

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

Gabriela Bassi Maia

**MARCADORES MOLECULARES ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA
DE *Plasmodium spp.* ÀS DROGAS ANTIMALÁRICAS**

São Paulo

2016

Gabriela Bassi Maia

**MARCADORES MOLECULARES ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA
DE *Plasmodium spp.* ÀS DROGAS ANTIMALÁRICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Biomedicina do Centro
Universitário São Camilo, orientado pelo
professor Dr. Fabio Mitsuo Lima, como
requisito parcial para a obtenção do título de
bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2016

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani

Maia, Gabriela Bassi

Marcadores moleculares envolvidos na resistência de Plasmodium spp
às drogas antimaláricas / Gabriela Bassi Maia. -- São Paulo : Centro
Universitário São Camilo, 2016.

59 p.

Orientação de Fabio Mitsuo Lima

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro
Universitário São Camilo, 2016.

1. Antimaláricos 2. Artemisininas 3. Biomarcadores 4. Malária 5.
Plasmodium 6. Resistência a medicamentos I. Lima, Fabio Mitsuo II.
Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 616.96

Gabriela Bassi Maia

**MARCADORES MOLECULARES ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA
DE *Plasmodium spp.* ÀS DROGAS ANTIMALÁRICAS**

São Paulo, 01 de junho de 2016

Professor Dr. Fabio Mitsuo Lima
Professor Orientador

Professora Dra. Carolina G. P. Beyrodt de Amorim
Professora Examinadora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha mãe por sua paciência, por suas palavras reconfortantes e por estar presente em todos os momentos que precisei me ajudando a vencer os obstáculos e me incentivando a continuar lutando sempre.

Muito obrigada aos meus colegas de curso, que participaram comigo em grande parte desta jornada, especialmente às minhas amigas Mayara Vivancos, Flávia Sant'Anna e Jéssica Santos, que tornaram mais leves e divertidas as horas de estudo.

Agradeço ao Centro Universitário São Camilo e a todos os docentes que estiveram presentes neste processo, me orientando e compartilhando comigo o seu conhecimento e principalmente ao meu orientador, professor Fábio M. Lima, por ter me guiado no desenvolvimento deste trabalho, sempre de forma tão paciente e dedicada.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que me acompanharam e me incentivaram durante este trajeto.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

RESUMO

MAIA, G.B. **Marcadores moleculares envolvidos na resistência de *Plasmodium spp.* às drogas antimaláricas.** 2016. 59p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2016.

Este trabalho abordará aspectos gerais relacionados à malária, com foco nos mecanismos de resistência do parasita aos antimaláricos mais utilizados e nos marcadores empregados no rastreamento e controle da resistência. Para tal objetivo utilizará trabalhos científicos encontrados nas bases de dado eletrônicas e livros do Sistema Integrado de Bibliotecas Pe. Inocente Radrizzani. Os medicamentos usados no tratamento da malária podem ser divididos em esquizotomicidas sanguíneos, esquizotomicidas teciduais, gametocíticos e esporotomicidas. O composto considerado atualmente como linha de frente no combate à malária é a artemisinina. O genoma de *Plasmodium* é altamente polimórfico e a resistência a antimaláricos é primordialmente gerada por mutações do tipo SNP. Um dos maiores desafios no controle da malária é o rápido desenvolvimento de resistência do parasita aos medicamentos. O monitoramento de resistência pode ser feito pela tipagem de marcadores moleculares. Os marcadores de resistência de *P. falciparum* mais conhecidos são PfDHFR e PfDHPS (envolvidos na resistência aos antifolatos) e as proteínas transportadoras, que são muito polimórficas e conferem resistência a uma diversidade de medicamentos. Em relação ao *P. vivax*, ainda se sabe pouco sobre os marcadores, e seu estudo tem se baseado na análise de marcadores já conhecidos de *P. falciparum*. Foi descoberta recentemente que a proteína K13 está ligada ao surgimento de cepas de *P. falciparum* resistentes à artemisinina, causando preocupação à comunidade científica. Os marcadores moleculares são uma ferramenta de grande importância no monitoramento de resistência, na predição e na tomada de medidas preventivas, devendo ser estudados de forma mais intensa.

Palavras-chave: Antimaláricos. Artemisininas. Biomarcadores. Malária. *Plasmodium*. Resistência a medicamentos.

ABSTRACT

MAIA, G.B. **Molecular markers involved in *Plasmodium spp.* resistance to antimalarial drugs.** 2016. 59p. Final course assignment (Bachelor's degree in Biomedicine) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2016.

This work will discuss general aspects related to malaria, focusing on parasite's resistance mechanisms to commonly used antimalarial drugs and on molecular markers, used to track and control the resistance. For this purpose, scientific papers found in electronic data bases and books from the Integrated Library System Pe. Inocente Radrizzani will be used. The drugs used in the treatment of malaria can be divided into blood schizontocidal, tissue schizontocidal, gametocytocidal and sporontocidal. The compound currently considered as the frontline drug against malaria is artemisinin. *Plasmodium's* genome is highly polymorphic, resistance to antimalarial drugs is primarily generated by SNP mutations. One of the biggest challenges in malaria control is the rapid development of drug resistance. Resistance monitoring can be done by using molecular markers. The most popular molecular markers for *P. falciparum* are PfDHFR and PfDHPS (involved in resistance to antifolates) and transporters, which are very polymorphic (involved in resistance to a variety of drugs). Little is known regarding molecular markers for *P. vivax* and the study of possible markers has been based on the analysis of known *P. falciparum's* markers. It was recently discovered that the K13 protein is linked to the emergence of *P. falciparum* artemisinin resistant strains, causing concern to the scientific community. Molecular markers are a very important tool in resistance monitoring, on predicting and on taking preventive measures, therefore, intensive studies should be done.

