

Instituto Oswaldo Cruz

Doutorado em Biologia Parasitária

**Tipagem de marcadores moleculares e de genes potencialmente
associados à resistência a antimaláricos em isolados de
Plasmodium falciparum e *P. vivax* do Brasil**

Bianca Ervatti Gama

Rio de Janeiro

2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Doutorado em Biologia Parasitária

**Tipagem de marcadores moleculares e de genes potencialmente
associados à resistência a antimaláricos em isolados de**

***Plasmodium falciparum* e *P. vivax* do Brasil**

Bianca Ervatti Gama

Orientadora: Dra. Maria de Fátima Ferreira da Cruz

Rio de Janeiro

2011

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

G184

Gama, Bianca Ervatti.

Tipagem de marcadores moleculares e de genes potencialmente associados à resistência a antimaláricos em isolados de *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* do Brasil. / Bianca Ervatti Gama. – Rio de Janeiro, 2011.

xii, 111 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2011.

Bibliografia: f. 65-91.

1. Malária. 2. Resistência. 3. Marcadores moleculares. 4. *Plasmodium falciparum*. 5. *Plasmodium vivax*. 6. Brasil. I. Título.

CDD:616.9362081

Instituto Oswaldo Cruz

Doutorado em Biologia Parasitária

**Tipagem de marcadores moleculares e de genes potencialmente
associados à resistência a antimaláricos em isolados de *Plasmodium
falciparum* e *P. vivax* do Brasil**

Tese apresentada com vistas à obtenção
do título de Doutor em Ciências na
área de concentração
Genética e Bioquímica.

Bianca Ervatti Gama

Orientadora: Dra. Maria de Fátima Ferreira da Cruz

Componentes da banca examinadora:

Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira (Presidente)

Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito

Dr. Marcelo Urbano Ferreira

Dr. Leila de Mendonça Lima (suplente)

Rio de Janeiro, 17 de Maio de 2011.

Dedicatória

Aos meus pais Julio e Angélica e à minha irmã Paola, por terem me guardado, acompanhado e possibilitado que eu chegasse até aqui. Neste ponto onde estou.

Ao meu marido, Ricardo Coulamy, por seres quem és e assim ter preenchido de forma inequívoca o meu coração e a minha vida.

Aos queridos Rose e Fernando, que também compartilharam comigo nesta empreitada.

Ao meu mestre, Jura, e ao meu padrinho, Sebastião, quero estar sempre na sua companhia.

A todos vocês, dedico-lhes com muito amor o presente trabalho.

Agradecimentos

Inegavelmente registro nas primeiras linhas os meus mais sinceros agradecimentos à minha orientadora, Dra. Maria de Fátima Ferreira da Cruz, com a qual convivi e partilhei minhas alegrias, certezas e incertezas por pouco mais de 7 anos. Agradeço-lhe pela formação, pelo apreço, pela confiança e pelas inúmeras oportunidades de aprendizado, tanto de ciência como de vida, que recebi por seu intermédio e por seu exemplo. Meu muito obrigado, é com gratidão!

Gostaria de agradecer também ao Dr. Cláudio Tadeu Daniel Ribeiro por ter me recebido em seu laboratório, pela maravilhosa participação no IX Seminário Laveran & Deane sobre Malária, e principalmente por ter me acompanhado carinhosamente depositando tamanha confiança em mim. Muito obrigada.

Igualmente eu não poderia deixar de mencionar o quanto participativo e fundamental foi o trabalho da estudante e agora bióloga e tecnologista Natália Ketrin Almeida de Oliveira para o desenvolvimento dessa tese. Sua dedicação, empenho, presteza e metodismo (integrado ao meu) fizeram a diferença. A você, sou muito agradecida e desejo-lhe todos os mais sinceros votos de uma carreira extremamente próspera.

Aos estudantes, pesquisadores, técnicos, funcionários, companheiros e amigos de laboratório: Aline, Amanda, Ane Caroline, Beatriz, Carolina, Cesare, Claudinha, Daiana, Dalma, Dauto, Elisângela, Elsa, Evelyn, Felipe, Florbela, Francisco, Guilhermina, Josué, Larissa, Leonardo, Lila, Lilian, Luciene, Mariana, Paulo, Raquel, Ricardo, Rosângela, Sylvia, Thiago, Vanessa, Violeta, Vítor & Yuri; obrigada pela assistência, pelo companheirismo, pelo dia-a-dia e pelos sorrisos. Em especial, também quero agradecer aos diretamente

responsáveis pelas coletas de amostras que viabilizaram este trabalho, Dra. Lilian Rose Pratt Riccio, Dra. Evelyn Kety Pratt Riccio, Dr. Leonardo José Moura de Carvalho, Dr. Paulo Renato Rivas Totino e à Mestre Clarissa Perez Faria. Da mesma forma, quero agradecer a todos os pacientes que gentilmente forneceram o material biológico aqui estudado.

Devo agradecimentos ao suporte da plataforma genômica da Fiocruz, protagonizado pelas prezadas Aline e Andressa; a esta estimada e prestigiosa casa o Instituto Oswaldo Cruz pela fraternal acolhida no Castelo Mourisco, um eterno sonho de criança; ao Ministério da Saúde do Brasil / DECIT; ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq); à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e à VPPLR/FIOCRUZ pelo suporte financeiro em forma de recursos e de bolsas.

“A paz flui por meu coração e, como um zéfiro, sopra sobre mim. A paz, como fragrância, me permeia. A paz me trespassa como raios de luz. A paz apunhala o coração do ruído e da inquietude. A paz reduz a cinzas minha inquietação. A paz se expande como um globo de fogo e preenche minha onipresença. A paz, como o oceano, invade todo o espaço. A paz, como sangue rubro, vitaliza as veias dos meus pensamentos. A paz, como auréola ilimitada, envolve meu corpo infinito. A paz se lança, como chamas, dos poros de minha carne e do espaço inteiro. O perfume da paz circula sobre os jardins floridos. A paz é um vinho que flui perpetuamente do lagar de todos os corações. A paz é o alento das pedras, das estrelas e dos sábios. A paz é ambrosia, é o vinho do Espírito, que flui do frasco do silêncio e que sorvo com as bocas inumeráveis de meus átomos”.

Paramahansa Yogananda

Índice

Resumo	xi
Abstract	xii
1. Introdução	1
1.1. Malária: breve histórico, importância e incidência	1
1.2. Agente etiológico e ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> em humanos.....	4
1.3. Estratégias de controle da malária	8
1.4. Quimiorresistência.....	10
1.5. Métodos de avaliação e monitoramento da quimiorresistência	14
1.6. Marcadores moleculares	19
1.6.1. <i>Pfmdr1</i>	21
1.6.2. <i>Pfcrt</i>	25
1.6.3. <i>Pfdhfr</i> e <i>Pfdhps</i>	29
1.6.4. <i>Pfatpase6</i> ou <i>serca</i>	31
1.6.5. <i>Pvmdr1</i>	33
1.6.6. <i>Pvdhfr</i>	34
1.7. Panorama da quimiorresistência no Brasil.....	36
2. Objetivos.....	39
3. Resultados.....	40
Artigo 1	40

Artigo 2	46
Artigo 3	50
4. Discussão	56
5. Síntese de resultados.....	63
6. Conclusões	64
7. Perspectivas.....	65
8. Referências bibliográficas.....	66
9. Anexos	93

Resumo

A malária, doença infecciosa causada por parasitas do gênero *Plasmodium*, é um conhecido flagelo das populações humanas desde a antiguidade. Na falta de uma vacina, a política de controle baseia-se principalmente no diagnóstico rápido e no tratamento dos casos. Devido ao impacto da quimiorresistência parasitária no controle, faz-se necessário o constante monitoramento da eficácia de drogas. Portanto, para contextualizar o Brasil no panorama mundial, nosso objetivo se constituiu em realizar um estudo descritivo sobre a ocorrência de mutações (SNPs) nos genes considerados marcadores moleculares associados à resistência como *pfcr1*, *pfmdr1*, *pfdhfr*, *pfdhps* e *pvdhfr*, assim como em genes potencialmente associados à quimiorresistência (*pfatpase6* e *pvmr1*) em isolados de *P. falciparum* e *P. vivax* coletados nas cidades Amazônicas de Porto Velho, Paragominas e Manaus. Para tal, utilizamos PCRs seguidas do sequenciamento de DNA. Ao investigarmos a ocorrência de mutações nos genes *pfcr1*, *pfdhfr* e *pfdhps* em amostras de *P. falciparum* provenientes de Porto Velho e Paragominas foi possível detectar 1 isolado apresentando um haplótipo ou perfil de sensibilidade CVMNK no gene *pfcr1* e ACNCSVI no gene *pfdhfr* e, além disso, pudemos observar uma redução no número de mutações no gene *pfdhps*, ao confrontarmos os nossos resultados com os de um estudo retrospectivo. Em relação ao *P. vivax*, a análise do gene *pvmr1* num conjunto de amostras provenientes de Paragominas revelou o predomínio de mutações no códon 976 do gene *pvmr1* (preliminarmente associado com a resistência à cloroquina) e a presença de haplótipos duplo-mutante FRTNI e triplo-mutante FRTNL para o gene *pvdhfr*. Dando continuidade à caracterização de *P. falciparum* no Brasil, foi estabelecido um registro de base da ocorrência de mutações nos genes *pfmdr1* e *pfatpase6*, em amostras procedentes de Porto Velho, Paragominas e Manaus. Tal análise permitiu a identificação de um haplótipo prevalente NEF/CDVY no *pfmdr1*, assim como identificação de mutantes em um único códon ou duplo-mutantes (630 e/ou 402) no caso do gene *pfatpase6*. Também não foi encontrada a mutação 769N, associada com a diminuição da susceptibilidade ao arteméter. Concluímos que: (a) existem no Brasil populações parasitárias de *P. falciparum* portando haplótipos sensíveis para o gene *pfcr1* e o *pfdhfr*; (b) a mutação no códon 976 no gene *pvmr1* pode não ser válida para o monitoramento da resistência à cloroquina em isolados brasileiros de *P. vivax*; (c) as populações de *P. vivax* avaliadas apresentaram mutações no gene *pvdhfr*, apesar de nunca ter sido instituído o tratamento com sulfadoxina-pirimetamina para malária vivax e; (d) as amostras de *P. falciparum* avaliadas não portavam todos os alelos do gene *pfmdr1* associados a um potencial desenvolvimento de resistência à combinação arteméter-lumefantrina.

Abstract

Acknowledged as a febrile syndrome of human populations since ancient times, malaria is an infectious disease caused by parasites of the *Plasmodium* genus. In the absence of a reliable vaccine, the control policy is based mainly on diagnosis and case management. Since parasite chemoresistance is a major factor hampering the disease control, there is a need for drug efficacy surveillance. Therefore, to place Brazil into the world scenario, our goal was to conduct a descriptive study on the occurrence of mutations (SNPs) in genes acknowledged as molecular markers to chemoresistance as *pfprt*, *pfmdr1*, *pfdhfr*, *pfdhps* and *pvdhfr*, as well as in genes potentially associated with chemoresistance (*pfatpase6* and *pvmr1*) in isolates of *P. falciparum* and *P. vivax* collected in Porto Velho, Manaus and Paragominas cities in Brazilian Amazon. With this aim, we used PCR technique followed by DNA sequencing. The analysis of mutations in *pfprt*, *pfdhfr* and *pfdhps* genes in *P. falciparum* samples from Porto Velho and Paragominas allowed us to detect a single isolate presenting a sensitivity profile CVMNK in the *pfprt* gene and ACNCSVI in the *pfdhfr* gene. Additionally, we could observe a decrease in the mutations number for the *pfdhps* gene, when comparing our results with those from a retrospective study. Concerning *P. vivax*, the analysis from Paragominas samples revealed the full predominance of mutations at codon 976 in the *pvmr1* gene (preliminarily associated with chloroquine resistance), and the presence of double-and triple-mutant haplotypes (FRTNI and FRTNL) for the *pvdhfr* gene. Lastly, to establish a genotypic baseline for *pfmdr1* and *pfatpase6* genes, *P. falciparum* isolates from Porto Velho, Manaus and Paragominas were also evaluated. This analysis allowed us to identify a major haplotype NEF/CDVY in *pfmdr1* gene, as well as to detect a single-mutant (in 630 or 402 codons) and double-mutant (in 630 and 402 codons) when *pfatpase6* gene was surveyed. The 769N mutation, associated with decreased susceptibility to artemether, was not detected. We conclude that: (a) there exist *P. falciparum* populations presenting sensitive alleles for the gene *pfprt* and *pfdhfr* in Brazil; (b) the 976 mutation in the *pvmr1* gene may not be valuable for monitoring chloroquine resistance in Brazilian *P. vivax* isolates; (c) *P. vivax* populations herein investigated presented mutations in the *pvdhfr* gene, although sulphadoxine-pyrimethamine therapy has never been preconized for malaria vivax and; (d) the *P. falciparum* samples analyzed did not carry all alleles in the *pfmdr1* gene that were associated with a potential development of resistance to artemether-lumefantrine.

1. Introdução

1.1. Malária: breve histórico, importância e incidência

A malária, doença infecciosa causada por parasitas do gênero *Plasmodium*, é um conhecido flagelo das populações humanas desde a antiguidade. Sinais clínicos *sui generis* da infecção malárica como febres intermitentes e esplenomegalia foram bem documentados em vários relatos provenientes de antigas civilizações como a suméria, assíria, babilônica, egípcia, indiana e chinesa. Dentre estes se destacam o livro chinês *Nei Ching* e o papiro egípcio de Ebers, datados de 2700 a.C. e 1570 a.C., que sugeriam a existência dessa doença pela ocorrência de episódios febris cíclicos, associados à esplenomegalia (1, 2).

A primeira descrição detalhada da malária foi feita em 400-500 aC por Hipócrates, o “Pai da Medicina”. Nos aforismos do seu trabalho *Epidemie* ele descreveu as diferentes intermitências de febre, associando-as à ingestão de água parada. Hipócrates relacionou ainda a ocorrência do paroxismo a períodos sazonais do ano ou mesmo a certos lugares pelos quais os doentes haviam passado (1, 3).

Entretanto, o agente etiológico da malária permaneceu desconhecido por muitos séculos. A própria palavra malária é uma derivação do termo em italiano “*mal aire*” que caracterizava o pressuposto de que essa doença seria ocasionada por miasmas, fluidos ou emanções maléficas provenientes dos pântanos. Essa suposição foi desmistificada somente em 1880, quando o médico francês Charles Alphonse Laveran, trabalhando em Constantine, na Argélia, identificou o parasita no interior de hemácias do sangue periférico humano (1), descoberta que lhe valeu o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia promulgado em 1907.

Alguns anos depois, o médico britânico Ronald Ross encontrou o estágio do parasita conhecido como oocisto no interior de um mosquito anofelino que havia se alimentado do

sangue de um doente, demonstrando que a malária era transmitida ao homem através da picada de um mosquito. Esse achado foi crucial para a descoberta do ciclo biológico de desenvolvimento do parasita no homem e no mosquito *Anopheles*, o qual foi elucidado em 1899 pelos italianos Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli e Giovanni Batista Grassi (1, 3). Nesse cenário, a descoberta do papel dos anofelinos na transmissão permitiu o desenvolvimento de novas iniciativas para o controle da malária, que era tida como endêmica em cerca de 60% da extensão territorial de todo o planeta (4).

Não obstante os intensos programas de controle utilizados na tentativa de combatê-la e os progressos obtidos no conhecimento da biologia do *Plasmodium* desde então, a malária ainda hoje pode ser considerada como uma doença parasitária devastadora, que compromete o desenvolvimento social e econômico de milhares de pessoas em vários países (5).

Embora tenha ocorrido uma redução substancial do número de áreas afetadas no mundo (Figura 1.1) e uma diminuição dos índices de morbi-mortalidade, de acordo com o último relatório divulgado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a malária está presente em 106 países (dos quais 43 na África e 63 em outras regiões), ocasionando 225 milhões de casos e 781 mil mortes, somente no ano de 2009. De fato, há uma estimativa de 765 milhões de pessoas em risco de contrair malária (6), o que equivale atualmente a cerca de 11% da população mundial.

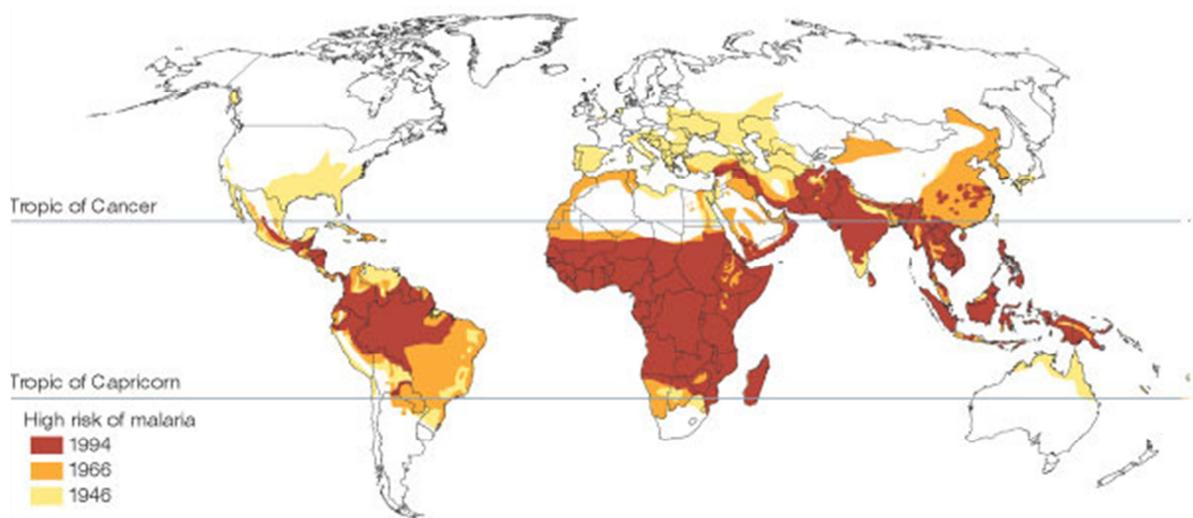


Figura 1.1: A variação na distribuição global de ocorrência de casos de malária no período de 1946-1994. Figura retirada de Sachs & Malaney, 2002 (5).

