

Pereira DB, Daher A, Zanini G, Maia I, Fonseca L, Pitta L, et al. Safety, efficacy and pharmacokinetic evaluations of a new coated chloroquine tablet in a single-arm open-label non-comparative trial in Brazil: a step towards a user-friendly malaria vivax treatment. *Malar J. BioMed Central*; 2016;15(1):477.