Keywords: Antimalarials. Artemisinin. Biomarkers. Drug resistance. Malaria. *Plasmodium*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT	Terapia de combinação baseada em artemisinina
IC ₅₀	Concentração inibitória média
CQ	Cloroquina
CSP	Proteína Circunsporozoíta
DTT	Diclorodifeniltricloroetano
DHFR	Enzima diidrofolato redutase
DHPS	Enzima diidropteroato sintase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
G6PD	Glicose-6-fosfato-desidrogenase
K13	Proteína Kelch
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzido
OMS	Organização Mundial da Saúde
PABA	Ácido para-aminobenzóico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCD	Morte celular programada
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>pfATPase6</i>	Gene Ca ⁺² - ATPase do retículo sarcoplasmático de <i>P. falciparum</i>
<i>pfcr</i>	Gene do transportador de resistência à cloroquina de <i>P. falciparum</i>
PfCRT	Proteína transportadora de resistência à cloroquina de <i>P. falciparum</i>
<i>pfdhfr</i>	Gene diidrofolato redutase de <i>P. falciparum</i>
<i>pfdhps</i>	Gene diidropteroato sintase de <i>P. falciparum</i>
PfHRP-2	Proteína de <i>P. falciparum</i> rica em histidina

<i>pfmdr1</i>	Gene de <i>P. falciparum</i> de multirresistência à droga
PfMDR1	Proteína de <i>P. falciparum</i> de multirresistência à droga
<i>pfmrp</i>	Gene de <i>P. falciparum</i> associado à múltipla resistência
PfMRP	Proteína de <i>P. falciparum</i> associada à múltipla resistência
<i>pfmhe-1</i>	Gene trocador de sódio-hidrogênio de <i>P. falciparum</i>
Pgh1	Glicoproteína-P homóloga 1
PvCRT	Proteína transportadora de resistência à cloroquina de <i>P. vivax</i>
PvMDR1	Proteína de <i>P. vivax</i> de multirresistência à droga
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SERCA	Proteína Ca^{+2} - ATPase do retículo sarcoplasmático
SP	Sulfadoxina - pirimetamina
TRAP	Proteína adesiva relacionada à Trombospondina
VD	Vacúolo digestivo

LISTA DE AMINOÁCIDOS

A	Alanina
C	Cisteína
D	Aspartato
E	Glutamato
F	Fenilalanina
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
K	Lisina
L	Leucina
N	Asparagina
P	Prolina
R	Arginina
S	Serina
T	Treonina
V	Valina
Y	Tirosina

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição geográfica de casos confirmados de malária	20
Figura 2 - Casos notificados de malária no Brasil entre 2000 e 2011	22
Figura 3 - Áreas de risco pelos diferentes níveis de incidência parasitária anual	23
Figura 4 – Representação do ciclo de vida de <i>Plasmodium spp.</i>	24
Figura 5 - Representação de um merozoíto destacando as principais organelas e estruturas celulares.	26
Figura 6 - Tipos de antimaláricos de acordo com a fase do ciclo na qual atuam	30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVO	15
3	MATERIAL E MÉTODO	16
4	DESENVOLVIMENTO	17
4.1	A malária no mundo	17
4.2	A malária no Brasil	20
4.3	Ciclo de vida	23
4.4	Manifestações Clínicas	27
4.5	Diagnóstico	28
4.6	Tratamento	30
4.6.1	Inibidores da produção de hemozoína.....	31
4.6.1.1	Derivados da artemisinina	31
4.6.1.2	Família das quinolinas.....	33
4.6.2	Inibidores da síntese do ácido fólico	35
4.6.3	Inibidores da transcrição procariótica	37
4.6.4	Inibidores do transporte de elétrons mitocondrial.....	38
4.7	Mecanismos moleculares que geram variabilidade genética.....	39
4.8	Resistência.....	40
4.8.1	Marcadores moleculares de resistência de <i>P. falciparum</i>	41
4.8.1.1	Resistência a antifolatos	42
4.8.1.1.1	PfDHFR	43
4.8.1.1.2	PfDHPS	44
4.8.1.2	Mutações em genes transportadores	45
4.8.1.2.1	PfCRT.....	45
4.8.1.2.2	PfMDR.....	47
4.8.1.2.3	PfMRP1	48
4.8.1.2.4	PfNHE	48
4.8.1.2.5	PfATP6.....	49
4.8.1.3	Resistência à artemisinina.....	49
4.8.2	Marcadores moleculares de resistência de <i>P. vivax</i>	50
5	CONCLUSÃO	51
6	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

Malária é o nome dado a uma doença causada por parasitas intracelulares obrigatórios do gênero *Plasmodium*, pertencentes ao filo apicomplexa, que podem ser transmitidos de pessoa a pessoa pela picada da fêmea de mosquitos culicídeos do gênero *Anopheles*, quando infectados. Existem aproximadamente 400 espécies conhecidas de mosquitos deste gênero, no entanto, apenas 60 são capazes de transmitir o parasita. A transmissão do parasita também pode ocorrer através de transfusão sanguínea, compartilhamento de agulha contaminada e de forma congênita, porém, estas vias são relatadas com menor frequência (CROMPTON *et al.*, 2014; FRANÇA; DOS SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

Cinco espécies do parasita são consideradas as mais relevantes quando o foco é a transmissão entre humanos. Dentre estas, as principais são: *Plasmodium falciparum*, tido como o responsável por formas mais graves, pelo maior número de óbitos e por 98% dos casos atuais de malária no continente africano; e *Plasmodium vivax*, que chegou a ser considerado causador de um tipo leve da doença, ideia que foi refutada nos últimos anos devido à grande quantidade de casos e complicações geradas por este parasita. Apesar de *P. vivax* representar apenas 8% dos casos mundiais de malária, no Brasil este número chega a 82% dos casos. Outras espécies de menor relevância são *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e, a recentemente descrita, *Plasmodium knowlesi*, encontrada em partes do sudeste asiático (BIAMONTE; WANNER; LE ROCH, 2013; RAHMAH *et al.*, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é descrever as características da malária, os tratamentos mais utilizados, os marcadores moleculares e os diferentes mecanismos moleculares de *Plasmodium spp.* que podem gerar resistência às drogas antimaláricas.