1.2. Agente etiológico e ciclo biológico do *Plasmodium* em humanos

Nos países afetados, a malária geralmente é causada por uma ou mais das quatro espécies “clássicas” de *Plasmodium* que afetam o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. Entretanto, motivados por recentes relatos provenientes do Sudeste Asiático que verificaram a transmissão de um parasita tipicamente simiano a humanos (7), o *P. knowlesi* foi reconhecido como a quinta espécie responsável pela infecção no homem (8, 9). Destas espécies, são preponderantes o *P. falciparum*, que ocasiona a parte majoritária das formas graves e letais da doença, e o *P. vivax* que, apesar de ser responsável por considerável morbidade no mundo, foi negligenciado por ser considerado agente etiológico de uma infecção benigna (10).

Os parasitas que causam a malária desenvolvem o mesmo ciclo biológico que se alterna entre o hospedeiro humano e o mosquito anofelino (Figura 1.2), nos quais se desenvolvem as fases de reprodução assexuada e sexuada, respectivamente. No homem, o ciclo da malária naturalmente adquirida se inicia quando um mosquito fêmea do gênero *Anopheles* faz seu repasto sanguíneo, inoculando junto com a sua saliva as formas infectantes chamadas esporozoítas, que haviam se acumulado nas glândulas salivares.

Com pouca frequência, os esporozoítas são injetados na circulação sanguínea. Normalmente eles são inoculados no tecido subcutâneo ao redor da picada, podendo ali permanecer por algumas horas, ou migrar imediatamente para um capilar sanguíneo ou mesmo para um nódulo linfático, donde seguirão para o fígado a fim de invadir hepatócitos (11, 12).

A invasão de um hepatócito ocorre através de uma invaginação da membrana plasmática celular e formação de um vacúolo, denominado parasitóforo, que circunda o esporozoíta. Entretanto, há evidências de que os esporozoítas atravessam várias células, rompendo a membrana celular das mesmas, antes de alcançar aquela onde se dará o prosseguimento do ciclo biológico (11, 12). Entretanto, para as espécies *P. vivax* e *P. ovale* os esporozoítas podem permanecer quiescentes nas células do fígado por um longo período de tempo, transformando-se nos ditos hipnozoítas.

Dentro do vacúolo parasitóforo, o esporozoíta inicia, então, uma fase de reprodução assexuada conhecida como ciclo exo-eritrocítico ou esquizogonia pré-eritrocítica, gerando uma forma multinucleada chamada de esquizonte que dará origem a até 26 merozoítas, os quais serão liberados na luz dos sinusóides hepáticos através de estruturas conhecidas como merossomos (13), quando a célula parasitada, muito distendida e alterada morfológicamente, romper-se.

Muitos merozoítas serão fagocitados e destruídos por células de defesa. No entanto, outros conseguirão invadir hemácias e dar origem ao ciclo sanguíneo no qual ocorrerão seguidas fases de reprodução assexuada que se repetem em prazos normalmente regulares, marcando o paroxismo típico da doença. Nessa fase chamada de esquizogonia sanguínea, o merozoíta se transformará ciclicamente em trofozoíta jovem ou anel, o qual se transformará em trofozoíta maduro e seguirá para esquizonte, de forma a originar novos merozoítas.

O processo de invasão dos merozoítas nas hemácias é similar ao dos esporozoítas nos hepatócitos, envolvendo a ligação de receptores presentes nas membranas do parasita e do hospedeiro, permitindo a reorientação do complexo apical do parasita contendo as roptrias e os micronemas, que são estruturas necessárias para a invaginação da membrana celular do

hospedeiro e a formação do vacúolo parasitóforo aonde o parasita irá se replicar e se desenvolver (14).

Entretanto, à medida que novas fases de esquizogonia se completam, certos trofozoítas jovens se transformarão em macro e microgametócitos ou gametócitos fêmea e macho, respectivamente, estimulados por mecanismos ainda desconhecidos (15). Esses gametócitos são incapazes de se fertilizar no hospedeiro humano e ficarão circulando no sangue do homem até que um mosquito fêmea os sugue, ocasião em que irão encaminhar-se para a luz do estômago do inseto. É nesse local onde a reprodução sexuada ou fecundação dos gametócitos ocorrerá, dando origem a um zigoto que se transformará em oocineto.

Assim, a forma móvel de oocineto irá perfurar o epitélio do estômago no qual ele próprio se alojará para se transformar num oocisto. No oocisto iniciar-se-ão as esporogonias, dando origem aos esporozoítas que serão liberados na hemocele do anofelino no momento da ruptura do cisto. Neste momento, irão migrar para as glândulas salivares, estando aptos a reiniciar o ciclo quando inoculados através de um novo repasto sanguíneo (16).

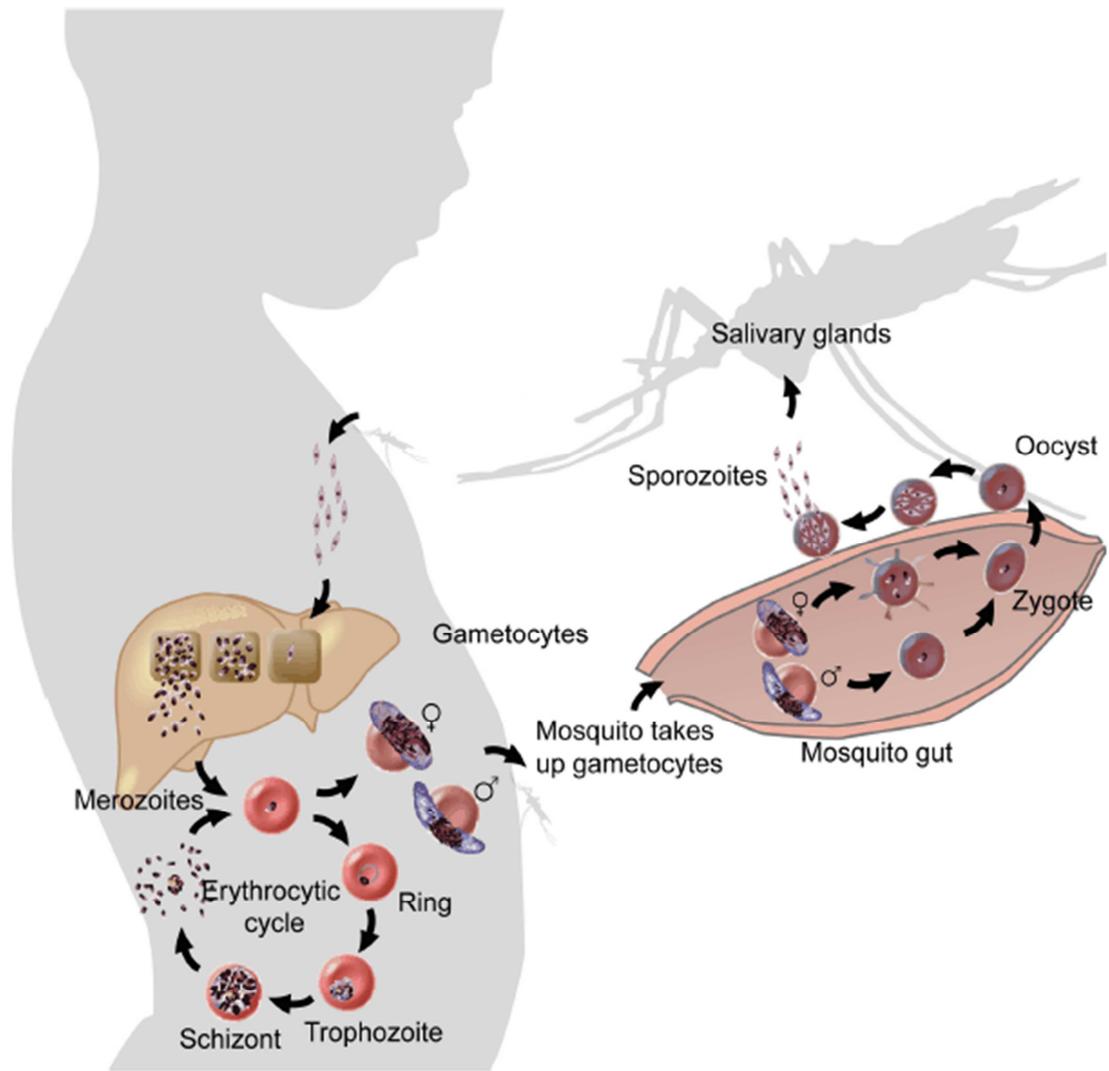


Figura 1.2: Ciclo de desenvolvimento dos diferentes estágios biológicos dos plasmódios que infectam o homem. Figura retirada de Dahlström, 2009 (17).

1.3. Estratégias de controle da malária

Os esforços para controlar a malária em larga escala remontam ao final do século XIX, com a descoberta do parasita e da sua transmissão por mosquitos anofelinos. Durante a primeira metade do século XX, quando 178 países eram considerados endêmicos, pouco progresso se obteve no controle, em parte porque os esforços foram descontinuados com a ocorrência da primeira e segunda guerra mundial (18).

No entanto, a partir de 1945, vários países no mundo conseguiram interromper a transmissão de malária, impulsionados pelo uso do inseticida DDT (dicloro difenil-etano) e pelo Programa de Erradicação Global da Malária, preconizado pela OMS em 1955. Porém, devido a problemas administrativos, financeiros e técnicos, esse programa foi abandonado em 1969, quando se reconheceu que a erradicação não era viável em todas as partes do mundo (19). Assim, após o término desse programa, embora a maioria dos países nos quais a malária tinha sido eliminada continuasse livre da doença, muitos dos países endêmicos ficaram desmotivados. Essas circunstâncias, aliadas a outras causas de ressurgimento da malária como a quimiorresistência dos mosquitos ao DDT e as migrações da população humana, levaram a um aumento substancial no número de casos em todo o mundo durante os anos 70 e 80 (18). Portanto, em uma conferência realizada pela OMS em Amsterdã em 1992, foram estabelecidas as principais diretrizes na qual se baseiam os atuais programas de controle da morbidade e mortalidade por malária.

Na falta de uma vacina, as atuais políticas estratégicas para o controle da malária são baseadas em duas grandes abordagens – prevenção e gerenciamentos dos casos. Juntas, essas intervenções atuam contra a transmissão do parasita pelo vetor aos seres humanos (e

dos humanos para os mosquitos) e também contra o desenvolvimento da doença e de casos graves em humanos.

A prevenção, através do controle vetorial, objetiva impedir a população de picadas de anofelinos infectados, por meio da redução do contato com os humanos e da densidade populacional dos mosquitos. Nesse sentido, as duas intervenções mais utilizadas são as telas mosquiteiras impregnadas com inseticidas de longa duração (LLINS ou *long-lasting insecticide-treated nets*) e a aplicação intradomiciliar de inseticidas de ação residual (IRS ou *indoor residual spraying*) (6).

Por outro lado, a política de gerenciamento dos casos objetiva reduzir a morbidade e a mortalidade por malária através do diagnóstico rápido e do tratamento adequado, de forma a prevenir a progressão de casos não complicados para casos graves, potencialmente fatais (6). Essa estratégia proporciona benefícios não somente de cunho individual mas também de cunho coletivo, visto que o diagnóstico precoce propicia a rapidez no tratamento evitando que apareçam na circulação periférica formas infectantes para os mosquitos, bloqueando, assim, a transmissão.

Além disso, é importante mencionar que a malária na gravidez é uma das principais causas de resultados adversos do nascimento (20), razão pela qual uma intervenção profilática para este grupo de risco, conhecida como tratamento intermitente preventivo (IPT ou *intermittent preventive treatment*), é recomendada pela OMS para mulheres grávidas em áreas de alta transmissão. Recentemente, essa mesma estratégia profilática foi expandida de forma a incluir também crianças, grupo esse que compreende 85% do total de casos e 90% das mortes notificadas somente na África (21).

1.4. Quimiorresistência

A quimiorresistência é definida sucintamente como a “capacidade de uma célula sobreviver e / ou se multiplicar na presença de uma droga em níveis iguais ou superiores ao recomendado, mas dentro do limite de tolerância do paciente”, apresentando-se como um tema recorrente na história do controle de muitas doenças infecciosas (22).

Em se tratando de malária, observou-se não só este fenômeno como também a ocorrência de resistência cruzada, eis que por muitas décadas o controle dessa endemia se baseou em um número limitado de drogas, por vezes da mesma família química (Tabela 1.1). Dentre elas, podemos destacar a cloroquina (CQ), uma droga de baixo custo, segura, pouco tóxica e com rápida ação parasiticida (23), que foi utilizada por cerca de 50 anos para o tratamento da malária não complicada para *P. falciparum* e, ainda hoje, é utilizada para o tratamento de *P. vivax*.

Classe química	Drogas
4-aminoquinoleínas	Cloroquina, amodiaquina, piperaquina
8- aminoquinoleínas	Primaquina
Amino-álcoois	Quinina, quinidina, mefloquina, lumefantrina
Sulfonamidas	Sulfadoxina
Diaminopirimidinas	Pirimetamina
Lactonas sesquiterpênicas	Artemisinina, arteméter, artesunato, dihidroartemisinina
Lincosamidas	Clindamicina
Tetraciclina	Tetraciclina, doxiciclina

Tabela 1.1: Principais drogas antimaláricas disponíveis para o tratamento da malária e suas respectivas classes, de acordo com a sua estrutura química.

No caso do *P. falciparum*, a descoberta de parasitas resistentes à CQ ocorreu quase que simultaneamente no final dos anos 50 na Colômbia e na fronteira da Tailândia com o Camboja (24-26), o qual culminou na dispersão dos parasitas resistentes pelo mundo nas duas décadas seguintes (Figura 1.3a). Posteriormente, com o amplo uso da sulfadoxina-pirimetamina (SP) como droga alternativa para o tratamento da malária não complicada em áreas onde a CQ não era mais eficaz, constatou-se também o rápido surgimento de resistência na fronteira da Tailândia com o Camboja, no final dos anos 60 (27), e também em áreas da América do Sul como Brasil e na Colômbia, nos anos 70-80 (28, 29), assim como a subsequente dispersão das cepas resistentes pelos continentes (Figura 1.3b) (30). Tais eventos marcaram com grande impacto o controle e modificaram a epidemiologia da malária, pois resultaram num aumento de custo e elevação considerável dos índices globais de morbidade e mortalidade a partir da década de 70 (31-33).

Diferentemente do *P. falciparum*, para o *P. vivax* a resistência à CQ foi observada somente em 1989 na Papua Nova Guiné (34), ao qual se seguiram outros relatos na Oceania, Ásia e América do Sul (35), totalizando em 21 o número de países afetados por esse acontecimento (22). Até o momento, embora esse fenômeno não tenha aparentemente impactado nos índices de morbi-mortalidade por *P. vivax*, a quimiorresistência tem sido apontada por alguns autores como um dos fatores ligados ao recente surgimento de casos graves por malária vivax (36, 37).

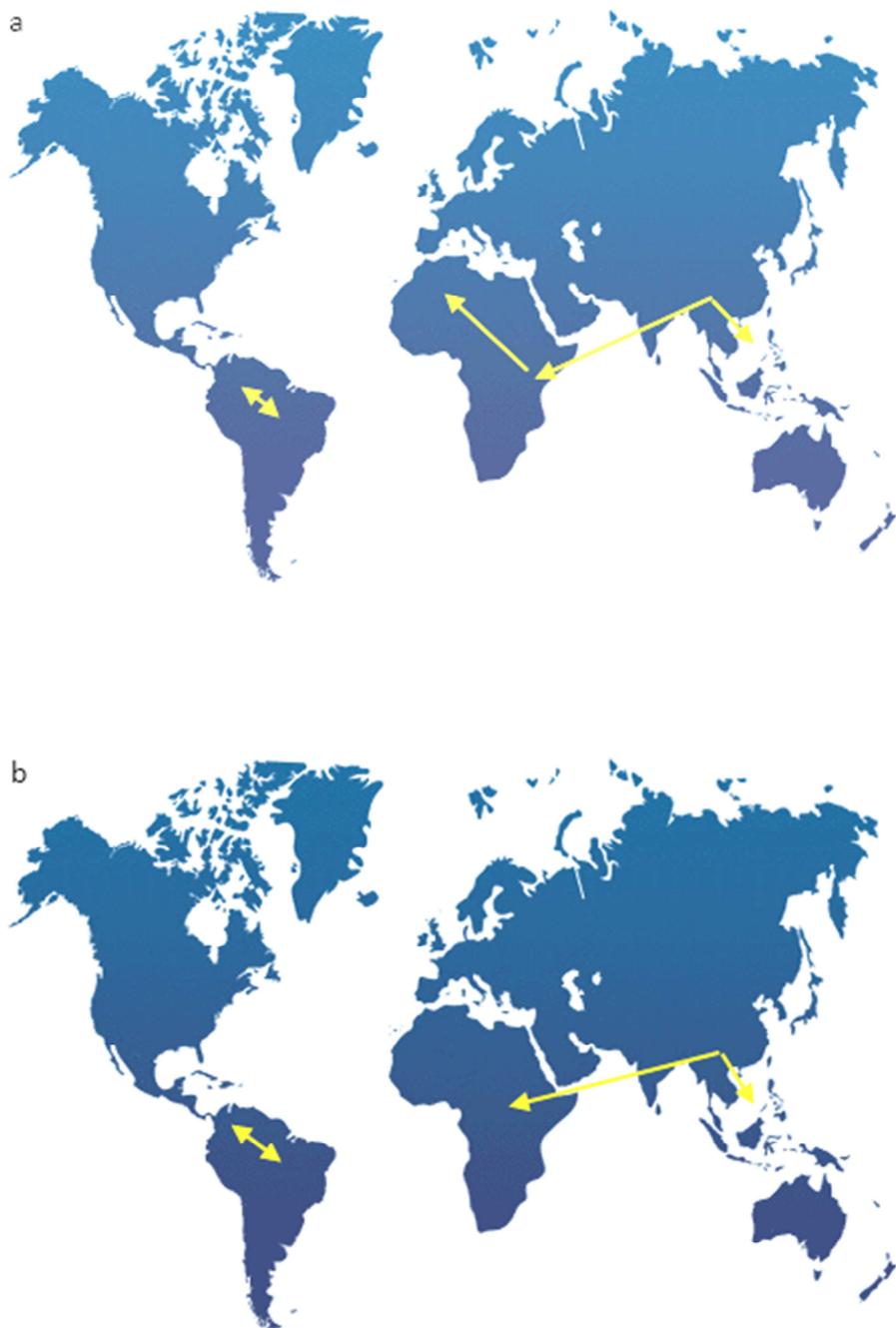


Figura 1.3: Emergência e dispersão de isolados de *P. falciparum* resistentes à CQ (a) e à SP (b) pelos continentes. As setas representam as principais rotas de dispersão. Figura adaptada de Dondorp *et al*, 2010 (30).

Em consequência do aumento nos níveis de morbimortalidade e da dispersão mundial de isolados de *P. falciparum* resistentes à CQ e à SP, desde 2001 a OMS recomenda o uso da terapia combinada à base de artemisinina (ACT) como tratamento de primeira linha para esta malária. Nessa terapêutica de combinação, a possibilidade de seleção de parasitas resistentes é minimizada, pois a maior parte da carga parasitária é eliminada pela rápida ação da artemisinina (ART) e / ou seus derivados, cuja concentração decai rapidamente na circulação sanguínea. Logo, a tarefa de extinguir a parasitemia residual recai para a droga parceira que permanece mais tempo em circulação (38).

A introdução dos ACTs, junto com intervenções complementares como o uso de telas mosquiteiras impregnadas e a aplicação intradomiciliar de inseticidas, foi fundamental para a recente melhora obtida no controle da malária. Desde o início dessa fase de controle, um número crescente de países vem registrando decréscimos no número de casos confirmados de malária, assim como uma redução no número de mortes de quase um milhão em todo o mundo para 781.000 em 2009, como já mencionado (6).

A eficácia dessa medida de controle parecia resguardada da geração de resistência até que, em 2005, surgiram relatos de parasitas provenientes da Guiana Francesa com reduzida sensibilidade *in vitro* ao arteméter (39). Em oposição, estudos realizados, posteriormente, em diferentes áreas do mundo não confirmaram esta observação (40-43).

Entretanto, no final de 2008, uma forte evidência de quimiorresistência foi constatada no Camboja (44), onde se observaram dois casos de malária falciparum com parasitas apresentando redução na sensibilidade *in vitro* à dihidroartemisinina e um prolongamento significativo no tempo de resolução da parasitemia após o tratamento com artesunato administrado em monoterapia (52 h em média para 95 e 133 h). Por conseguinte, esse relato parece ser a primeira evidência de quimiorresistência clínica às ARTs (30, 45).

1.5. Métodos de avaliação e monitoramento da quimiorresistência

Diante desse fenômeno, monitorar continuamente a eficácia de antimaláricos foi, e ainda é, um componente fundamental das estratégias de controle da doença, de forma que seja possível se detectar mudanças na susceptibilidade de parasitas a determinadas drogas assim como sua dispersão, permitindo que seja efetuado, se necessário, uma revisão das recomendações terapêuticas para instituir uma política de tratamento com maior impacto para a malária.

Basicamente, podemos relacionar as quatro abordagens recomendadas para investigar a resistência dos plasmódios a uma droga antimalárica, segundo a OMS (46):

- i) O clássico *follow-up in vivo* ou estudo da eficácia terapêutica, que é estimado com base nas respostas clínica e parasitológica, obtidas no acompanhamento do tratamento de um paciente por um período pré-estabelecido e em condições controladas (Tabela 1.2). Nessa análise, o resultado final é influenciado não só pela imunidade do paciente, assim como por variações individuais na farmacocinética, refletindo a interação entre droga, hospedeiro humano e parasita. Além disso, tal estudo deve também ser associado a uma análise molecular suplementar, para discriminar a origem da parasitemia recorrente, de forma a distinguir possíveis falhas no tratamento devido à quimiorresistência (denominada pelo termo recrudescência) ou falhas no tratamento devido à ocorrência de uma nova infecção ou mesmo por uma recaída no caso de *P. vivax*, a qual pode ser observada durante o acompanhamento;

- ii) Os testes *in vitro* os quais são baseados na inibição do crescimento de isolados clínicos em cultura, expostos a diferentes faixas de concentração de drogas, a fim de medir a sensibilidade intrínseca dos parasitas aos antimaláricos, sem as influências de fatores do hospedeiro. Esses ensaios servem como um sistema de alerta preliminar, visto que a resistência clínica é precedida pela resistência *in vitro*;
- iii) Os ensaios para mensuração da concentração de drogas ou seus metabólitos no sangue, plasma ou soro de um indivíduo, que funcionam como uma forma de discriminação entre falhas no tratamento relativa à recrudescência ou falhas no tratamento devido à presença de droga em concentração subterapêutica, e por último;
- iv) A genotipagem de marcadores moleculares, a qual é realizada através da identificação de mutações genéticas ou fenômenos de amplificação gênica, que foram previamente relacionados ao desenvolvimento de resistência às drogas antimaláricas. Esses ensaios, enquanto instrumentos de saúde pública moderna servem como um sistema de alerta preliminar (visto que tais eventos genéticos podem preceder em muito a resistência clínica) e são utilizados frequentemente como uma ferramenta de monitoramento e dispersão de populações.

No entanto, no caso do *P. vivax* tais metodologias são bastante elusivas, principalmente por causa das limitações técnicas para se fazer o reconhecimento da verdadeira quimiorresistência, isto é, a distinção entre a origem da parasitemia recorrente, que pode ser ocasionada por: (a) uma nova infecção, (b) pela resistência parasitária ou (c)

simplesmente pela ativação de hipnozoítas abrigados no fígado (denominado como relapso). Aliados a esse fato, em *P. vivax* não há uma metodologia eficaz para o cultivo contínuo *in vitro* de parasitas, e não foram identificados marcadores moleculares associados com a quimiorresistência à CQ.

Na prática, a análise da resistência à CQ em *P. vivax* é realizada através do acompanhamento *in vivo* por 28 dias, complementada por uma análise de dosagem no sangue da concentração da CQ e do seu metabólito principal, a desetilcloroquina. Portanto, são considerados como parasitas resistentes aqueles que persistirem no sangue na presença de níveis de CQ e de seu metabólito superiores a 100 ng/mL (47), a despeito da possibilidade de serem oriundos do fígado ou mesmo de uma nova infecção.

Classificação das respostas ao tratamento	Critérios para classificação
Early treatment failure (ETF) ou falha precoce no tratamento	<ul style="list-style-type: none"> • Sinais de perigo ou malária grave no dia 1, 2 ou 3 na presença de parasitemia; • Parasitemia no dia 2 maior que a do dia 0, independentemente da temperatura axilar; • Parasitemia no dia 3, com temperatura axilar \geq a 37,5°C e • Parasitemia no dia 3 \geq a 25% da contagem inicial do dia 0.
Late clinical failure (LCF) ou falha clínica tardia	<ul style="list-style-type: none"> • Sinais de perigo ou malária grave na presença de parasitemia em qualquer dia entre o dia 4 e o dia 28 (ou dia 42) em pacientes que não se enquadraram a nenhum dos critérios de falha precoce no tratamento e • Presença de parasitemia em qualquer dia entre o dia 4 e o dia 28 (ou dia 42) em pacientes com temperatura axilar \geq a 37,5°C que não se enquadraram a nenhum dos critérios de falha precoce no tratamento.
Late parasitological failure (LPF) ou falha parasitológica tardia	<ul style="list-style-type: none"> • Presença de parasitemia em qualquer dia entre os dias 7 e 28 (ou dia 42) em pacientes com temperatura axilar $<$ a 37,5°C que não se enquadraram a nenhum dos critérios de falha precoce no tratamento ou falha clínica tardia.
Adequate clinical and parasitological response (ACPR) ou resposta clínica e parasitológica adequada	<ul style="list-style-type: none"> • Ausência de parasitemia no dia 28 (ou dia 42), independentemente da temperatura axilar, em pacientes que não se enquadraram a nenhum dos critérios de falha precoce no tratamento, falha clínica tardia ou falha parasitológica tardia.

Tabela 1.2: Critérios para classificação das respostas clínica e parasitológica em estudos de eficácia terapêutica conduzidos em 28 ou 42 dias. As avaliações devem ocorrer nos dias 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21 e 28 ou 0-28 + 35 e 42. O *follow-up* de 28 dias é recomendado para drogas como a amodiaquina (AQ), derivados da ART, lumefantrina (LM), quinina (QN), CQ e SP, enquanto que o de 42 dias é indicado para drogas como a mefloquina (MQ) ou a piperquina (46).

Dentre as metodologias apresentadas, os estudos de *follow-up in vivo* são clássicos e considerados como o padrão ouro para a avaliação da eficácia de drogas (46). Entretanto, como já mencionado, é preciso ressaltar que, por vezes, a observação pura e simples de falha no tratamento pode não ser uma indicação verdadeira de quimiorresistência parasitária. Precisamos considerar que, nesse sistema, vários fatores influenciam o resultado final, como por exemplo, a imunidade, a aderência correta ao tratamento prescrito, a qualidade das drogas administradas, as possíveis interações com outros medicamentos previamente utilizados, assim como as variações individuais na farmacocinética e farmacodinâmica (48). Dessa forma, durante o estabelecimento das abordagens para o estudo da quimiorresistência parasitária, outras análises se fizeram necessárias para a complementação e a confirmação dos resultados observados.

1.6. Marcadores moleculares

Descritos recentemente, os marcadores moleculares podem ser definidos como alterações genéticas preditoras de fenótipos, observáveis *in vivo*, representando uma nova ferramenta de saúde pública que permite não só detectar a quimiorresistência como observar dispersões, mudanças e tendências nos padrões de susceptibilidade às drogas. De uma forma geral, a genotipagem desses marcadores é realizada através da reação da polimerase em cadeia (PCR ou *polymerase chain reaction*) de modo a permitir a detecção de mutações de um único nucleotídeo (SNP ou *single nucleotide polymorphism*) em genes que foram previamente associadas ao desenvolvimento de quimiorresistência. Tal detecção pode ser primordialmente feita pelas técnicas de sequenciamento de DNA ou ainda através da utilização de enzimas de restrição num procedimento denominado RFLP ou *restriction fragment length polymorphism*.

O desenvolvimento desses testes foi impulsionado em consequência das limitações dos testes tradicionais *in vivo* e *in vitro*, tendo surgido a partir de extensivas investigações sobre os mecanismos moleculares que propiciavam o fenótipo de resistência no parasita (49). Assim, seja através de clonagem e sequenciamento de genes homólogos a genes implicados na quimiorresistência em outros organismos, ou através de estratégias clássicas de genética reversa para analisar a progênie de cruzamentos entre cepas sensíveis e resistentes, foram identificados os potenciais genes candidatos. Nesse contexto, foram descritas as diferenças na sequência do DNA ou na expressão gênica entre cepas sensíveis e resistentes, permitindo a investigação da associação entre os fenótipos *in vitro* com alterações genéticas, tal qual SNPs ou mesmo alterações na expressão e no número de cópias de tais genes (50, 51).

Desta maneira, relações causais puderam ser estabelecidas entre os genes portando os marcadores identificados e a resistência *in vitro*, que foram confirmadas subsequentemente em estudos de transformação gênica nos quais substituições da sequência de DNA eram induzidas artificialmente, conferindo mudanças de susceptibilidade em cepas de *P. falciparum* cultivadas *in vitro* (52, 53) ou ainda em células de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante (54, 55).

Os subcapítulos que se seguem descreverão especificamente os genes que atraíram o interesse para a elucidação dos mecanismos de resistência de *P. falciparum* à CQ, os genes implicados na resistência de *P. falciparum* e *P. vivax* à SP, assim como a busca de marcadores para *P. vivax* resistentes à CQ e para a recém-descrita quimiorresistência de *P. falciparum* aos derivados da ART (44, 56, 57).

1.6.1. *Pfmdr1*

A elucidação das bases moleculares do fenômeno de resistência às drogas é um tema muito ativo de pesquisa com características multidisciplinares. De uma forma simplista, a quimiorresistência ocorre quando há uma alteração na interação do fármaco com seu alvo molecular e / ou na disposição intracelular daquele medicamento. Portanto, considerando que muitas drogas necessitam se difundir para o interior da célula, não é de forma alguma surpreendente que o fenômeno de transporte tenha sido implicado na geração da quimiorresistência em vários organismos, como células tumorais, bacterianas e também em parasitas como o *P. falciparum* (58).

Curiosamente, as tentativas de explicar a quimiorresistência à CQ do *P. falciparum* revelaram que esse fenômeno compartilhava características fenotípicas muito similares a de linhagens celulares clássicas de câncer de mamíferos (59). Nessas células, a resistência é ocasionada pela superexpressão de genes de múltipla-resistência a drogas (*mdr*), codificando transportadores de membrana como a P-glicoproteína (P-gp) que é capaz de expulsar diversos agentes quimioterápicos, relacionados ou não, para o exterior celular, usando a energia proveniente da hidrólise de moléculas de adenosina trifosfato ou ATP (60, 61).

Por esta razão, vários esforços foram empreendidos na busca de ortólogos ao *mdr* em *P. falciparum*, os quais resultaram na descrição de dois genes, denominados *pfmdr1* e *pfmdr2* (62, 63). Entretanto, considerando que o envolvimento do *pfmdr2* na geração da resistência à CQ foi descartado em função da inexistência de polimorfismos ou mesmo de alterações na expressão gênica entre o fenótipo de cepas resistentes e sensíveis, estudos mais detalhados foram realizados junto ao gene *pfmdr1* (59, 64).

Assim sendo, verificou-se que o gene *pfmdr1* presente no cromossomo 5 do parasita codificava uma proteína de aproximadamente 160 kDa, nomeada Pgh-1, que se localiza na membrana do vacúolo digestivo do parasita - organela intracelular do parasita, local de degradação de moléculas de hemoglobina. A conformação estrutural desta proteína é típica da família de transportadores de membrana ABC, caracterizada por 2 domínios homólogos, cada qual contendo 6 segmentos hidrofóbicos transmembrana, seguidos de um domínio hidrofílico voltado para o citoplasma celular (65).

De fato, os polimorfismos identificados nos códons 86, 184, 1034, 1042 e 1246 no gene *pfmdr1* foram implicados na modulação de respostas *in vitro* à CQ, assim como na susceptibilidade a outros antimaláricos como a QN, AQ, halofantrina, MQ e ART (66-71) (Figura 1.4). Somada à ocorrência de mutações, a amplificação do gene *pfmdr1* também foi associada com resistência *in vitro* à QN, MQ, LM, ART e halofantrina (72, 73), assim como a recrudescência *in vivo* com a terapia artesunato-MQ, no Camboja (74).

Dentre estas mutações, a troca do aminoácido selvagem asparagina (N) para a tirosina (Y) no códon 86 foi estudada amplamente com o uso de técnicas de PCR para detectar esta mutação, em parasitas avaliados através de estudos *in vitro*, *in vivo* ou ainda em isolados de campo provenientes de diferentes países com faixas variáveis de resistência à CQ (75). Entretanto, o papel dessa mutação não foi decisivo como um preditor da resistência à CQ porque, em alguns estudos, foi encontrada uma forte associação entre a presença de 86Y e a resistência à CQ (76-80), enquanto em outros tal associação não foi evidenciada (81-84). Com efeito, baseado em um estudo de transfecção alélica, ficou constatado que as mutações no gene *pfmdr1* não eram suficientes para causar a resistência à CQ, mas poderiam modular a resposta à CQ, assim como às outras drogas antimaláricas (68).

Atualmente, acredita-se que a molécula de Pgh-1 atue como um importador de drogas do citoplasma para o vacúolo digestivo, de modo que as diferentes mutações afetam tal capacidade de importação podendo contribuir, portanto, para uma acumulação intracelular diferencial, a qual poderia comprometer a susceptibilidade do parasita, dependendo do fármaco em questão (60).

Ademais, a influência das mutações do *pfmdr1* foi estendida também às terapias combinadas quando surgiram recentes relatos de seleção *in vivo* de alguns alelos do gene *pfmdr1*, durante acompanhamentos da eficácia terapêutica aos ACTs. Notadamente, podemos citar os alelos N86 (asparagina no códon 86), 184F (fenilalanina no códon 184) e D1246 (aspartato no códon 1246) que estavam presentes em parasitas isolados em novas ocorrências de parasitemia (recorrências), observadas após o tratamento com a combinação arteméter-lumefantrina (AL) (43, 85-88). Esse fato poderia representar uma seleção inicial de parasitas com potencial para resistência, visto que os mesmos foram isolados num momento em que a concentração da droga parceira (LM) era subterapêutica (89).