3 MATERIAL E MÉTODO

Foi realizada extensa revisão bibliográfica sobre o assunto em livros do Sistema Integrado de Bibliotecas Pe. Inocente Radrizzani e nas bases de dados eletrônicas PubMed e Scielo, sem restrição quanto ao ano de publicação, tipo de estudo ou idioma. Para fins de busca, foram utilizados descritores como malária, *Plasmodium*, marcadores moleculares, resistência, antimaláricos e quimioterapia antimalárica.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 A malária no mundo

A malária é uma doença que afeta a humanidade desde a antiguidade. Indícios de que esta tem acometido povos desde 3000 a.C. foram encontrados em documentos chineses e egípcios, que descrevem uma moléstia com febre intermitente e esplenomegalia, sintomas comumente relacionados à malária. As especulações sobre a época de origem da malária ainda vão além: acredita-se que tenha atingido e causado a morte de grande parte dos primatas antecessores do *Homo sapiens*, como os *Australopithecus* (FRANÇA; DOS SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008; LEITE *et al.*, 2013; PACKARD, 2007).

Outras referências são encontradas em manuscritos do século VI a.C. das civilizações modernas, descrevendo febres malignas e calafrios que acometiam o povoado da antiga Mesopotâmia. Até mesmo nos escritos de filósofos da antiguidade, como Homero, Aristóteles, Platão e Sócrates, são citadas febres que podem ser relacionadas à malária (FRANÇA; DOS SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

Foi apenas a partir do século XIV, na Itália, que recebeu a denominação de “*ária cativa*” ou “*mal’aria*”, termo originário do latim que significa “ar ruim”. Este nome surgiu devido à teoria de que a ocorrência de febre estaria relacionada à proximidade da população aos pântanos e de que o vapor destes seria responsável pela doença. Esta teoria foi descrita pelo médico e filósofo grego Hipócrates, mas também foi considerada pelos romanos, que foram os pioneiros na drenagem de pântanos. Aproximadamente dois séculos depois, a expressão “*malaria*” ganhou espaço na língua inglesa. Alguns outros nomes surgiram com o passar dos anos, como “paludismo” e “impaludismo” (FRANÇA; DOS SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008; GILLESPIE; PEARSON, 2001; TARANTO *et al.*, 2006).

Durante o século XVII, a teoria miasmática havia ganhado força e era considerada inquestionável a ideia de que algumas doenças, incluindo a malária, eram contraídas pela inalação de odores provindos de corpos de água parados ou pela ingestão de água contaminada. Após 1870, esta teoria começou a ser menos aceita e outras teorias que relacionavam a origem das doenças a microrganismos

estavam surgindo, incluindo a ideia de que a malária seria transmitida por um bacilo. Foi quando um cirurgião do exército francês resolveu desafiar estas teorias, tomadas como absolutas, e começou a examinar esfregaços de sangue de 200 pacientes, observando diferentes formas de vida nas amostras dos infectados. Ele percebeu então, que havia encontrado um protozoário, e apresentou este achado em 1880, descrevendo os primeiros parasitas vivos encontrados em sangue humano e suas formas de vida (COX, 2010).

No período entre 1898 e 1900, parasitas causadores da malária em humanos foram encontrados no estômago de mosquitos, foi então que se descreveu definitivamente a relação entre a transmissão da doença e o vetor (COX, 2010).

A malária teve grande importância em muitas ocasiões históricas, interferindo principalmente na duração e até mesmo no resultado de algumas guerras. No auge de seu poder, o general macedônico conhecido como “Alexandre, O Grande”, morreu ao contrair uma febre maligna, que pelo que se acredita, era malária. Além disso, a conquista e invasão de Roma também foram impedidas pela malária diversas vezes ao longo da história (FRANÇA; DOS SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008; LEITE *et al.*, 2013).

Em 1809, a malária chegou a ser usada como arma biológica pelo general francês Napoleão Bonaparte, que inundou o interior da Holanda propositalmente com a intenção de facilitar a disseminação da doença, para que esta atingisse o exército britânico, que estava planejando atacar sua frota. A doença se espalhou rapidamente, tornando a frota britânica debilitada. Ao final de sete meses, a febre havia tirado de combate mais de 40% dos homens (BARRAS; GREUB, 2014; FRANÇA; DOS SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

Apesar do grande número de casos diagnosticados atualmente, estima-se que no começo do século XX a incidência mundial de malária chegara a ser cerca de dez vezes maior, quadro provavelmente agravado pela privação de recursos das colônias inglesas e francesas em decorrência da primeira grande guerra. Na primeira guerra mundial, os exércitos francês, britânico e alemão ficaram imobilizados pela doença por três meses na Macedônia. A doença se espalhou pelo mundo todo, poupando apenas as áreas polares e subpolares. Na Europa, os países

mais afetados eram os mediterrâneos, principalmente a Itália (BRABIN, 2014; CAMARGO, 2003).