A despeito da utilização massiva da CQ por muitos anos, o fenômeno de quimiorresistência só surgiu 12 anos após do início de sua utilização em 1945. Esse fato indicava que muito provavelmente a resistência a CQ se tratava de um fenômeno genético complexo, no qual múltiplos mediadores estariam envolvidos e interagindo, um fenômeno molecular conhecido como epistasia (90-92).

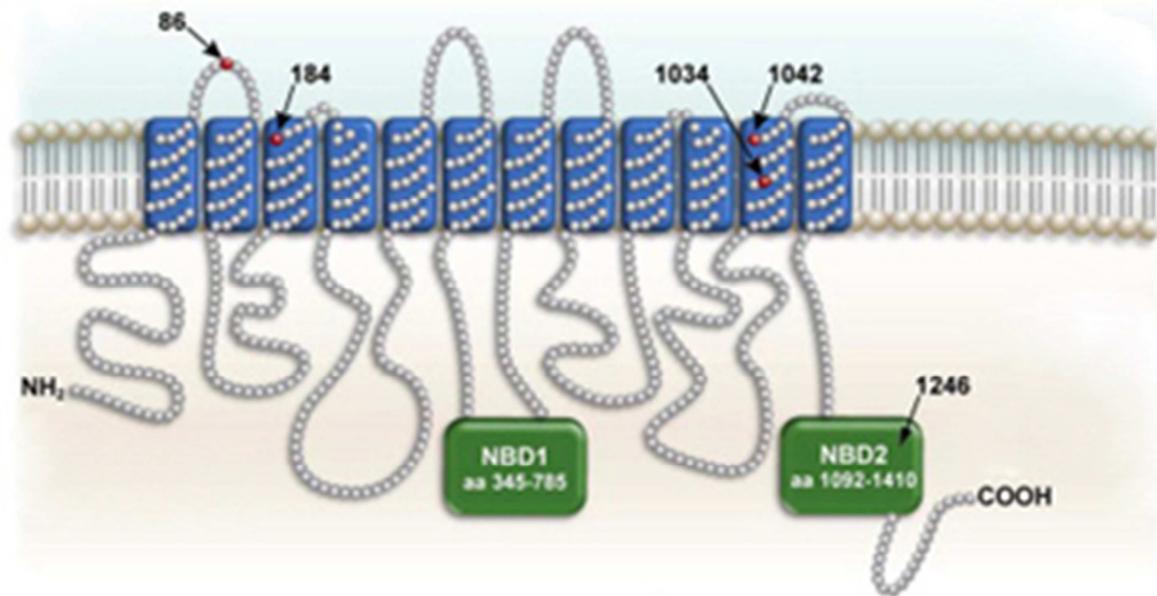


Figura 1.4: Topologia predita da Pgh-1, codificada pelo *pfmdr1*. As setas indicam os sítios polimórficos associados com alterações na resposta a drogas em *P. falciparum*. Em verde observamos os sítios de ligação a moléculas de ATP (NBD ou *nucleotide binding domain*). A parte superior da figura representa o interior do vacúolo digestivo e a parte inferior representa o citoplasma da célula parasitária. Figura adaptada de Sanchez *et al*, 2010 (93).

1.6.2. *Pfcr*

Enquanto isso, outro candidato promissor para a quimiorresistência à CQ em *P. falciparum* era identificado de forma análoga aos estudos sobre o *pfmdr1* (64). Utilizando uma técnica de cruzamento entre duas cepas fenotipicamente distintas (94) e, com o auxílio de mapeamento dos sítios de recombinação da progênie com RFLP (95, 96), foi identificada uma região com 36 kb no cromossomo 7, que possuía várias fases de leitura em potencial (ORFs), denominadas *cg*, em homenagem a motivação de busca de um candidato a marcador para a resistência à CQ, ou *candidate gene*.

Na tentativa de localizar polimorfismos que poderiam se correlacionar com o fenótipo de resistência, tais ORFs foram avaliadas em isolados de *P. falciparum* de todo o mundo, ocasião em que um gene, *cg2*, foi fortemente associado, embora não completamente, com a ocorrência de quimiorresistência (97). Entretanto, estudos posteriores de transfecção alélica mostraram que o *cg2* não influenciava o nível de susceptibilidade dos parasitas transformados (98). Porém, em função da forte associação observada naquela região, acreditava-se que outro gene, próximo ao *cg2*, poderia propiciar a quimiorresistência (64).

Nesse momento, uma ORF altamente fragmentada em 13 éxons foi localizada nas sequências de DNA adjacentes, cujos polimorfismos estavam perfeitamente associados ao fenótipo de quimiorresistência à CQ em 40 cepas de *P. falciparum* avaliadas (99). Este gene, batizado de *pfcr* (*chloroquine resistance transporter*), foi caracterizado como um transportador de 45 kDa com 10 domínios trespassando a membrana do vacúolo digestivo do parasita, contendo sítios que podem ser fosforilados cuja função parece ser a de envio dessa proteína à membrana do vacúolo (99, 100) (Figura 1.5).

O *pfcr* se mostrou polimórfico em vários códons, ao passo que uma mutação no códon 76 (K76T, trocando uma lisina para treonina) era encontrada consistentemente em parasitas com perfil de quimiorresistência *in vitro*. De fato, essa mutação foi proposta como o marcador molecular para a avaliação da susceptibilidade de isolados à CQ (101). Em estudos subsequentes, à exceção de alguns (81, 102), a 76T estava associada a falha terapêutica à CQ (82, 103-106) e, além desta, outras mutações nos códons adjacentes como 72, 74 e 75 também foram coligadas à geração de resistência (99).

Em relação à K76T, esta mutação é tida como a responsável pelo mais provável mecanismo que ocasiona o fenótipo de quimiorresistência à CQ em *P. falciparum*. A troca de carga eletrostática ocasionada pela mudança do aminoácido lisina (K) para treonina (T) propiciaria que a molécula de *pfcr* mutada mediasse o efluxo da CQ para fora do vacúolo digestivo, afastando-a, desta maneira, do seu sítio de ação (93).

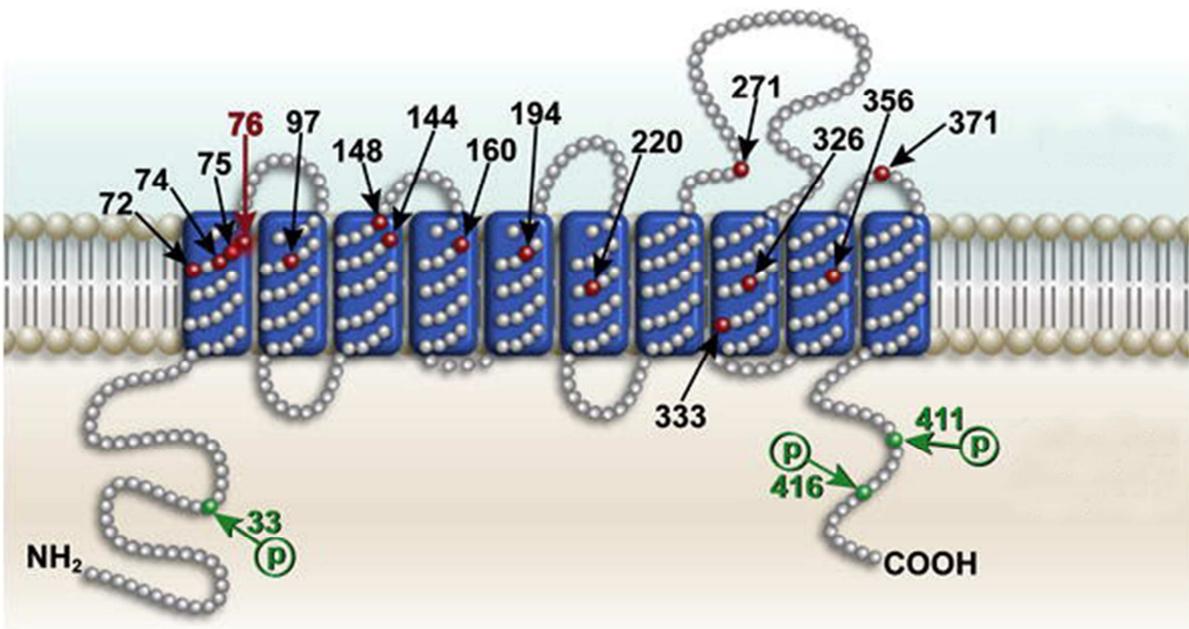


Figura 1.5: Topologia predita do transportador *pfcr1* de *P. falciparum*. As setas pretas indicam os múltiplos sítios polimórficos. A mutação chave K76T é indicada por uma seta vermelha e os sítios de fosforilação são indicados por setas verdes. A parte superior da figura representa o interior do vacúolo digestivo e a parte inferior representa o citoplasma da célula parasitária. Figura adaptada de Sanchez *et al*, 2010 (93).

É importante mencionar que, frequentemente, as mutações que ocasionam a resistência também provocam efeitos deletérios ao metabolismo celular, visto que as drogas utilizadas na quimioterapia têm normalmente por alvo proteínas estruturais e proteínas atuantes no metabolismo basal, associadas ao crescimento celular. Por isso, na ausência da pressão seletiva da droga, os parasitas quimiorresistentes, quando comparados com as cepas sensíveis, apresentam uma redução de *fitness*, afetando sua sobrevivência e multiplicação (107).

Entretanto, estudos epidemiológicos sugeriam que, uma vez desenvolvida, as formas resistentes de *P. falciparum* poderiam persistir até mesmo em condições livres de droga, pois outras mutações adicionais e compensatórias lograriam aliviar o custo daquelas associadas com a resistência (108). De fato, foi o que se verificou na maioria das áreas afetadas, à exceção de alguns países como o Malawi na África, onde a prevalência de 76T declinou até zero após 8 anos da remoção da pressão seletiva gerada pela CQ (109-112), fenômeno esse que foi apelidado de “reversão” da resistência.

Tal fato é semelhante ao ocorrido no Quênia, em Kilifi, e também na China, na província de Hainan, onde houve uma redução marcante na prevalência de 76T e na quimiorresistência *in vitro*, após 7 e 22 anos da remoção da CQ nesses países, respectivamente (113, 114). Ao menos no Malawi, esse evento não teria se originado pela reversão da mutação (*back mutation*), mas sim pela reexpansão de populações sensíveis (115, 116).

1.6.3. *Pfdhfr* e *Pfdhps*

À medida que os parasitas resistentes à CQ foram se espalhando pelo mundo, a combinação Fansidar® foi se tornando a droga de escolha para o tratamento da malária não complicada por *P. falciparum*. Essa combinação é caracterizada pelas drogas sulfadoxina e pirimetamina (SP), as quais foram desenvolvidas para atuar sinergicamente em duas etapas bem-caracterizadas da via bioquímica da síntese do folato no parasita. A sulfadoxina inibe a enzima bifuncional pirofosfoquinase-dihidropteroato sintetase (*pppk-dhps*) e a pirimetamina inibe a enzima bifuncional dihidrofolato redutase-timidilato sintase (*dhfr-ts*), pois, ao contrário do que ocorre no hospedeiro humano, os parasitas da malária são independentes de uma fonte exógena de folato, sendo eles próprios capazes de sintetizar esse cofator, que é essencial para a síntese de DNA (117).

Notadamente, ao surgimento extremamente rápido da quimiorresistência à SP, foram investigados diferentes mecanismos que pudessem ocasionar esse fenômeno, mas a hipótese que se revelou mais plausível era de que se tratavam de enzimas alteradas estruturalmente, com afinidade reduzida às drogas (118, 119).

Logo após o isolamento inicial dos genes codificantes das enzimas *pfdhfr* e *pfdhps* de *P. falciparum* presentes nos cromossomos 4 e 8, respectivamente (117, 118, 120), as bases moleculares da resistência à SP começaram a ser esclarecidas. Ao avaliar as sequências de DNA tanto no gene *pfdhfr* como no *pfdhps* em diferentes isolados com fenótipos de sensibilidade e quimiorresistência, foi possível identificar as mutações capazes de alterar o sítio ativo dessas enzimas, as quais estavam diretamente envolvidas na geração de quimiorresistência (118, 119).

Assim, constatou-se que a SNP no códon 108 (serina para asparagina – S108N) do gene *pfdhfr* era a mutação precursora que ocasionava a redução da susceptibilidade *in vitro* à pirimetamina, ao passo que mutações adicionais nos códons 50 (cisteína para arginina – C50R), 51 (asparagina para isoleucina – N51I), 59 (cisteína para arginina – C59R) e 164 (isoleucina para leucina – I164L) aumentavam progressivamente o nível de resistência, podendo ser seguidas por mutações no gene *pfdhps*. Igualmente, as mutações nos códons 436 (serina para alanina, fenilalanina ou cisteína – S436A/F/C), 437 (alanina para glicina – A437G), 540 (lisina para ácido glutâmico – K540E), 581 (alanina para glicina – A581G) ou ainda 613 (alanina para treonina ou serina – A613T/S) no gene *pfdhps* aumentavam o nível de resistência *in vitro* à sulfadoxina (121) e, conseqüentemente, ainda mais o nível de resistência à SP. De uma forma simplista, é maior o grau de quimiorresistência quanto maior for o número de mutações nesses genes.

Já *in vivo*, a combinação das mutações nos códons 51, 59 e 108 do gene *pfdhfr*, em conjunto com as mutações nos códons 437 e 540 do gene *pfdhps*, formando o dito “quíntuplo-mutante”, foi considerada como uma forte preditora para a falha terapêutica à SP em países da África (122-126).

Curiosamente, tal qual aos já mencionados relatos de queda de prevalência da mutação 76T no gene *pfcr*t quando da extinção da pressão seletiva da CQ, a remoção da SP no Peru levou a um decréscimo na frequência de mutantes nos genes *pfdhfr* e *pfdhps* (127, 128), assim como na de mutantes para o gene *pfdhps* em Moçambique (129).

1.6.4. *Pfatpase6*

Anos antes do surgimento das primeiras evidências de quimiorresistência às ARTs, já haviam sido empreendidas várias tentativas para compreender a base molecular dessas drogas, resultando em múltiplas hipóteses, muitas vezes controversas, a respeito do mecanismo de ação (130). Diversas moléculas foram propostas como alvos moleculares, dentre as quais se destacou a enzima translocadora de íons de cálcio dependente de ATP, presente na membrana do retículo endoplasmático do parasita, a qual foi denominada SERCA e era codificada pelo gene *pfatpase6*, presente no cromossomo 1 do *P. falciparum* (131).

A hipótese baseada no *pfatpase6* foi consubstanciada por alguns estudos nos quais foram relatados a inibição da atividade de SERCA pela ART, quando essa enzima foi expressa de forma heteróloga em oócitos de *Xenopus laevis* (131), e a supressão da ação da ART por influência de uma mutação específica, de leucina para ácido glutâmico no resíduo 263 (L263E), localizada na vizinhança ao provável sítio de ligação da enzima com essa droga (132).

Nesse cenário, o gene *pfatpase6* foi considerado como um possível portador de um marcador molecular e vários estudos foram realizados na busca de potenciais polimorfismos que pudessem ser associados a um fenótipo de resistência. Em 2005, na ocasião do primeiro relato proveniente da Guiana Francesa no qual parasitas de *P. falciparum* apresentavam uma reduzida sensibilidade *in vitro* ao arteméter, tal fenômeno foi associado a uma mutação no códon 769 de serina para asparagina (S769N) no próprio gene *pfatpase6* (39). Contudo, à exceção de uma única amostra, sensível à dihidroartemisinina (133), a mutação 769N não foi encontrada em nenhuma das análises realizadas posteriormente (86, 134-137).

Nem mesmo no momento da detecção de parasitas quimiorresistentes na Ásia, nenhuma alteração genética no gene *pfatpase6* que pudesse estar associada ao fenótipo de resistência foi detectada (44, 57, 137). Além disso, verificou-se que esse gene apresentava uma diversidade natural bem maior do que se presumia (138-140), fato que indubitavelmente dificultou o reconhecimento e a validação de mutações no gene *pfatpase6* como marcadores moleculares da quimiorresistência às ARTs.

1.6.5. *Pvmdr1*

Com o advento da resistência à CQ em *P. vivax*, a procura por marcadores moleculares se focou naturalmente no conhecimento adquirido da quimiorresistência de *P. falciparum*. Dessa forma, foram descritos os genes ortólogos, candidatos a apresentarem marcadores moleculares como o *pvcr-t-o* e *pvm-dr1* (141-143), para os quais foi investigada uma possível associação entre a existência de mutações e a geração de resistência (47).

Com relação ao *pvcr-t-o*, o primeiro gene a ser estudado, embora tenha sido demonstrado através de expressão heteróloga que a molécula codificada pelo mesmo participa no transporte da CQ pela membrana do vacúolo digestivo (144), não foi observada associação entre a presença de mutações com o fenótipo quimiorresistente. Esse fato sugeriu que o mecanismo que ocasiona a resistência a CQ em *P. vivax* pudesse ser diferente daquele observado em *P. falciparum* (141).

De fato, nem mesmo após o isolamento e a caracterização do *pvm-dr1* localizado no cromossomo 10, a existência de mutações pôde ser correlacionada aos fenótipos de resistência. Numa avaliação de sequências de DNA de diferentes isolados apresentando distintas susceptibilidades à CQ, não foi encontrada associação entre as diferentes mutações e o fenótipo resistente (143). Especificamente, o envolvimento da mutação Y976F (tirosina para fenilalanina no códon 976), inicialmente proposta como um marcador na Ásia (145, 146), não foi atestado em outros locais, dado as descrições conflitantes que observaram uma discrepância entre a frequência de ocorrência desta mutação e a prevalência de resistência clínica à CQ (147). Por conseguinte, até o momento não existem evidências suficientes que tenham possibilitado o credenciamento de um marcador molecular genuíno de resistência à CQ em parasitas de *P. vivax*.