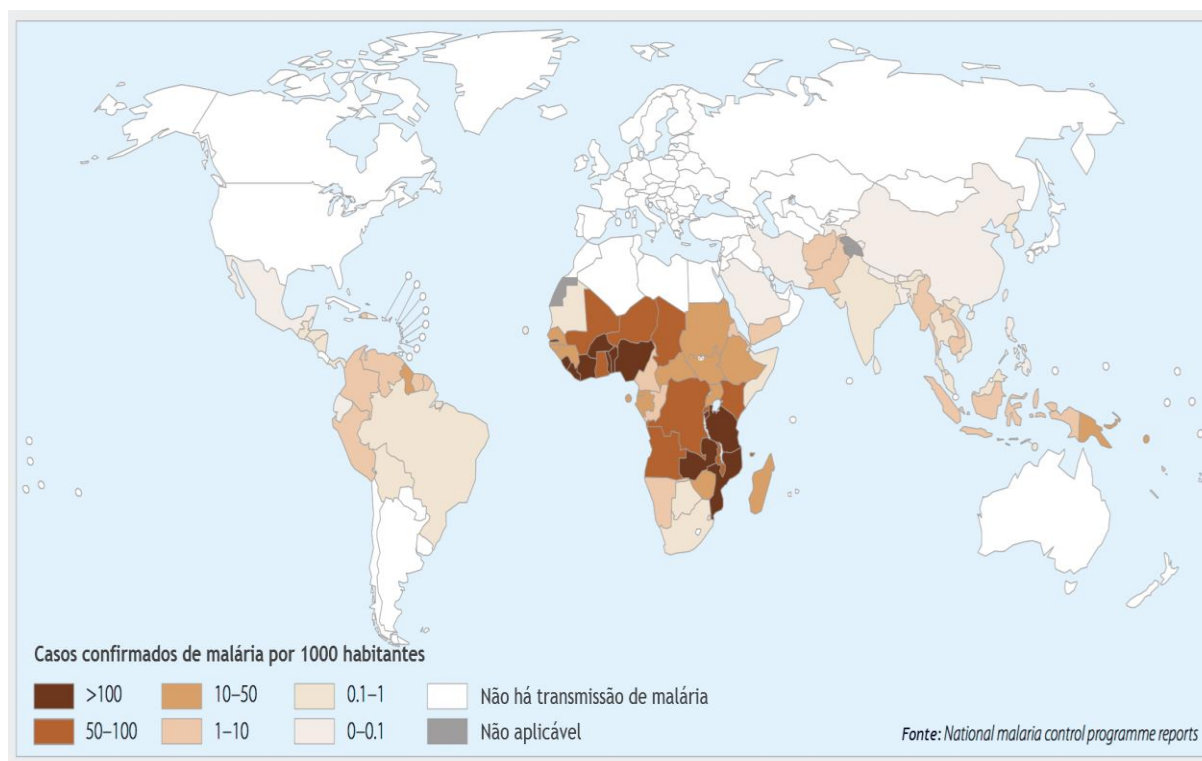
Durante a segunda guerra mundial, a malária foi responsável por 500.000 internações apenas entre os soldados do exército americano. Os prejuízos causados pela malária durante a guerra fizeram com que houvesse um aumento no investimento para o desenvolvimento de drogas ou de métodos de controle do mosquito. Foi quando o diclorodifeniltricloroetano (DDT), um inseticida residual, foi desenvolvido, revolucionando as técnicas de combate ao vetor (CAMPOS, 1999).

A relação íntima entre malária e guerra tem sido um grande incentivo para a busca por alternativas de tratamento e controle. Estima-se que anualmente mais de 10 milhões de dólares sejam investidos em pesquisas com a malária pelo exército americano (ARROW; PANOSIAN; GELBAND, 2004a).

Desde a metade do século XX, a malária foi erradicada nos países desenvolvidos, sendo considerada atualmente uma doença de países subdesenvolvidos, como demonstrado na figura 1, principalmente os da América Latina, África e grandes áreas da Ásia Meridional e Oceania, devido às precárias condições socioeconômicas e de saúde (COSTA; KIRALJ; FERREIRA, 2007; TARANTO *et al.*, 2006).

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (2015), em 2013 foram diagnosticados 198 milhões de casos em todo o mundo e a doença foi responsável pela morte de 584.000 pessoas, sendo que 90% das mortes ocorreram na região africana e 78% dos óbitos acometeram crianças abaixo de cinco anos de idade.

Figura 1 – Distribuição geográfica de casos confirmados de malária



Fonte: Adaptado de (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014)

4.2 A malária no Brasil

Acredita-se que os primeiros agentes causadores de malária na América tenham sido *P. vivax* e *P. malariae*, introduzidos na América do Norte por colonizadores ingleses que procuravam novas terras durante o século XVII. No entanto, foi entre os séculos XVII e XVIII que o temido *P. falciparum* chegou ao continente em navios, vindos do continente africano durante o comércio de escravos. A malária foi uma das doenças mais debilitantes da América do Norte e causou atraso no desenvolvimento das colônias americanas (OAKS *et al.*, 1991; PACKARD, 2007).

No Brasil, começou a ser descrita no século XVI, coincidindo com o século em que o país foi colonizado por portugueses. Ao fim da década de 30 houve um surto com um grande número de óbitos, devido à chegada do vetor *Anopheles gambiae* ao país, supostamente trazido em navios em decorrência do intenso tráfego marítimo entre Brasil e Senegal (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010).

Ao final do século XIX, a doença dominava todo o território brasileiro, especialmente o litoral. O maior número de casos era concentrado na Amazônia e no Planalto Central, mas a situação era estável (CAMARGO, 2003).