1.6.6. *Pvdhfr*

Os antifolatos, notadamente a SP, foram e têm sido muito importantes na terapia antimalárica em função do seu baixo custo e da sua segurança para grávidas. Até recentemente, porém, considerava-se que os parasitas de *P. vivax* eram naturalmente refratários ao tratamento com antifolatos (148), fato esse que se mostrou incorreto ao serem analisadas evidências de susceptibilidade *in vivo* (149), como também de quimiorresistência induzida *in vivo* (150) por drogas como a pirimetamina em pacientes portando o *P. vivax* (47, 151).

A base molecular responsável por esse fenômeno começou a ser esclarecida em 1998, quando se deu o isolamento e caracterização do gene codificante para a enzima *dhfr* presente no cromossomo 5 de *P. vivax*. As primeiras comparações de sequências de DNA entre isolados com diferentes fenótipos revelaram a ocorrência de SNPs em três códons: 58 (serina para arginina – S58R), 117 (serina para asparagina – S117R) e 173 (isoleucina para leucina – I173L), que curiosamente correspondiam aos resíduos 59, 108 e 164 associados com a resistência à pirimetamina em *P. falciparum* (152, 153).

Posteriormente, quando do isolamento do gene *pvdhps* (154), a análise das sequências de DNA também revelou diferentes mutações associadas à resistência para sulfadoxina em *P. vivax*, demonstrando novamente a similaridade do mecanismo que ocasiona à quimiorresistência à SP para essas duas espécies de *Plasmodium*.

Por causa daquela percepção inicial de refratariedade, a SP nunca foi preconizada para o tratamento da malária vivax. Entretanto, vários autores verificaram a frequente ocorrência de mutações, tanto no gene *pvdhfr* como no *pvdhps*, em isolados clínicos obtidos

de várias localidades (155-160), fato esse que possivelmente estaria ligado ao uso contínuo da SP para tratar casos de malária por *P. falciparum* resistente à CQ. Com efeito, em áreas onde coinfeções por *P. falciparum* e *P. vivax* são comuns e frequentemente subdiagnosticadas, uma pressão incidental poderia ter selecionado mutações nos supracitados genes de *P. vivax* (47).

1.7. Panorama da quimiorresistência no Brasil

No Brasil, o surgimento do primeiro relato científico de quimiorresistência se deu no início do século XX, quando Arthur Neiva relatou a sua dificuldade em tratar casos de malária falciparum com o quinino (161). Cerca de 40 anos depois, a resistência à CQ foi notificada timidamente em um congresso não obtendo grande repercussão (162) até que, no Rio de Janeiro, o médico José Rodrigues da Silva descreveu casos de *P. falciparum* resistentes à terapia com CQ, em indivíduos que haviam retornado de construção de estradas nos estados de Rondônia, Pará, Maranhão e Bahia (163).

A partir desses relatos, foram anunciados mais casos de *P. falciparum* resistentes à CQ em Rondônia (164), tal qual em outros estados brasileiros como Acre, Roraima, Amazonas (165), Mato Grosso e Amapá (166), demonstrando que tais parasitas resistentes estavam de fato disseminados pelo território brasileiro (167).

Em seguida, pouco tempo após o início do uso da combinação SP para o tratamento de malária falciparum resistente à CQ, foi relatado o aparecimento de parasitas resistentes à SP em pacientes provenientes de Goiás (28). E, logo após, um grau importante de quimiorresistência foi descrito de forma contínua em outros estados do Brasil (168-170), levando a um nível de, no mínimo, 90% de resistência por volta de 1987 (171). Desse momento em diante, o nível de falha terapêutica à CQ também foi aumentando chegando a atingir até 100% (172-179), fato esse que levou alguns autores a concluir que os isolados de *P. falciparum* no Brasil eram completamente resistentes à CQ e à SP (180).

Diferentemente de *P. falciparum*, o surgimento da quimiorresistência à CQ em *P. vivax* no Brasil foi observado bem mais tarde e ainda hoje há escassos dados publicados

sobre este assunto. A primeira descrição clínica genuína da resistência à CQ proveio de um paciente atendido no Instituto de Medicina Tropical do Amazonas em 1999 (181), a qual foi seguida por outro relato do mesmo grupo de um isolado de *P. vivax* resistente à CQ e também à primaquina - uma droga hipnozoítica usada em conjunto com a CQ (182). Depois disso, somente um único estudo de acompanhamento *in vivo* foi publicado, registrando uma prevalência de 10.1% de casos de quimiorresistência à CQ no Brasil, no estado do Amazonas (183).

De fato, devido à sua importância no controle da malária, o monitoramento da resistência no Brasil se iniciou nos anos 80 com a utilização de testes *in vitro* (165, 166, 175, 184, 185), ou testes *in vitro* acompanhados das observações feitas *in vivo* (173, 176, 179, 186). Embora a genotipagem molecular de *P. falciparum* tenha se iniciado na década de 90, um número reduzido de estudos foi realizado.

As primeiras análises moleculares se basearam na avaliação dos polimorfismos dos genes *pfdhfr* e *pfdhps* (187, 188), demonstrando a presença das mutações 50R, 51I, 108N e 164L (*pfdhfr*), além das mutações 437G, 540E e 581G (*pfdhps*). No caso do gene *pfmdr1*, foi caracterizada a presença de SNPs como a 184F, 1034C, 1042D e 1246Y (84, 178) e, anos mais tarde, quando a resistência à CQ foi atribuída ao gene *pfcr1*, a genotipagem das principais SNPs também foi realizada, apontando a presença das mutações 72S, 74I, 75E e 76T (180, 189, 190) em diferentes haplótipos. Recentemente, uma nova caracterização foi conduzida, revelando a presença da mutação 76T no gene *pfcr1*, além das SNPs 1042D e 1246Y no gene *pfmdr1*, assim como a ausência da mutação S769N no *pfatpase6* (41).

Em relação a *P. vivax*, somente há pouco tempo foram iniciados os estudos de genotipagem molecular, embora as análises conduzidas tenham utilizado um número amostral muito limitado. Nesses trabalhos iniciais, a sequência de DNA do gene *pvmdr1* foi descrita para 3 isolados brasileiros (143) e as sequências de DNA do gene *pvmdr1* e *pvcr1-o* foram descritas para mais 7 isolados brasileiros (191), apontando a ocorrência de 24 e 7 SNPs, respectivamente para cada um desses genes.

2. Objetivos

Visto que a ocorrência de quimiorresistência é um dos fatores que dificultam diretamente o controle da malária (192), há uma necessidade premente de monitoramento regular da eficácia de drogas. Notoriamente, os marcadores moleculares representam ferramentas de saúde pública de grande potencial com capacidade de inferir e revelar mudanças nos padrões de susceptibilidade e / ou resistência dos isolados de *Plasmodium*, pois independem da observação fenotípica.

Por esta razão e considerando que os estudos de genotipagem molecular no Brasil são escassos, nosso objetivo geral se constituiu na realização de um estudo descritivo sobre a ocorrência e prevalência de mutações nos genes previamente associados à quimiorresistência em isolados de *P. falciparum* e *P. vivax* (*pfcr1*, *pfmdr1*, *pfdhfr*, *pfdhps* e *pvdhfr*) assim como nos genes potencialmente associados com a resistência para essas duas espécies (*pfatpase6* e *pvmdr1*), de forma a contextualizar o Brasil no panorama mundial.

Para tal, empregamos como estratégias reações de PCRs convencionais do tipo *single* ou *nested*, seguidas da técnica de sequenciamento de DNA dos produtos de PCR, para permitir uma avaliação da existência ou ausência das principais mutações previamente descritas para esses genes, em amostras de *P. falciparum* e *P. vivax* coletadas nos estados do Amazonas, Pará e Rondônia.

3. Resultados

Artigo 1: Chloroquine and sulphadoxine-pyrimethamine sensitivity of *Plasmodium falciparum* parasites in a Brazilian endemic area.

Publicado na revista Malaria Journal, em 14 de Julho de 2009, no volume 8, artigo de número 156.

Motivados pelos recentes relatos na África e na Ásia do ressurgimento de populações sensíveis à CQ de *P. falciparum*, além da queda de mutantes associados com a resistência à SP, nosso objetivo inicial foi avaliar o perfil da população de parasitas após a retirada dessas drogas, através da apreciação de amostras provenientes de duas localidades brasileiras, coletadas no estado de Rondônia no ano de 2002 e no Pará em 2004.

Destarte, ao investigarmos a ocorrência de mutações nos genes *pfcr1*, *pfdhfr* e *pfdhps* foi possível detectar pela primeira vez no Brasil um isolado de *P. falciparum* proveniente do estado do Pará apresentando um perfil molecular de sensibilidade CVMNK no gene *pfcr1* e ACNCSVI no gene *pfdhfr*. Além disso, ao confrontarmos os resultados de nosso estudo com um estudo retrospectivo realizado em 1998, pudemos observar uma redução no número de mutações associadas com a resistência à SP no gene *pfdhps*, em isolados do estado de Rondônia.

Artigo 2: Characterisation of *pvmdr1* and *pvdhfr* genes associated with chemoresistance in Brazilian *Plasmodium vivax* isolates.

Publicado nas Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, na edição de novembro de 2009, no volume 104, número 7, páginas 1009-1011.

Por outro lado, baseados nos relatos contemporâneos do surgimento de quimiorresistência à CQ em parasitas de *P. vivax* no Brasil, nós tivemos como objetivo qualificar o perfil de isolados do Pará coletados em 2004 com relação à ocorrência de mutações no gene *pvmdr1*, potencialmente associado com a resistência à CQ, assim como nos marcadores de resistência à SP presentes no gene *pvdhfr*, que foram muito pouco ou nunca estudados neste país.

A análise do gene *pvmdr1* num conjunto inicial de 28 amostras revelou o total predomínio de mutações no códon 976, um marcador preliminarmente proposto para a resistência à CQ, a despeito do baixo percentual de quimiorresistência relatado no Brasil por métodos *in vivo*. Além disso, foram identificadas mutações adicionais nos códons 1022 e 1070. Já para o gene *pvdhfr*, foram observados 2 haplótipos, duplo-mutante FRTNI e triplo-mutante FRTNL, assim como uma mutação S116G recém-descrita. O haplótipo selvagem e, portanto, sensível à combinação SP, não foi encontrado nessa análise.

Artigo 3: Brazilian *Plasmodium falciparum* isolates: investigation of candidate polymorphisms for artemisinin resistance before introduction of artemisinin-based combination therapy.

Publicado na revista Malaria Journal, em 8 de dezembro de 2010, no volume 9, artigo de número 355.

Dando continuidade à caracterização das populações de *P. falciparum* no Brasil, e considerando a importância das terapias baseadas na artemisinina para o controle da malária, o objetivo desse trabalho foi estabelecer um registro de base da ocorrência e / ou prevalência de mutações nos genes *pfmdr1* e *pfatpase6* não relacionadas ao uso de ACTs, através da avaliação de isolados coletados anteriormente à instituição destas combinações no Brasil, que foram introduzidas em 2007. Nesse trabalho, foram avaliadas amostras coletadas em Rondônia no ano de 2002, no Pará em 2004 e no Amazonas em 2006-2007.

A análise desses genes permitiu a identificação de um haplótipo prevalente NEF/CDVY no *pfmdr1*, assim como identificação de mutantes em um único códon (630 ou 402) e duplo-mutantes (630 e 402) no caso do *pfatpase6*. Não foi encontrada a mutação 769N, associada com a diminuição da susceptibilidade ao arteméter.

4. Discussão

Os parasitas da malária pertencem ao filo *Apicomplexa* que é composto por microorganismos intracelulares obrigatórios. Para conseguirem progredir com sucesso entre os diferentes hospedeiros e suas células, esses parasitas foram habilitados com uma capacidade notável de adaptação que permite uma transformação extensa entre os diferentes estágios biológicos, crítica para manter a sua sobrevivência na natureza (193).

Para tal, o genoma dos plasmódios apresenta uma extensiva plasticidade, caracterizada pela perda frequente de funções dispensáveis em condições não seletivas, polimorfismos em regiões subteloméricas, bem como a variação rápida em matrizes repetitivas, características de genes antigênicos sob pressão seletiva (194, 195). Com efeito, a adaptação dos parasitas à terapêutica antimalárica tem se mostrado bem sucedida. Em apenas algumas décadas, os plasmódios desenvolveram resistência a praticamente todas as drogas introduzidas no combate à doença, até mesmo às recentemente introduzidas ARTs (44, 57).

Não obstante, como já mencionado, as mutações que originam a resistência também podem ocasionar efeitos colaterais e deletérios ao metabolismo celular e, por isso, na ausência da pressão seletiva da droga, os parasitas quimiorresistentes, ao competir com cepas sensíveis, apresentariam um menor *fitness* que afetaria a sua sobrevivência e permitiria o ressurgimento de populações sensíveis. Desse modo, alguns relatos parecem evidenciar essa hipótese demonstrando a flutuação de genótipos de susceptibilidade e quimiorresistência em áreas de transmissão sazonal (196, 197), e mesmo a diminuição da prevalência de parasitas portando mutações para resistência à CQ e / ou SP quando da

retirada de drogas, fenômeno esse que está sendo observado de forma acentuada no Malawi (109-112), um país de transmissão estável e intensa localizado no sudeste africano.

Em termos epidemiológicos, em áreas de transmissão contínua de malária é frequente a geração da chamada premunição ou imunidade clínica, que é caracterizada pela geração de uma resposta imune parcial que controla, mas não elimina completamente os parasitas, de forma que os indivíduos se tornam assintomáticos raramente adoecendo (198). Por conseguinte, não são normalmente tratados com drogas antimaláricas, diminuindo a pressão seletiva sobre as populações parasitárias. Alguns autores até mesmo consideraram que os indivíduos assintomáticos poderiam se configurar como um reservatório de parasitas sensíveis (116).

Nesse contexto, o achado de um isolado selvagem em Paragominas, no estado do Pará (artigo 1), uma área rural onde a ocorrência de migração é extremamente improvável, demonstra que as populações selvagens para o gene *pfcr1* e o *pfdhfr* não foram completamente eliminadas no Brasil. De fato, sob o ponto de vista evolutivo esse achado é vantajoso, pois a existência de variação genética é um elemento necessário para a atuação da seleção natural que pode propiciar, no futuro, o repovoamento de parasitas susceptíveis à CQ e SP no Brasil.

Aliados a esse achado, após a publicação do artigo de número 1, nós conseguimos detectar mais 2 isolados provenientes da cidade de Manaus, no Amazonas, apresentando haplótipos de sensibilidade CVMNK para o gene *pfcr1*, dos quais um deles também portava um perfil sensível para os genes *pfmdr1* e *pfdhps* (dados em preparação para publicação). Embora não possamos afirmar se esses parasitas pertenciam a populações nativas, visto que a cidade de Manaus é marcada por um fluxo intenso de indivíduos provenientes tanto de outras áreas brasileiras como de países vizinhos, esse fato parece corroborar a nossa

proposição de que, no futuro, possa haver um ressurgimento de parasitas susceptíveis à CQ e SP no Brasil.

Por outro lado, ao compararmos os resultados de nosso trabalho obtidos com os resultados de um estudo retrospectivo que avaliou isolados coletados no estado de Rondônia em 1998 (188), pudemos observar uma redução no número de mutações associadas com a resistência à SP no gene *pfdhps*. Portanto, é de se salientar a importância da realização de estudos de genotipagem molecular em bases regulares, para permitir o monitoramento através de avaliações constantes das tendências ou modificações nos padrões de susceptibilidade a drogas que são, ou mesmo as que já foram utilizadas na terapêutica antimalárica para *P. falciparum*, e que talvez no futuro possam reintegrar o arsenal de combate a esta doença.

Já em relação ao *P. vivax*, para que estudos de monitoramento possam ser utilizados na avaliação da eficácia do atual tratamento, é preciso que se estabeleça um marcador molecular seguro. Isso seria especialmente vantajoso para essa espécie em particular, porque existem problemas inerentes à detecção de quimiorresistência *in vivo* e não existem métodos exequíveis para cultivo contínuo de isolados *in vitro*.

Com efeito, apesar de alguns esforços terem sido empreendidos na identificação de um marcador para a CQ em *P. vivax*, o que parece ter sido demonstrado até o momento é que mutações nos ortólogos *pvcr-t* e *pvmdr1* não estariam associadas com a geração de resistência em *P. vivax* (141, 143, 147). De fato, também a nossa análise de caracterização do gene *pvmdr1* num pequeno conjunto inicial de 28 amostras (artigo 2) sugeriu que ao menos a mutação no códon 976, preliminarmente proposta como marcador de resistência à CQ na Ásia, não seria válida para o monitoramento dos isolados no Brasil, dada a sua alta prevalência, em franco contraste com o baixo percentual de resistência relatado no estado

do Amazonas (199) e com a inexistência de relatos públicos ou mesmo informais de quimiorresistência à CQ no estado do Pará (José Maria de Souza, comunicação pessoal, 2011).

Ademais, ao analisarmos as sequências completas de DNA do gene *pvmdr1* para os três primeiros isolados de *P. vivax* avaliados no Brasil, as quais foram publicadas no *Genbank* sob os números de acesso AY571981, AY571982 e AY571983, verificamos que também no estado de Rondônia, local de origem de tais amostras, a mutação 976F já estava presente em cepas que eram declaradamente sensíveis à CQ (143). Até o momento, a única exceção a esses achados foi encontrada no estado do Acre, onde a maioria dos isolados apresentava o alelo selvagem para o mesmo códon (200).

Portanto, têm se postulado que o mecanismo molecular de quimiorresistência para essa droga seja diverso do de *P. falciparum* e que talvez outros mecanismos como o aumento do nível de expressão dos genes *pvcr1-o* e *pvmdr1* (37) ou mesmo a amplificação genética do *pvmdr1* (146) possam estar envolvidos no fenótipo de quimiorresistência do *P. vivax* à CQ (47, 141, 191).

Recentemente, por ocasião do segundo sequenciamento completo do genoma de um isolado de *P. vivax* (proveniente do Peru), identificou-se um novo gene pertencente à família de transportadores ABC, o qual foi denominado de *pvmrp1* (201). Tal gene é um ortólogo ao gene *pfmrp1* potencialmente envolvido na quimiorresistência a drogas como CQ, QN, ART e SP em *P. falciparum* (202, 203). Durante esse sequenciamento foi detectado um alto nível de polimorfismos em comparação com a cepa de referência Sal-1, o que alude à ocorrência de um processo de seleção e torna esse gene um possível candidato para associação com resistência a diferentes drogas, para o qual investigações futuras mais detalhadas seriam de grande valor (201).

Em contrapartida, apesar de infecções por *P. vivax* nunca terem sido tratadas com a SP, já foram definidos os marcadores moleculares para a quimiorresistência a essa combinação. Curiosamente, os padrões de mutações nos genes *pvdhfr* e *pvdhps* refletem o nível de intensidade para o qual a SP foi utilizada no passado para o tratamento de malária falciparum resistente (151), o que presumidamente ocorreu devido à existência de infecções mistas e subdiagnosticadas por *P. vivax* e *P. falciparum*, nas quais parasitas de *P. vivax* foram expostos à pressão seletiva exercida pela SP, ou ainda pelo amplo uso de antifolatos similares à SP como o cotrimoxazol (trimetoprim e sulfametoxazol) para o tratamento de infecções bacterianas. No Brasil, como exposto no artigo 2, encontramos haplótipos de *pvdhfr* portando 2 ou 3 SNPs (58R e 117N, ou 58R, 117N e 173L), tal qual em áreas de extensa utilização da SP como Ásia e partes da África (151). Desse modo, considerando a emergência de quimiorresistência à CQ, é fundamental conhecer a diversidade e a prevalência de haplótipos associados, caso um dia se cogite utilizar a SP para o tratamento da malária vivax.

Igualmente importante é o estabelecimento de um registro basal de mutações em genes potencialmente associados ao desenvolvimento de quimiorresistência às drogas empregadas em ACTs para o tratamento de *P. falciparum*, o qual poderá ser utilizado em estudos futuros para verificação de uma eventual modificação nos perfis de susceptibilidade das populações parasitárias em circulação no Brasil. Na literatura, encontramos menções ao *pfatpase6*, já mencionado como um gene candidato, potencialmente associado com a resistência às ARTs, e também ao notório gene de multirresistência *pfmdr1*.

Em relação este último, sabe-se que ele media alterações na resposta a vários antimaláricos. Já foi mostrado que os diferentes polimorfismos ocasionam alterações distintas, por vezes opostas, na resposta de parasitas de *P. falciparum* para várias drogas.

Como exemplo, podemos citar o códon 86, cujo alelo mutado 86Y foi associado tanto com a quimiorresistência à CQ (76-80) quanto a um aumento na sensibilidade à MQ e à ART (66), enquanto que, inversamente, o alelo selvagem N86 foi associado a uma diminuição da sensibilidade à ART, MQ (66), assim como à LM (67). Quanto às terapias baseadas na ART, algumas combinações específicas de alelos tais quais N86, 184F e D1246 ou mesmo 86Y, Y184 e 1246Y têm sido encontradas em parasitas isolados de recorrências, que foram observadas durante o acompanhamento *in vivo* da eficácia terapêutica de ACTs como AL ou artesunato-AQ (43, 85-88, 204, 205).

Logo, a caracterização desse gene em conjunto com a avaliação de polimorfismos no gene *pfatpase6* em amostras coletadas anteriormente à introdução das ACTs no Brasil (artigo 3), propiciou a identificação de um haplótipo de *pfmdr1* majoritário (NEF/CDVY), a detecção de duas mutações 402V e 630S e também a inexistência do alelo 769N no gene *pfatpase6*, alelo este cuja presença foi associada à redução na susceptibilidade *in vitro* ao arteméter, em isolados provenientes da Guiana Francesa (39).

Sob o nosso ponto de vista, apesar do haplótipo predominante NEF/CDVY somente portar os alelos N86 e 184F, o surgimento de uma população parasitária apresentando a referida combinação N86, 184F e D1246 não é improvável no Brasil. Isso porque, apesar das populações de parasitas apresentarem uma diversidade alélica reduzida tanto no *pfmdr1* (177, 178, 190) como nos microssatélites que flanqueiam esse gene (206), a detecção de 1 isolado selvagem NEY/SNVD na cidade de Manaus (seja este nativo ou introduzido) pode refletir a existência de variabilidade genética que pode propiciar, através de recombinação homóloga, o surgimento do referido conjunto mesmo no *background* genético existente. Curiosamente, apesar de pouco frequente nas áreas malarígenas mundiais, o haplótipo

NF/CDD relativo aos códons 86, 184, 1034, 1042 e 1246, já foi detectado em cerca de 50% de isolados peruanos (127).

Em se tratando do gene *pfatpase6* foram encontradas poucas mutações, distribuídas nas três localidades avaliadas (Paragominas, Porto Velho e Manaus), em acordo com as descrições de um estudo de genotipagem global que estimou a diversidade genética de alguns isolados brasileiros (139). Através de predições estruturais, os mesmos autores demonstraram que a mutação 402V não parece estar inserida em nenhuma região catalítica, ao passo que a 630S, situada no domínio N de ligação a nucleotídeos, poderia exercer alguma influência na atividade dessa proteína. Entretanto, considerando que nesse trabalho nós avaliamos cerca de 1/3 da região codificante, uma avaliação mais precisa do grau de polimorfismo do *pfatpase6* só poderá ser alcançada quando estudada a sequência completa desse gene.

Por isso, devemos enfatizar que, à parte das discussões sobre o envolvimento dos diferentes polimorfismos e candidatos a marcadores para ACTs, é capital avaliar o impacto molecular da utilização de ACTs: se as características genéticas sofrerão mudanças no tempo, dada à pressão seletiva imposta pela utilização de ART e drogas parceiras no Brasil. Para isso, reiteramos que estudos longitudinais de genotipagem em base regular devem ser realizados para avaliar as possíveis tendências de modificações na susceptibilidade às drogas apresentadas pelas populações parasitárias em circulação.

5. Síntese de resultados

- Foram descritos pela primeira vez no Brasil haplótipos selvagens e sensíveis para o gene *pfcr1* e o *pfdhfr* (CVMNK e ACNCSVI) em isolados de *P. falciparum*;
- Foi observada uma redução no número de mutações associadas com a resistência à SP no gene *pfdhfr* de parasitas coletados na localidade de Porto Velho, no estado de Rondônia no período 1998-2002;
- Todos os isolados de *P. vivax* analisados apresentaram a mutação 976F, proposta como marcador de resistência à CQ na Ásia, apesar da frequência de quimiorresistência a essa droga no Brasil ser baixa;
- As populações de *P. vivax* portavam 2 ou 3 mutações no gene *pvdhfr*, apesar de nunca ter sido instituído o tratamento com SP para a malária vivax;
- Isolados de *P. falciparum* apresentaram um haplótipo de *pfmdr1* majoritário (NEF/CDVY), o qual não possui todos os alelos frequentemente associados a um potencial desenvolvimento de resistência à combinação AL;
- Foram detectadas as mutações 402V e 630S no gene *pfatpase6*, assim como a inexistência do alelo 769N associado à redução na susceptibilidade *in vitro* ao arteméter.

6. Conclusões

- Existem no Brasil populações parasitárias autóctones de *P. falciparum* apresentando um perfil molecular de sensibilidade à CQ e SP, pelo menos no estado do Pará;
- Estudos moleculares devem ser realizados frequentemente para monitorar tendências de aparecimento e dispersão de haplótipos sensíveis à CQ e/ou à SP, assim como de uma redução no número de mutações associados à quimiorresistência para SP, visando uma possível reintrodução desses fármacos como droga alternativa para malária falciparum;
- A mutação no códon 976 no gene *pvm-dr1* pode não ser válida para o monitoramento da resistência à CQ em isolados de *P. vivax* no Brasil;
- A SP poderá não ser efetiva como uma possível terapia alternativa para o tratamento da malária vivax, num futuro próximo, devido ao acúmulo de mutações no gene *pvdhfr*, proposição essa que deve ser confirmada avaliando-se o gene *pvdhps*;
- Avaliações periódicas do perfil haplotípico do gene *pfm-dr1* serão importantes para o acompanhamento da eficácia terapêutica da AL já que o haplótipo de *pfm-dr1* majoritário não contém o alelo D1246 e;
- Investigações a respeito da ocorrência de mutações em outros genes potencialmente associados com a quimiorresistência de *P. vivax* à CQ e com a de *P. falciparum* à ART são de vital importância, tal qual análises sobre alterações no número de cópias do *pvm-dr1* e *pfm-dr1*.

7. Perspectivas

- Realizar uma nova coleta e análise de isolados de *P. falciparum* e *P. vivax* provenientes do estado do Pará para comparar o nível de ocorrência de mutações;
- Estudar o fenômeno de amplificação genética no *pfmdr1* e *pvmldr1* de *P. falciparum* e *P. vivax*, também associados à geração de quimiorresistência a drogas;
- Analisar a sequência completa codificante para o gene *pfatpase6* de *P. falciparum* e;
- Avaliar a ocorrência de polimorfismos nos genes *pfmrp1*, *pvmrp1* e *pvdhps* de *P. falciparum* e *P. vivax*.

8. Referências bibliográficas

1. Neghina R, Neghina AM, Marincu I, Iacobiciu I. Malaria, a journey in time: in search of the lost myths and forgotten stories. *Am J Med Sci*. 2010 Dec;340(6):492-8.
2. Garcia LS. Malaria. *Clin Lab Med*. 2010 Mar;30(1):93-129.
3. Buonsenso D, Cataldi L. Watch out for malaria: still a leading cause of child death worldwide. *Ital J Pediatr*. 2010;36:58.
4. Gething PW, Smith DL, Patil AP, Tatem AJ, Snow RW, Hay SI. Climate change and the global malaria recession. *Nature*. 2010 May;465(7296):342-5.
5. Sachs J, Malaney P. The economic and social burden of malaria. *Nature*. 2002 Feb;415(6872):680-5.
6. WHO. World Malaria Report 2010. Geneva 2010 [cited 2010]; Available from: http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/en/index.html.
7. Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, *et al.* *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis*. 2008 Jan;46(2):165-71.
8. Wellems TE, Hayton K, Fairhurst RM. The impact of malaria parasitism: from corpuscles to communities. *J Clin Invest*. 2009 Sep;119(9):2496-505.
9. White NJ. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis*. 2008 Jan;46(2):172-3.
10. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. Vivax malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg*. 2007 Dec;77(6 Suppl):79-87.

11. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 2002 Feb;415(6872):673-9.
12. Aly AS, Vaughan AM, Kappe SH. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annu Rev Microbiol*. 2009;63:195-221.
13. Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, *et al*. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 2006 Sep 1;313(5791):1287-90.
14. Baumeister S, Winterberg M, Przyborski JM, Lingelbach K. The malaria parasite *Plasmodium falciparum*: cell biological peculiarities and nutritional consequences. *Protoplasma*. 2010 Apr;240(1-4):3-12.
15. Baker DA. Malaria gametocytogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2010;172(2):57-65.
16. Rey L. Parasitologia. 4ª edição ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
17. Dahlström S. Role of *pfATP6* and *pfMRP1* in *Plasmodium falciparum* resistance to antimalarial drugs. Stockholm: Karolinska Institute; 2009.
18. Feachem RGA, Phillips AA, Hwang J, Cotter C, Wielgosz B, Greenwood BM, *et al*. Shrinking the malaria map: progress and prospects. *The Lancet*. 2010;376(9752):1566-78.
19. Nájera J, González-Silva M, Alonso P. Some Lessons for the Future from the Global Malaria Eradication Programme (1955–1969). *PLoS Med*. 2011;8(1):e1000412.
20. Walther B, Walther M. What does it take to control malaria? *Ann Trop Med Parasitol*. 2007 Dec;101(8):657-72.

21. WHO. WHO Policy recommendation on Intermittent Preventive Treatment during infancy with sulphadoxine-pyrimethamine (SP-IPTi) for *Plasmodium falciparum* malaria control in Africa. Geneva 2010 [cited 2010 27/01/2011]; Available from: http://www.who.int/malaria/news/WHO_policy_recommendation_IPTi_032010.pdf.
22. WHO. Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. Geneva 2010; Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241500470_eng.pdf.
23. White NJ. The treatment of malaria. N Engl J Med. 1996 Sep;335(11):800-6.
24. Harinasuta T, Suntharasamai P, Viravan C. Chloroquine-resistant falciparum malaria in Thailand. Lancet. 1965;2(7414):657-60.
25. Moore D, Lanier J. Observations on two *Plasmodium falciparum* infections with an abnormal response to chloroquine. Am J Trop Med Hyg. 1961;10:5-9.
26. Young M, Moore D. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. Am J Trop Med Hyg. 1961;10:317-20.
27. Björkman A, Phillips-Howard PA. The epidemiology of drug-resistant malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1990 Mar-Apr;84(2):177-80.
28. Almeida Netto J, Oliveira G, Sampaio J. Resistência do *Plasmodium falciparum* à associação sulfamídicos-antifolínicos na região Centro-Oeste do Brasil; dados referentes ao estudo de 104 casos. Rev Pat Trop. 1972;1:385-93.
29. Espinal CA, Cortes GT, Guerra P, Arias AE. Sensitivity of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 1985 Jul;34(4):675-80.

30. Dondorp AM, Yeung S, White L, Nguon C, Day NP, Socheat D, *et al.* Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Apr;8(4):272-80.
31. White NJ, Nosten F, Looareesuwan S, Watkins WM, Marsh K, Snow RW, *et al.* Averting a malaria disaster. *Lancet.* 1999;353(9168):1965-7.
32. Bloland P. Drug resistance in malaria. Geneva: World Health Organization; 2001; Available from: <https://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/malaria.pdf>.
33. Phillips M, Phillips-Howard PA. Economic implications of resistance to antimalarial drugs. *Pharmacoeconomics.* 1996 Sep;10(3):225-38.
34. Rieckmann KH, Davis DR, Hutton DC. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? *Lancet.* 1989 Nov;2(8673):1183-4.
35. Baird JK. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Nov;48(11):4075-83.
36. 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. *PLoS Med.* 2008 Jun;5(6):e128.
37. Fernández-Becerra C, Pinazo MJ, González A, Alonso PL, del Portillo HA, Gascón J. Increased expression levels of the *pvcr1-o* and *pvmdr1* genes in a patient with severe *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J.* 2009;8:55.
38. Sinclair D, Zani B, Donegan S, Olliaro P, Garner P. Artemisinin-based combination therapy for treating uncomplicated malaria. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009(3):CD007483.

39. Jambou R, Legrand E, Niang M, Khim N, Lim P, Volney B, *et al.* Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to *in-vitro* artemether and point mutations of the SERCA-type *PfATPase6*. *Lancet*. 2005 Dec;366(9501):1960-3.
40. Ferreira I, Lopes D, Martinelli A, Ferreira C, do Rosário V, Cravo P. *In vitro* assessment of artesunate, artemether and amodiaquine susceptibility and molecular analysis of putative resistance-associated mutations of *Plasmodium falciparum* from São Tomé and Príncipe. *Trop Med Int Health*. 2007 Mar;12(3):353-62.
41. Ferreira I, Martinelli A, Rodrigues L, do Carmo E, do Rosário V, Póvoa M, *et al.* *Plasmodium falciparum* from Pará state (Brazil) shows satisfactory *in vitro* response to artemisinin derivatives and absence of the S769N mutation in the SERCA-type *PfATPase6*. *Trop Med Int Health*. 2008 Feb;13(2):199-207.
42. Tahar R, Ringwald P, Basco L. Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XXVIII. *In vitro* activity of dihydroartemisinin against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* and sequence analysis of the *P. falciparum ATPase 6* gene. *Am J Trop Med Hyg*. 2009 Jul;81(1):13-8.
43. Happi C, Gbotosho G, Folarin O, Sowunmi A, Hudson T, O'Neil M, *et al.* Selection of *Plasmodium falciparum* multidrug resistance gene 1 alleles in asexual stages and gametocytes by artemether-lumefantrine in Nigerian children with uncomplicated *falciparum* malaria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Mar;53(3):888-95.
44. Noedl H, Se Y, Schaefer K, Smith B, Socheat D, Fukuda M. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med*. 2008 Dec;359(24):2619-20.
45. Egan T. Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*: can the genie be put back in the bottle? *Future Microbiol*. 2009 Aug;4:637-9.

46. WHO. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. Geneva 2009; Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241597531_eng.pdf.
47. Baird JK. Resistance to therapies for infection by *Plasmodium vivax*. Clin Microbiol Rev. 2009;22(3):508-34.
48. Vestergaard L, Ringwald P. Responding to the challenge of antimalarial drug resistance by routine monitoring to update national malaria treatment policies. Am J Trop Med Hyg. 2007 Dec;77(6 Suppl):153-9.
49. Plowe CV. Monitoring antimalarial drug resistance: making the most of the tools at hand. J Exp Biol. 2003 Nov;206(Pt 21):3745-52.
50. Laufer MK, Djimdé AA, Plowe CV. Monitoring and deterring drug-resistant malaria in the era of combination therapy. Am J Trop Med Hyg. 2007 Dec;77(6 Suppl):160-9.
51. Plowe C, Roper C, Barnwell J, Happi C, Joshi H, Mbacham W, *et al*. World Antimalarial Resistance Network (WARN) III: molecular markers for drug resistant malaria. Malar J. 2007;6:121.
52. Sidhu AB, Verdier-Pinard D, Fidock DA. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by *pfcr*t mutations. Science. 2002 Oct;298(5591):210-3.
53. Wu Y, Kirkman LA, Wellems TE. Transformation of *Plasmodium falciparum* malaria parasites by homologous integration of plasmids that confer resistance to pyrimethamine. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Feb;93(3):1130-4.