Nesta época, a extração de látex tornou-se muito popular e economicamente importante, causando a migração de diversos habitantes da região nordeste do país, que eram afligidos pela seca em sua terra natal e viam no comércio da borracha a esperança para uma nova vida. A desregrada migração de pessoas sem imunidade à doença, aliada às condições da floresta amazônica que se configuram perfeitas para a propagação do mosquito, geraram uma grande epidemia de malária. O comércio da borracha ainda gerou outro fator que agravou a epidemia: a construção da estrada de ferro Madeira-Mamoré, que ligaria Santo Antônio (hoje parte de Porto Velho) a Guajará-Mirim, no rio Mamoré, com a intenção de facilitar o transporte do produto. Estima-se que a doença tenha levado a óbito mais de 10 mil trabalhadores e que milhares tenham sido internados durante as várias etapas de implantação do projeto, que se estendeu do fim do século XIX até início do século XX (CAMARGO, 2003; LEITE *et al.*, 2013; SILVA; OLIVEIRA, 2002).

No início da década de 40 houve uma grande incidência da doença, atingindo cerca de seis milhões de pessoas, totalizando aproximadamente 20% da população. Na década de 50, o Serviço Nacional de Malária, sob orientação da OMS (Organização Mundial da Saúde) e direção de Mario Pinotti, iniciou uma campanha de erradicação que se baseava na pulverização de DDT nas casas e no tratamento dos casos febris com cloroquina. Em 1952, foi implementada experimentalmente em campo uma nova proposta de Mario Pinotti, na tentativa de contornar casos de resistência do vetor ao DDT: a utilização de sal de cozinha com cloroquina como método de profilaxia medicamentosa. Não houve a erradicação nacional da malária por meio destas campanhas, mas houve uma grande redução no número de pessoas atingidas e erradicação em algumas áreas do país. No início da década de 60, o número caiu para aproximadamente 40 mil casos concentrados na região Amazônica (CAMARGO, 2003; SILVA; OLIVEIRA, 2002; SILVA; HOCHMAN, 2011).

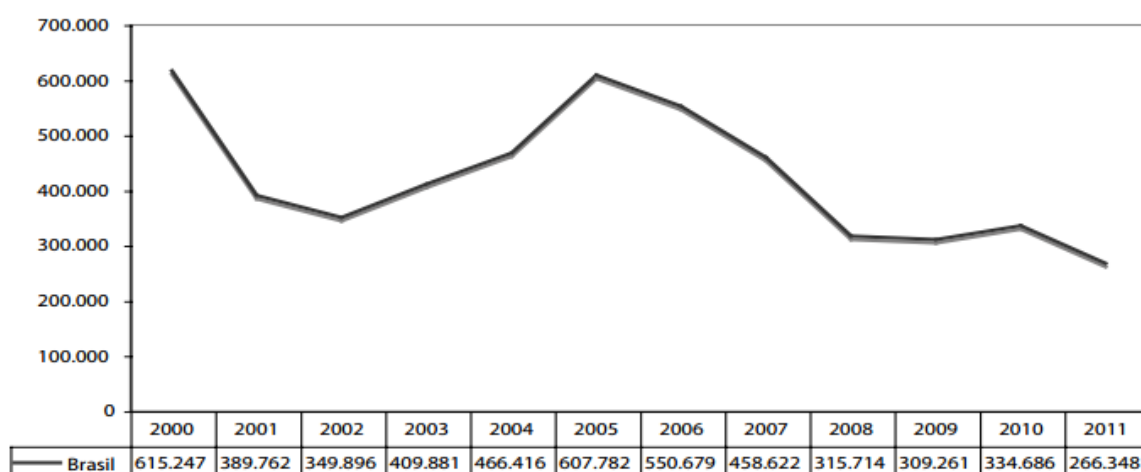
No entanto, ainda na década de 60, o governo militar lançou um projeto de colonização da região amazônica, gerando a migração de mais de um milhão de pessoas de diferentes partes do país, o que acarretou uma ocupação desordenada

da região. Iniciaram-se então, novas atividades agropecuárias e garimpeiras, além da construção de usinas hidroelétricas, que geraram desflorestamento e mudança no curso natural de rios. Estas novas condições, aliadas às condições precárias de habitação e saúde e à expansão de cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina para outros estados como Acre, Roraima, Amapá, Mato Grosso e Pará, deu início ao terceiro grande surto de malária do século no país. O número de casos aumentou de cerca de 40 mil em 1960 para 170 mil em 1980, e continuou aumentando, chegando a um platô de aproximadamente 500 mil em 1990 (LEITE *et al.*, 2013; OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010; SILVA; OLIVEIRA, 2002).

Devido à grave situação, o Ministério da Saúde reforçou as medidas para tratamento e prevenção da doença, e em três anos, houve uma redução de 45% no número de casos (FRANÇA; DOS SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

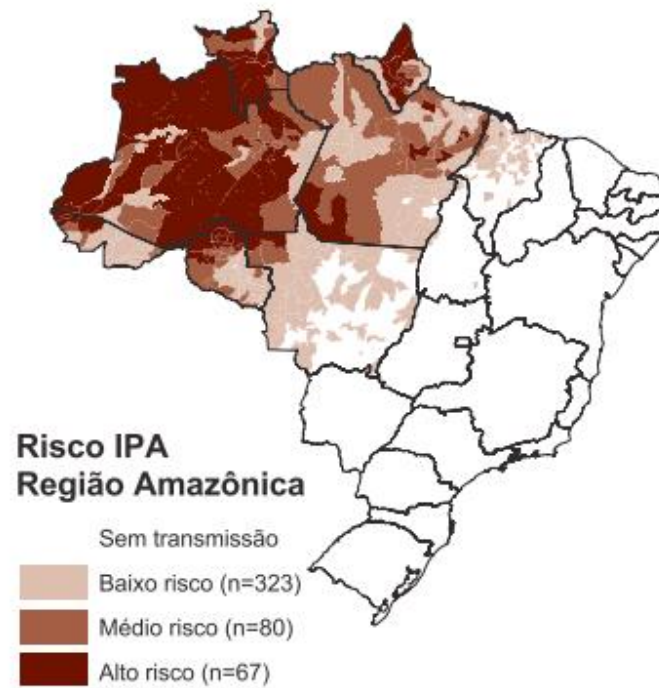
Em 2011 foram notificados aproximadamente 270 mil casos da doença, como mostra o gráfico na figura 2, sendo que 98% destes estavam concentrados em seis estados: Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia e Roraima. De modo geral, nos últimos anos a doença está centralizada na Amazônia Legal (figura 3), devido alguns elementos que propiciam condições para a transmissão, como a presença abundante do mosquito vetor, altas temperaturas, clima úmido, desmatamento e ocupação desordenada em habitações inadequadas (BRASIL, 2013; TAUIL, 2011).