54. Wooden JM, Hartwell LH, Vasquez B, Sibley CH. Analysis in yeast of antimalaria drugs that target the dihydrofolate reductase of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol. 1997 Mar;85(1):25-40.
55. Cortese JF, Plowe CV. Antifolate resistance due to new and known *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase mutations expressed in yeast. Mol Biochem Parasitol. 1998 Aug;94(2):205-14.
56. Noedl H, Socheat D, Satimai W. Artemisinin-resistant malaria in Asia. N Engl J Med. 2009 Jul;361(5):540-1.
57. Dondorp A, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo A, Tarning J, *et al*. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. N Engl J Med. 2009 Jul;361(5):455-67.
58. Howard EM, Zhang H, Roepe PD. A novel transporter, *Pfcrt*, confers antimalarial drug resistance. J Membr Biol. 2002 Nov;190(1):1-8.
59. Ritchie GY, Mungthin M, Green JE, Bray PG, Hawley SR, Ward SA. *In vitro* selection of halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* is not associated with increased expression of *Pgh1*. Mol Biochem Parasitol. 1996 Dec;83(1):35-46.
60. Sanchez CP, Rotmann A, Stein WD, Lanzer M. Polymorphisms within *PfMDR1* alter the substrate specificity for anti-malarial drugs in *Plasmodium falciparum*. Mol Microbiol. 2008 Nov;70(4):786-98.
61. Lekostaj JK, Amoah LE, Roepe PD. A single S1034C mutation confers altered drug sensitivity to *PfMDR1* ATPase activity that is characteristic of the 7G8 isoform. Mol Biochem Parasitol. 2008 Jan;157(1):107-11.

62. Wilson CM, Serrano AE, Wasley A, Bogenschutz MP, Shankar AH, Wirth DF. Amplification of a gene related to mammalian *mdr* genes in drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Science*. 1989 Jun;244(4909):1184-6.
63. Foote SJ, Thompson JK, Cowman AF, Kemp DJ. Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P. falciparum*. *Cell*. 1989 Jun;57(6):921-30.
64. Hyde JE. Mechanisms of resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs. *Microbes Infect*. 2002 Feb;4(2):165-74.
65. Duraisingh M, Cowman A. Contribution of the *pfmdr1* gene to antimalarial drug-resistance. *Acta Trop*. 2005 Jun;94(3):181-90.
66. Duraisingh M, Jones P, Sambou I, von Seidlein L, Pinder M, Warhurst D. The tyrosine-86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Mol Biochem Parasitol*. 2000 Apr;108(1):13-23.
67. Duraisingh M, Roper C, Walliker D, Warhurst D. Increased sensitivity to the antimalarials mefloquine and artemisinin is conferred by mutations in the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*. 2000 May;36(4):955-61.
68. Reed M, Saliba K, Caruana S, Kirk K, Cowman A. *Pgh1* modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2000 Feb;403(6772):906-9.
69. Ngo T, Duraisingh M, Reed M, Hipgrave D, Biggs B, Cowman A. Analysis of *pfprt*, *pfmdr1*, *dhfr*, and *dhps* mutations and drug sensitivities in *Plasmodium falciparum* isolates

from patients in Vietnam before and after treatment with artemisinin. *Am J Trop Med Hyg.* 2003 Mar;68(3):350-6.

70. Pickard A, Wongsrichanalai C, Purfield A, Kamwendo D, Emery K, Zalewski C, *et al.* Resistance to antimalarials in Southeast Asia and genetic polymorphisms in *pfmdr1*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Aug;47(8):2418-23.

71. Sidhu A, Valderramos S, Fidock D. *pfmdr1* mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol.* 2005 Aug;57(4):913-26.

72. Price R, Uhlemann A, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, *et al.* Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet.* 2004;364(9432):438-47.

73. Sidhu A, Uhlemann A, Valderramos S, Valderramos J, Krishna S, Fidock D. Decreasing *pfmdr1* copy number in *Plasmodium falciparum* malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. *J Infect Dis.* 2006 Aug;194(4):528-35.

74. Lim P, Alker A, Khim N, Shah N, Incardona S, Doung S, *et al.* *Pfmdr1* copy number and artemisinin derivatives combination therapy failure in falciparum malaria in Cambodia. *Malar J.* 2009;8:11.

75. Sharma YD. Genetic alteration in drug resistance markers of *Plasmodium falciparum*. *Indian J Med Res.* 2005 Jan;121(1):13-22.

76. Adagu IS, Dias F, Pinheiro L, Rombo L, do Rosario V, Warhurst DC. Guinea Bissau: association of chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* with the Tyr86 allele of the multiple drug-resistance gene *Pfmdr1*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996 Jan-Feb;90(1):90-1.

77. Adagu IS, Warhust D, Carucci D, Duraisingh M. *pfmdr1* mutations and chloroquine-resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Zaria, Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1995;89:132.
78. Basco LK, Le Bras J, Rhoades Z, Wilson CM. Analysis of *pfmdr1* and drug susceptibility in fresh isolates of *Plasmodium falciparum* from subsaharan Africa. *Mol Biochem Parasitol.* 1995 Nov;74(2):157-66.
79. Cox-Singh J, Singh B, Alias A, Abdullah MS. Assessment of the association between three *pfmdr1* point mutations and chloroquine resistance *in vitro* of Malaysian *Plasmodium falciparum* isolates. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1995 Jul-Aug;89(4):436-7.
80. Gomez-Saladin E, Fryauff D, Taylor W, Laksana B, Susanti A, Purnomo, *et al.* *Plasmodium falciparum mdr1* mutations and *in vivo* chloroquine resistance in Indonesia. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61:240-44.
81. Dorsey G, Kanya MR, Singh A, Rosenthal PJ. Polymorphisms in the *Plasmodium falciparum pfcrt* and *pfmdr-1* genes and clinical response to chloroquine in Kampala, Uganda. *J Infect Dis.* 2001 May;183(9):1417-20.
82. Pillai DR, Labbé AC, Vanisaveth V, Hongvangthong B, Pumphida S, Inkathone S, *et al.* *Plasmodium falciparum* malaria in Laos: chloroquine treatment outcome and predictive value of molecular markers. *J Infect Dis.* 2001 Mar;183(5):789-95.
83. Huaman MC, Roncal N, Nakazawa S, Long TT, Gerena L, Garcia C, *et al.* Polymorphism of the *Plasmodium falciparum* multidrug resistance and chloroquine resistance transporter genes and *in vitro* susceptibility to aminoquinolines in isolates from the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 May;70(5):461-6.

84. Póvoa MM, Adagu IS, Oliveira SG, Machado RL, Miles MA, Warhurst DC. *Pfmdr1* Asn1042Asp and Asp1246Tyr polymorphisms, thought to be associated with chloroquine resistance, are present in chloroquine-resistant and -sensitive Brazilian field isolates of *Plasmodium falciparum*. *Exp Parasitol*. 1998 Jan;88(1):64-8.
85. Sisowath C, Strömberg J, Mårtensson A, Msellem M, Obondo C, Björkman A, *et al*. *In vivo* selection of *Plasmodium falciparum pfmdr1* 86N coding alleles by artemether-lumefantrine (Coartem). *J Infect Dis*. 2005 Mar;191(6):1014-7.
86. Sisowath C, Ferreira P, Bustamante L, Dahlström S, Mårtensson A, Björkman A, *et al*. The role of *pfmdr1* in *Plasmodium falciparum* tolerance to artemether-lumefantrine in Africa. *Trop Med Int Health*. 2007 Jun;12(6):736-42.
87. Dokomajilar C, Nsobya S, Greenhouse B, Rosenthal P, Dorsey G. Selection of *Plasmodium falciparum pfmdr1* alleles following therapy with artemether-lumefantrine in an area of Uganda where malaria is highly endemic. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 May;50(5):1893-5.
88. Humphreys G, Merinopoulos I, Ahmed J, Whitty C, Mutabingwa T, Sutherland C, *et al*. Amodiaquine and artemether-lumefantrine select distinct alleles of the *Plasmodium falciparum mdr1* gene in Tanzanian children treated for uncomplicated malaria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Mar;51(3):991-7.
89. Sisowath C, Petersen I, Veiga M, Mårtensson A, Premji Z, Björkman A, *et al*. *In vivo* selection of *Plasmodium falciparum* parasites carrying the chloroquine-susceptible *pfcr1* K76 allele after treatment with artemether-lumefantrine in Africa. *J Infect Dis*. 2009 Mar;199(5):750-7.

90. Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis*. 2002 Apr;2(4):209-18.
91. Duraisingh MT, Refour P. Multiple drug resistance genes in malaria - from epistasis to epidemiology. *Mol Microbiol*. 2005 Aug;57(4):874-7.
92. Plowe C. The evolution of drug-resistant malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009 Apr;103 Suppl 1:S11-4.
93. Sanchez CP, Dave A, Stein WD, Lanzer M. Transporters as mediators of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol*. 2010 Aug;40(10):1109-18.
94. Wellems TE, Panton LJ, Gluzman IY, do Rosario VE, Gwadz RW, Walker-Jonah A, *et al*. Chloroquine resistance not linked to *mdr*-like genes in a *Plasmodium falciparum* cross. *Nature*. 1990 May;345(6272):253-5.
95. Walker-Jonah A, Dolan SA, Gwadz RW, Panton LJ, Wellems TE. An RFLP map of the *Plasmodium falciparum* genome, recombination rates and favored linkage groups in a genetic cross. *Mol Biochem Parasitol*. 1992 Apr;51(2):313-20.
96. Wellems TE, Walker-Jonah A, Panton LJ. Genetic mapping of the chloroquine-resistance locus on *Plasmodium falciparum* chromosome 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Apr;88(8):3382-6.
97. Su X, Kirkman LA, Fujioka H, Wellems TE. Complex polymorphisms in an approximately 330 kDa protein are linked to chloroquine-resistant *P. falciparum* in Southeast Asia and Africa. *Cell*. 1997 Nov;91(5):593-603.

98. Fidock DA, Nomura T, Cooper RA, Su X, Talley AK, Wellems TE. Allelic modifications of the *cg2* and *cg1* genes do not alter the chloroquine response of drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 2000 Sep;110(1):1-10.
99. 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.
100. Kuhn Y, Sanchez CP, Ayoub D, Saridaki T, van Dorsselaer A, Lanzer M. Trafficking of the phosphoprotein *PfCRT* to the digestive vacuolar membrane in *Plasmodium falciparum*. *Traffic*. 2010 Feb;11(2):236-49.
101. Djimdé A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourté Y, *et al.* A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 2001 Jan;344(4):257-63.
102. Vinayak S, Biswas S, Dev V, Kumar A, Ansari MA, Sharma YD. Prevalence of the K76T mutation in the *pfcr*t gene of *Plasmodium falciparum* among chloroquine responders in India. *Acta Trop*. 2003 Jul;87(2):287-93.
103. Babiker HA, Pringle SJ, Abdel-Muhsin A, Mackinnon M, Hunt P, Walliker D. High-level chloroquine resistance in Sudanese isolates of *Plasmodium falciparum* is associated with mutations in the chloroquine resistance transporter gene *pfcr*t and the multidrug resistance gene *pfmdr*1. *J Infect Dis*. 2001 May;183(10):1535-8.
104. Basco LK, Ringwald P. Analysis of the key *pfcr*t point mutation and *in vitro* and *in vivo* response to chloroquine in Yaoundé, Cameroon. *J Infect Dis*. 2001 Jun;183(12):1828-31.

105. Chen N, Russell B, Staley J, Kotecka B, Nasveld P, Cheng Q. Sequence polymorphisms in *pfcr* are strongly associated with chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. J Infect Dis. 2001 May;183(10):1543-5.
106. Durand R, Jafari S, Bouchaud O, Ralaimazava P, Keundjian A, Le Bras J. *Plasmodium falciparum*: *pfcr* and *DHFR* mutations are associated with failure of chloroquine plus proguanil prophylaxis in travelers. J Infect Dis. 2001 Dec;184(12):1633-4.
107. Babiker HA, Hastings IM, Swedberg G. Impaired fitness of drug-resistant malaria parasites: evidence and implication on drug-deployment policies. Expert Rev Anti Infect Ther. 2009 Jun;7(5):581-93.
108. Walliker D, Hunt P, Babiker H. Fitness of drug-resistant malaria parasites. Acta Trop. 2005 Jun;94(3):251-9.
109. Laufer M, Djimdé A, Plowe C. Monitoring and deterring drug-resistant malaria in the era of combination therapy. Am J Trop Med Hyg. 2007 Dec;77(6 Suppl):160-9.
110. Kublin JG, Cortese JF, Njunju EM, Mukadam RA, Wirima JJ, Kazembe PN, *et al.* Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. J Infect Dis. 2003 Jun;187(12):1870-5.
111. Mita T, Kaneko A, Lum JK, Bwijo B, Takechi M, Zungu IL, *et al.* Recovery of chloroquine sensitivity and low prevalence of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene mutation K76T following the discontinuance of chloroquine use in Malawi. Am J Trop Med Hyg. 2003 Apr;68(4):413-5.
112. Nkhoma S, Molyneux M, Ward S. *In vitro* antimalarial susceptibility profile and *pfcr/pfmdr-1* genotypes of *Plasmodium falciparum* field isolates from Malawi. Am J Trop Med Hyg. 2007 Jun;76(6):1107-12.

113. Wang X, Mu J, Li G, Chen P, Guo X, Fu L, *et al.* Decreased prevalence of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter 76T marker associated with cessation of chloroquine use against *P. falciparum* malaria in Hainan, People's Republic of China. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Apr;72(4):410-4.
114. Mwai L, Ochong E, Abdirahman A, Kiara SM, Ward S, Kokwaro G, *et al.* Chloroquine resistance before and after its withdrawal in Kenya. *Malar J.* 2009;8:106.
115. Mita T, Kaneko A, Lum JK, Zungu IL, Tsukahara T, Eto H, *et al.* Expansion of wild type allele rather than back mutation in *pfcr*t explains the recent recovery of chloroquine sensitivity of *Plasmodium falciparum* in Malawi. *Mol Biochem Parasitol.* 2004 May;135(1):159-63.
116. Laufer MK, Takala-Harrison S, Dzinjalama FK, Stine OC, Taylor TE, Plowe CV. Return of chloroquine-susceptible *falciparum* malaria in Malawi was a reexpansion of diverse susceptible parasites. *J Infect Dis.* 2010 Sep;202(5):801-8.
117. Brooks DR, Wang P, Read M, Watkins WM, Sims PF, Hyde JE. Sequence variation of the hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. *Eur J Biochem.* 1994 Sep;224(2):397-405.
118. Triglia T, Cowman AF. Primary structure and expression of the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jul;91(15):7149-53.
119. Cowman AF, Morry MJ, Biggs BA, Cross GA, Foote SJ. Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Dec;85(23):9109-13.

120. Bzik DJ, Li WB, Horii T, Inselburg J. Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Dec;84(23):8360-4.
121. Sibley C, Hyde J, Sims P, Plowe C, Kublin J, Mberu E, *et al.* Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? Trends Parasitol. 2001 Dec;17(12):582-8.
122. Kublin J, Dzinjalama F, Kamwendo D, Malkin E, Cortese J, Martino L, *et al.* Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. J Infect Dis. 2002 Feb;185(3):380-8.
123. Staedke SG, Sendagire H, Lamola S, Kanya MR, Dorsey G, Rosenthal PJ. Relationship between age, molecular markers, and response to sulphadoxine-pyrimethamine treatment in Kampala, Uganda. Trop Med Int Health. 2004 May;9(5):624-9.
124. Omar SA, Adagu IS, Warhurst DC. Can pretreatment screening for *dhps* and *dhf* point mutations in *Plasmodium falciparum* infections be used to predict sulfadoxine-pyrimethamine treatment failure? Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001 May-Jun;95(3):315-9.
125. Nzila A, Mberu E, Sulo J, Dayo H, Winstanley P, Sibley C, *et al.* Towards an understanding of the mechanism of pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: genotyping of dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of Kenyan parasites. Antimicrob Agents Chemother. 2000 Apr;44(4):991-6.
126. Plowe C, Cortese J, Djimde A, Nwanyanwu O, Watkins W, Winstanley P, *et al.* Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. J Infect Dis. 1997 Dec;176(6):1590-6.

127. Bacon DJ, McCollum AM, Griffing SM, Salas C, Soberon V, Santolalla M, *et al.* Dynamics of malaria drug resistance patterns in the Amazon basin region following changes in Peruvian national treatment policy for uncomplicated malaria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 May;53(5):2042-51.
128. Zhou Z, Griffing SM, de Oliveira AM, McCollum AM, Quezada WM, Arrospide N, *et al.* Decline in sulfadoxine-pyrimethamine-resistant alleles after change in drug policy in the Amazon region of Peru. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Feb;52(2):739-41.
129. Raman J, Sharp B, Kleinschmidt I, Roper C, Streat E, Kelly V, *et al.* Differential effect of regional drug pressure on dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase mutations in southern Mozambique. *Am J Trop Med Hyg.* 2008 Feb;78(2):256-61.
130. Krishna S, Woodrow C, Staines H, Haynes R, Mercereau-Puijalon O. Re-evaluation of how artemisinins work in light of emerging evidence of *in vitro* resistance. *Trends Mol Med.* 2006 May;12(5):200-5.
131. Eckstein-Ludwig U, Webb R, Van Goethem I, East J, Lee A, Kimura M, *et al.* Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2003 Aug;424(6951):957-61.
132. Uhlemann A, Cameron A, Eckstein-Ludwig U, Fischbarg J, Iserovich P, Zuniga F, *et al.* A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinins. *Nat Struct Mol Biol.* 2005 Jul;12(7):628-9.
133. Cojean S, Hubert V, Le Bras J, Durand R. Resistance to dihydroartemisinin. *Emerg Infect Dis.* 2006 Nov;12(11):1798-9.
134. Mugittu K, Genton B, Mshinda H, Beck H. Molecular monitoring of *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin in Tanzania. *Malar J.* 2006;5:126.

135. Zhang G, Guan Y, Zheng B, Wu S, Tang L. No *PfATPase6* S769N mutation found in *Plasmodium falciparum* isolates from China. *Malar J.* 2008;7:122.
136. Ibrahim M, Khim N, Adam H, Arie F, Duchemin J. Polymorphism of *PfATPase* in Niger: detection of three new point mutations. *Malar J.* 2009;8:28.
137. Imwong M, Dondorp A, Nosten F, Yi P, Mungthin M, Hanchana S, *et al.* Exploring the contribution of candidate genes to artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Jul;54(7):2886-92.
138. Dahlström S, Veiga M, Ferreira P, Mårtensson A, Kaneko A, Andersson B, *et al.* Diversity of the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase orthologue of *Plasmodium falciparum* (*PfATP6*). *Infect Genet Evol.* 2008 May;8(3):340-5.
139. Jambou R, Martinelli A, Pinto J, Gribaldo S, Legrand E, Niang M, *et al.* Geographic structuring of the *Plasmodium falciparum* sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (*PfSERCA*) gene diversity. *PLoS One.* 2010;5(2):e9424.
140. Tanabe K, Zakeri S, Palacpac NM, Afshar M, Randrianarivelojosia M, Kaneko A, *et al.* Spontaneous mutations in the *Plasmodium falciparum* sarcoplasmic/ endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (*PfATP6*) gene among geographically widespread parasite populations unexposed to artemisinin-based combination therapies. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Jan;55(1):94-100.
141. Nomura T, Carlton JM, Baird JK, del Portillo HA, Fryauff DJ, Rathore D, *et al.* Evidence for different mechanisms of chloroquine resistance in 2 *Plasmodium* species that cause human malaria. *J Infect Dis.* 2001 Jun;183(11):1653-61.
142. Brega S, Meslin B, de Monbrison F, Severini C, Gradoni L, Udomsangpetch R, *et al.* Identification of the *Plasmodium vivax* *mdr*-like gene (*pvmdr1*) and analysis of single-

nucleotide polymorphisms among isolates from different areas of endemicity. *J Infect Dis.* 2005 Jan;191(2):272-7.

143. Sá JM, Nomura T, Neves J, Baird JK, Wellems TE, del Portillo HA. *Plasmodium vivax*: allele variants of the *mdr1* gene do not associate with chloroquine resistance among isolates from Brazil, Papua, and monkey-adapted strains. *Exp Parasitol.* 2005 Apr;109(4):256-9.

144. Sá JM, Yamamoto MM, Fernandez-Becerra C, de Azevedo MF, Papakrivos J, Naudé B, *et al.* Expression and function of *pvcrt-o*, a *Plasmodium vivax* ortholog of *pfcr1*, in *Plasmodium falciparum* and *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biochem Parasitol.* 2006 Dec;150(2):219-28.

145. Suwanarusk R, Russell B, Chavchich M, Chalfein F, Kenangalem E, Kosaisavee V, *et al.* Chloroquine resistant *Plasmodium vivax*: *in vitro* characterisation and association with molecular polymorphisms. *PLoS One.* 2007;2(10):e1089.

146. Suwanarusk R, Chavchich M, Russell B, Jaidee A, Chalfein F, Barends M, *et al.* Amplification of *pvmdr1* associated with multidrug-resistant *Plasmodium vivax*. *J Infect Dis.* 2008 Nov;198(10):1558-64.

147. Barnadas C, Ratsimbaoa A, Tichit M, Bouchier C, Jahevitra M, Picot S, *et al.* *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in Madagascar: clinical efficacy and polymorphisms in *pvmdr1* and *pvcrt-o* genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Dec;52(12):4233-40.

148. Young MD, Burgess RW. Pyrimethamine resistance in *Plasmodium vivax* malaria. *Bull World Health Organ.* 1959;20(1):27-36.

149. Coatney GR, Myatt AV, Hernandez T, Jefferey GM, Cooper WC. Studies in human malaria. XXXII. The protective and therapeutic effects of pyrimethamine (daraprim) against Chesson strain vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1953 Sep;2(5):777-87.
150. Hernandez T, Myatt AV, Coatney GR, Jefferey GM. Studies in human malaria. XXXIV. Acquired resistance to pyrimethamine (daraprim) by the Chesson strain of *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg.* 1953 Sep;2(5):797-804.
151. Hawkins VN, Joshi H, Rungsihirunrat K, Na-Bangchang K, Sibley CH. Antifolates can have a role in the treatment of *Plasmodium vivax*. *Trends Parasitol.* 2007 May;23(5):213-22.
152. de Pécoulas PE, Tahar R, Ouatas T, Mazabraud A, Basco LK. Sequence variations in the *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and their relationship with pyrimethamine resistance. *Mol Biochem Parasitol.* 1998 May;92(2):265-73.
153. Eldin de Pécoulas P, Basco LK, Tahar R, Ouatas T, Mazabraud A. Analysis of the *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene sequence. *Gene.* 1998 Apr;211(1):177-85.
154. Korsinczky M, Fischer K, Chen N, Baker J, Rieckmann K, Cheng Q. Sulfadoxine resistance in *Plasmodium vivax* is associated with a specific amino acid in dihydropteroate synthase at the putative sulfadoxine-binding site. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jun;48(6):2214-22.
155. Brega S, de Monbrison F, Severini C, Udomsangpetch R, Sutanto I, Ruckert P, *et al.* Real-time PCR for dihydrofolate reductase gene single-nucleotide polymorphisms in *Plasmodium vivax* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jul;48(7):2581-7.

156. Auliff A, Wilson DW, Russell B, Gao Q, Chen N, Anh IN, *et al.* Amino acid mutations in *Plasmodium vivax* DHFR and DHPS from several geographical regions and susceptibility to antifolate drugs. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Oct;75(4):617-21.
157. Lu F, Lim CS, Nam DH, Kim K, Lin K, Kim TS, *et al.* Mutations in the antifolate-resistance-associated genes dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase in *Plasmodium vivax* isolates from malaria-endemic countries. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Sep;83(3):474-9.
158. Barnadas C, Musset L, Legrand E, Tichit M, Briolant S, Fusai T, *et al.* High prevalence and fixation of *Plasmodium vivax dhfr/dhps* mutations related to sulfadoxine/pyrimethamine resistance in French Guiana. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 Jul;81(1):19-22.
159. Zakeri S, Afsharpad M, Ghasemi F, Raeisi A, Kakar Q, Atta H, *et al.* *Plasmodium vivax*: prevalence of mutations associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium vivax* clinical isolates from Pakistan. *Exp Parasitol.* 2011 Jan;127(1):167-72.
160. Zakeri S, Motmaen SR, Afsharpad M, Djadid ND. Molecular characterization of antifolates resistance-associated genes, (*dhfr* and *dhps*) in *Plasmodium vivax* isolates from the Middle East. *Malar J.* 2009;8:20.
161. Neiva A. Formação de raça do hematozoário do impaludismo resistente à quinina. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1910;2(131-140).
162. Brito R, Pinheiro A. Relatório da secretaria de saúde do território federal de Guaporé. 1954.
163. Silva J. Terça maligna cloroquino-resistente - uma séria ameaça ao Hinterland brasileiro. *Tribuna Médica.* 1961;160:2-6.

164. Box ED, Box QT, Young MD. Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* from Porto Velho, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1963 May;12:300-4.
165. Ferraroni JJ, Speer CA, Hayes J, Suzuki M. Prevalence of chloroquine-resistant *falciparum* malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 1981 May;30(3):526-30.
166. Reyes S. Malarial infections caused by *Plasmodium falciparum* resistant to chloroquine treatment. The situation in Brazil (1960-1981). *Rev Bras Malariol Doencas Trop.* 1981;33:109-30.
167. Silva JR, Lopes PF. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* in Brazil. *Rev Bras Malariol Doencas Trop.* 1964 Jul-Sep;16:301-10.
168. Alecrim MG, Alecrim WD, de Albuquerque BC, Dourado HV, Wanssa MoC. Resistance of *Plasmodium falciparum* in the Brazilian Amazonas to the combination of sulfadoxine and pyrimethamine. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1982 Nov-Dec;24(6 Suppl):44-7.
169. Alecrim WD, Dourado H, Alecrim M das G, Passos LF, Wanssa E, Albuquerque B. *In vivo* resistance of *Plasmodium falciparum* to the combination of sulfadoxine and pyrimethamine, at RIII level, in Amazonas, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1982 Nov-Dec;24(6 Suppl):52-3.
170. Souza JM. A phase II clinical trial of mefloquine in Brazilian male subjects. *Bull World Health Organ.* 1983;61(5):815-20.
171. Souza J. Epidemiological distribution of *Plasmodium falciparum* drug resistance in Brazil and its relevance to the treatment and control of malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992;87(suplement 3):343-48.

172. Andrade J, Andrade A, Araujo E, Oliveira R, Silva S, Martelli C, *et al.* A randomized clinical trial with high dose of chloroquine for treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1992;34(5):467-73.
173. Boulos M, Di Santi S, Barata L, Segurado A, Dutra A, Neves V. Some aspects of treatment, prophylaxis and chemoresistance of *Plasmodium falciparum* malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1986;81(Suppl 2):255-7.
174. Kremsner PG, Zotter GM, Feldmeier H, Graninger W, Kollaritsch M, Wiedermann G, *et al.* *In vitro* drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* in Acre, Brazil. *Bull World Health Organ.* 1989;67(3):289-93.
175. Couto AA, Calvosa VS, Santos MA, de Souza JM. The evolution over time of the *in vitro* resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in 2 areas of the Brazilian Amazonia with distinct socioeconomic and geographic characteristics. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1995 Oct-Dec;28(4):357-65.
176. Segurado AA, di Santi SM, Shiroma M. *In vivo* and *in vitro Plasmodium falciparum* resistance to chloroquine, amodiaquine and quinine in the Brazilian Amazon. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1997 Mar-Apr;39(2):85-90.
177. Póvoa M, Adagu I, Oliveira S, Machado R, Miles M, Warhurst D. *Pfmdr1* Asn1042Asp and Asp1246Tyr polymorphisms, thought to be associated with chloroquine resistance, are present in chloroquine-resistant and -sensitive Brazilian field isolates of *Plasmodium falciparum*. *Exp Parasitol.* 1998 Jan;88(1):64-8.
178. Zalis M, Pang L, Silveira M, Milhous W, Wirth D. Characterization of *Plasmodium falciparum* isolated from the Amazon region of Brazil: evidence for quinine resistance. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 May;58(5):630-7.

179. Cerutti C, Marques C, Alencar F, Durlacher R, Alween A, Segurado A, *et al.* Antimalarial drug susceptibility testing of *Plasmodium falciparum* in Brazil using a radioisotope method. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94(6):803-9.
180. Vieira PP, Ferreira MU, Alecrim MG, Alecrim WD, da Silva LH, Sihuinha MM, *et al.* *pfcr* Polymorphism and the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* populations across the Amazon Basin. J Infect Dis. 2004 Jul;190(2):417-24.
181. Alecrim M, Alecrim W, Macêdo V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon Region. Rev Soc Bras Med Trop. 1999;32(1):67-8.
182. Alecrim M, Alecrim W, Macêdo V, Korves C, Roberts D, Li J, *et al.* Description of a possible clonal expansion of *Plasmodium vivax* in Manaus-Amazonas-Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 1999;32(3):303-5.
183. Santana Filho F, Arcanjo A, Cheuan Y, Costa M, Martinez-Espinosa F, Vieira J, *et al.* Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. Emerg Infect Dis. 2007;13(7):1125-26.
184. Calvosa VS, Adagu IS, Póvoa MM. *Plasmodium falciparum*: emerging mefloquine resistance *in vitro* in Pará State, north Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001 May-Jun;95(3):330-1.
185. Menezes C, Kirchgatter K, Di Santi S, Paula G, Ferreira E. *In vitro* evaluation of quinidine sensitivity in Brazilian *Plasmodium falciparum* isolates: comparative analysis to quinine and chloroquine. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2001;43(4):221-6.
186. Neifer S, Kreamsner PG. Drug susceptibility of *Plasmodium falciparum* in the western Amazon region, State of Acre, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1991 May-Jun;33(3):205-11.

187. Peterson DS, Di Santi SM, Povoá M, Calvosa VS, Do Rosario VE, Wellems TE. Prevalence of the dihydrofolate reductase Asn-108 mutation as the basis for pyrimethamine-resistant falciparum malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 1991 Oct;45(4):492-7.
188. Vasconcelos KF, Plowe CV, Fontes CJ, Kyle D, Wirth DF, Pereira da Silva LH, *et al.* Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of isolates from the Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000 Sep-Oct;95(5):721-8.
189. Vieira PP, das Graças Alecrim M, da Silva LH, González-Jiménez I, Zalis MG. Analysis of the *PfCRT* K76T mutation in *Plasmodium falciparum* isolates from the Amazon region of Brazil. *J Infect Dis.* 2001 Jun;183(12):1832-3.
190. Viana GM, Machado RL, Calvosa VS, Póvoa MM. Mutations in the *pfmdr1*, *cg2*, and *pfprt* genes in *Plasmodium falciparum* samples from endemic malaria areas in Rondônia and Pará State, Brazilian Amazon Region. *Cad Saude Publica.* 2006 Dec;22(12):2703-11.
191. Orjuela-Sánchez P, de Santana Filho FS, Machado-Lima A, Chehuan YF, Costa MR, Alecrim MG, *et al.* Analysis of single-nucleotide polymorphisms in the *crt-o* and *mdr1* genes of *Plasmodium vivax* among chloroquine-resistant isolates from the Brazilian Amazon region. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Aug;53(8):3561-4.
192. Olliaro P. Drug resistance hampers our capacity to roll back malaria. *Clin Infect Dis.* 2005 Aug;41 Suppl 4:S247-57.
193. Mackinnon MJ, Marsh K. The selection landscape of malaria parasites. *Science.* 2010 May;328(5980):866-71.

194. Alano P, Birago C, Picci L, Ponzi M, Sallicandro P, Scotti R, *et al.* Genome plasticity and sexual differentiation in *Plasmodium*. *Parassitologia*. 1999 Sep;41(1-3):149-51.
195. Frontali C. Genome plasticity in *Plasmodium*. *Genetica*. 1994;94(2-3):91-100.
196. Asih PB, Rogers WO, Susanti AI, Rahmat A, Rozi IE, Kusumaningtyas MA, *et al.* Seasonal distribution of anti-malarial drug resistance alleles on the island of Sumba, Indonesia. *Malar J*. 2009;8:222.
197. Babiker HA. Seasonal fluctuation of drug-resistant malaria parasites: a sign of fitness cost. *Trends Parasitol*. 2009 Aug;25(8):351-2.
198. Coura J, Suárez-Mutis M, Ladeia-Andrade S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(3):229-37.
199. De Santana Filho F, Arcanjo A, Cheuan Y, Costa M, Martinez-Espinosa F, Vieira J, *et al.* Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(7):1125-26.
200. Orjuela-Sánchez P, Karunaweera ND, da Silva-Nunes M, da Silva NS, Scopel KK, Gonçalves RM, *et al.* Single-nucleotide polymorphism, linkage disequilibrium and geographic structure in the malaria parasite *Plasmodium vivax*: prospects for genome-wide association studies. *BMC Genet*. 2010;11:65.
201. Dharia NV, Bright AT, Westenberger SJ, Barnes SW, Batalov S, Kuhlen K, *et al.* Whole-genome sequencing and microarray analysis of *ex vivo Plasmodium vivax* reveal selective pressure on putative drug resistance genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Nov;107(46):20045-50.

202. Dahlström S, Ferreira P, Veiga M, Sedighi N, Wiklund L, Mårtensson A, *et al.* *Plasmodium falciparum* multidrug resistance protein 1 and artemisinin-based combination therapy in Africa. *J Infect Dis.* 2009 Nov;200(9):1456-64.
203. Raj DK, Mu J, Jiang H, Kabat J, Singh S, Sullivan M, *et al.* Disruption of a *Plasmodium falciparum* multidrug resistance-associated protein (*PfMRP*) alters its fitness and transport of antimalarial drugs and glutathione. *J Biol Chem.* 2009 Mar;284(12):7687-96.
204. Nsobya S, Dokomajilar C, Joloba M, Dorsey G, Rosenthal P. Resistance-mediating *Plasmodium falciparum* *pfcr* and *pfmdr1* alleles after treatment with artesunate-amodiaquine in Uganda. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Aug;51(8):3023-5.
205. Holmgren G, Hamrin J, Svard J, Martensson A, Gil JP, Bjorkman A. Selection of *pfmdr1* mutations after amodiaquine monotherapy and amodiaquine plus artemisinin combination therapy in East Africa. *Infect Genet Evol.* 2007;7(5):562-9.
206. Mehlotra R, Mattera G, Bockarie M, Maguire J, Baird J, Sharma Y, *et al.* Discordant patterns of genetic variation at two chloroquine resistance loci in worldwide populations of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Jun;52(6):2212-22.

9. Anexos

Apresentamos a seguir outro trabalho publicado no decorrer da realização dessa tese.

Artigo: ***Plasmodium falciparum* isolates from Angola show the S_{tct}VMNT haplotype in the *pfcr*t gene**

Publicado na revista Malaria Journal, em 18 de Junho de 2010, no volume 9, artigo de número 174.