Figura 2 - Casos notificados de malária no Brasil entre 2000 e 2011



Fonte: (BRASIL, 2013)

Figura 3 - Áreas de risco pelos diferentes níveis de incidência parasitária anual

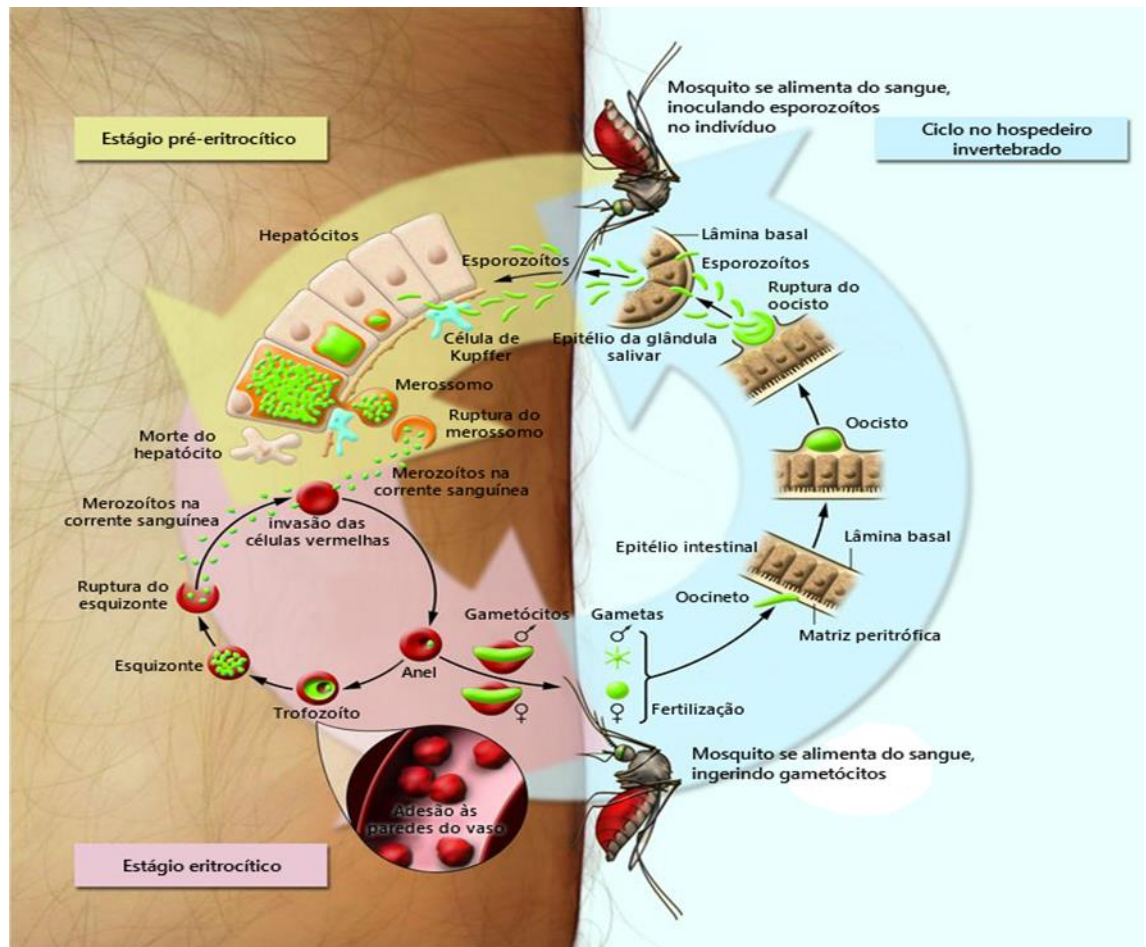


Fonte: (BRASIL, 2010)

4.3 Ciclo de vida

Estes parasitas possuem um ciclo de vida complexo, representado na figura 4. O ciclo inclui diferentes formas de vida, com reprodução sexuada no hospedeiro invertebrado (mosquitos anofelinos) e reprodução assexuada no hospedeiro vertebrado.

Figura 4 – Representação do ciclo de vida de *Plasmodium spp.*



Fonte: Adaptado de (GREENWOOD *et al.*, 2008)

Durante a picada da fêmea de um mosquito infectado, são injetadas no hospedeiro vertebrado entre 10 e 100 formas de vida de *Plasmodium* chamadas esporozoítos, que saem das glândulas salivares com uma mistura de saliva, substâncias anticoagulantes e vasodilatadoras. Ainda há debates e estudos sobre se estes parasitas são injetados diretamente na corrente sanguínea ou se são inseridos na região intradérmica, seguindo para os vasos linfáticos e sanguíneos por si só algumas horas após a inoculação (ALY; VAUGHAN; KAPPE, 2009; CROMPTON *et al.*, 2014).

Os esporozoítos chegam ao fígado pela circulação sanguínea do hospedeiro e ultrapassam diversas barreiras, como as células de Kupffer, o endotélio sinusoidal e as células estelares hepáticas, chegando à superfície dos hepatócitos. Neste ponto, ocorre a invaginação do parasita através de interações do tipo ligante-

receptor, que promovem a entrada do mesmo na célula, com a formação do vacúolo parasitóforo (VP) a partir da membrana plasmática dos hepatócitos do hospedeiro (ALY; VAUGHAN; KAPPE, 2009; LEITE *et al.*, 2013).

O VP é importante nos processos de desenvolvimento do *Plasmodium* que acontecem em seguida, pois age como uma barreira entre o parasita e o sistema imune do hospedeiro, além de auxiliar na aquisição de nutrientes fundamentais ao seu desenvolvimento. Duas importantes proteínas de esporozoítos envolvidas neste processo são a Proteína Circunsporozoíta (CSP) e a Proteína Adesiva Relacionada à Trombospondina (TRAP), que se ligam aos proteoglicanos de superfície dos hepatócitos, auxiliando no processo de invasão. Estas proteínas possuem outros papéis em todo o processo de infecção, incluindo a evasão dos sistemas de defesa do hospedeiro (ALY; VAUGHAN; KAPPE, 2009; LEITE *et al.*, 2013).

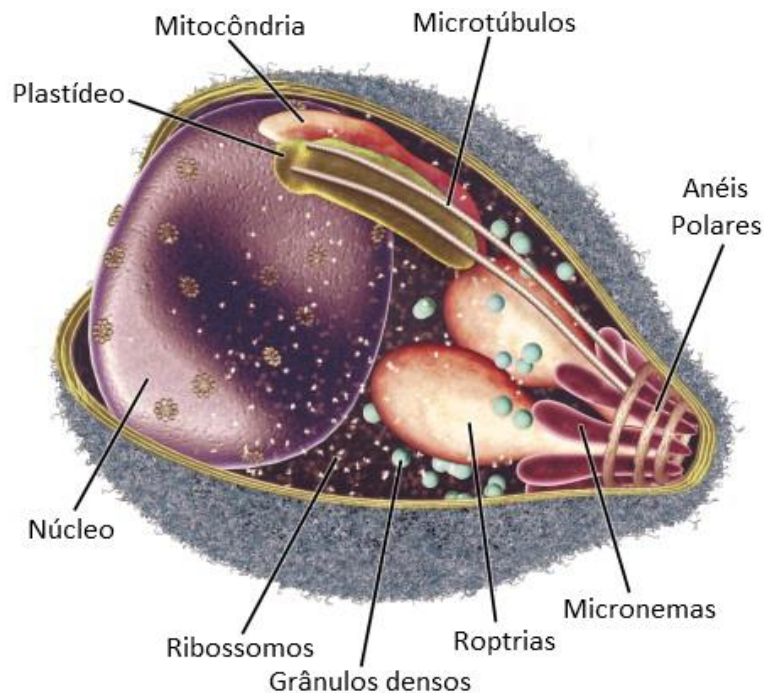
Nesta etapa, no caso de *P. vivax* e *P. ovale*, os mosquitos inoculam distintas populações de esporozoítos, sendo que algumas se desenvolvem mais lentamente e geram formas de vida denominadas hipnozoítos, que permanecem em um estágio de latência no fígado. Esta forma de vida pode permanecer dormente durante semanas ou até mesmo anos e pode ser responsável por recaídas da doença mesmo após tratamento eficaz (HOBBS; DUFFY, 2011; WHITE *et al.*, 2014).

No interior dos hepatócitos, os esporozoítos sofrem esquizogonia e uma única célula pode chegar a produzir de 10.000 a 30.000 merozoítos-filhos em um período de 5 a 8 dias. Os merozoítos produzidos a partir dos esporozoítos são contidos em vesículas chamadas de merossomos, que atuam como sistemas de transporte liberando os merozoítos diretamente na corrente sanguínea e protegendo-os assim das células de defesa do hospedeiro. Estas novas formas de vida possuem a capacidade de invadir eritrócitos, dando início ao ciclo eritrocítico (LEITE *et al.*, 2013; STURM *et al.*, 2006; WHITE *et al.*, 2014).

Assim como na invasão dos hepatócitos, os merozoítos se valem de interações de membrana para a invasão de células sanguíneas do hospedeiro. O parasita se liga à membrana da célula, e então, se utiliza de receptores para orientar o complexo apical na direção do eritrócito. Em seguida, três organelas secretoras – roptrias, micronemas e grânulos densos (ilustrados na figura 5) – liberam moléculas que permitem a adesão e invasão do parasita. Após a invasão, ocorre a selagem da

membrana do eritrócito, evitando assim sua lise (BARROS *et al.*, 2012; MILLER *et al.*, 2013).

Figura 5 - Representação de um merozoíto destacando as principais organelas e estruturas celulares.



Fonte: Adaptado de (COWMAN; CRABB, 2006)

Uma vez dentro da célula, o parasita consome os nutrientes da mesma e se utiliza de sua membrana celular para a importação de nutrientes necessários para seu crescimento, inserindo proteínas próprias e expondo-as na superfície (WHITE *et al.*, 2014).

Os merozoítos se replicam assexuadamente, primeiramente formando o trofozoíto e em seguida evoluindo para esquizonte eritrocítico. São produzidos em torno de 30 a 60 merozoítos por esquizonte, que são liberados na corrente sanguínea quando a célula se rompe. Cada um dos merozoítos liberados é apto a infectar novos eritrócitos e repetir o ciclo sanguíneo (LEITE *et al.*, 2013; WHITE *et al.*, 2014).

Alguns merozoítos após de um número indefinido de ciclos de replicação – podendo variar entre as espécies de *Plasmodium* – se desenvolvem em formas sexuais diferenciadas, chamadas macrogametócitos (gametócitos femininos) ou microgametócitos (gametócitos masculinos). Estas formas, ao serem ingeridas pelo

vetor durante o repasto sanguíneo, são levadas até o estômago deste, onde com a influência de moléculas próprias, ácido xanturênico, mudança de temperatura e de pH, sofrem ativação, dando continuidade ao ciclo no interior do hospedeiro invertebrado (ALY; VAUGHAN; KAPPE, 2009; BRASIL, 2010).

No intestino delgado do mosquito, os gametócitos masculinos sofrem gametogênese, produzindo de quatro a oito microgametas flagelados cada um, os quais se fundem ao gameta feminino, formando um zigoto. O zigoto se desenvolve, dando origem ao oocineto, que é uma célula alongada móvel capaz de atravessar e invadir a parede intestinal do mosquito. A transmigração pelas células epiteliais causa a ativação do oocineto, iniciando sua transformação para oocisto. O oocisto sofre multiplicação esporogônica, formando milhares de esporozoítos, que são liberados na hemocele. Os esporozoítos são então carregados pela hemolinfa para todos os tecidos do mosquito, incluindo suas pernas e veias das asas. Ao passar pela lâmina basal das glândulas salivares do mosquito, alguns ligantes dos esporozoítos reconhecem receptores específicos do hospedeiro e aderem à lâmina basal. Os esporozoítos aderidos rompem a lâmina e invadem as células das glândulas salivares onde permanecem até serem injetados em um novo hospedeiro vertebrado através da picada do mosquito (ALY; VAUGHAN; KAPPE, 2009; CROMPTON *et al.*, 2014; LEITE *et al.*, 2013)

4.4 Manifestações Clínicas

A fase sanguínea é responsável pela maior parte das manifestações clínicas da doença, pois o rompimento sincronizado de eritrócitos infectados faz com que ocorra a liberação de proteínas do parasita e de restos celulares do hospedeiro na corrente sanguínea, o que gera a ativação de macrófagos e monócitos e liberação de citocinas pró-inflamatórias, ocasionando febre e outras manifestações clínicas típicas de malária não complicada (WHITE *et al.*, 2014).

Os sintomas iniciais da malária não complicada não são específicos e podem ser confundidos com os de uma doença sistêmica viral de baixa importância. Cada espécie de *Plasmodium* determina aspectos clínicos diferentes, mas em geral os sintomas típicos incluem dor de cabeça, fadiga, desconforto abdominal e dor nos músculos e nas articulações. Estes sintomas podem ser seguidos por febre, calafrio, sudorese, anorexia, vômito e indisposição. Em crianças pequenas há mais chances

de ocorrer anemia crônica e hepatoesplenomegalia, principalmente em regiões nas quais as reinfecções são comuns (TRAMPUZ *et al.*, 2003; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Outra manifestação clínica característica do acesso malárico é o caráter cíclico dos acessos febris, que ocorrem com a liberação do pigmento malárico. Os ciclos podem ser de 3 dias, no caso de *P. falciparum* e *P. vivax* e são denominados febre terçã maligna e febre terçã benigna, respectivamente (ALMEIDA *et al.*, 2012; HORTA *et al.*, 2005).

Em alguns casos, as hemácias parasitadas se ligam ao endotélio de diversos órgãos através da interação de proteínas do parasita, expressas na membrana da célula infectada, dando origem à chamada “malária complicada”. O tratamento inadequado faz com que estas células continuem se acumulando, causando obstrução de micro vasos e prejudicando a perfusão de diversos órgãos, como pulmão, fígado, intestino e cérebro. Ocorre a manifestação de sintomas mais graves, como anemia severa e hipoglicemia em crianças, e edema pulmonar agudo e icterícia em adultos. Com a piora do quadro, podem surgir várias complicações renais, desenvolvimento de síndrome cerebral (malária cerebral) e morte (MILLER *et al.*, 2013; WHITE *et al.*, 2014).

4.5 Diagnóstico

As técnicas de gota espessa e gota estendida consistem na procura do parasita em sangue periférico utilizando microscopia de luz. Estes métodos são até hoje considerados padrão ouro no diagnóstico de malária, por possuírem alta sensibilidade, baixo custo e permitirem a quantificação de parasitas. No entanto, quando a parasitemia é baixa, como no caso de amostras coletadas pós-tratamento ou durante a fase crônica da doença, a sensibilidade é muito baixa, podendo gerar resultados falsos negativos. Além disso, estas técnicas são demoradas, e exigem profissionais altamente treinados e experientes, recursos escassos e muitas vezes ausentes em países onde a doença não é endêmica (MURRAY *et al.*, 2008; PERANDIN *et al.*, 2004).

Diante das dificuldades encontradas no método padrão, outros métodos de diagnóstico mais simples e sensíveis vêm sendo desenvolvidos e têm se tornado

mais comuns. Entre eles estão: microscopia de fluorescência, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e testes rápidos por imunocromatografia para a detecção de lactato desidrogenase ou da proteína de *P. falciparum* rica em histidina (PfHRP2) (TRAMPUZ *et al.*, 2003).

PfHRP2 é uma proteína exclusiva de *P. falciparum* rica em histidina e os testes rápidos baseados em sua detecção são práticos e não demandam profissionais altamente treinados. No entanto, este teste pode gerar resultados falsos, pois é possível que o antígeno permaneça no sangue por semanas após o tratamento, o que limita seu uso em áreas de alta transmissibilidade. Além disso, algumas formas variantes da proteína têm sido identificadas e podem ser responsáveis por resultados falsos negativos (MURRAY *et al.*, 2008).

Os testes baseados na detecção de lactato desidrogenase e de aldolase de *Plasmodium* são efetivos na identificação de todas as espécies que afetam humanos. No entanto, a sensibilidade é baixa em outras espécies além de *P. falciparum*, principalmente para *P. vivax*, em casos de parasitemia abaixo de 200 parasitas por microlitro de sangue (MURRAY *et al.*, 2008; PERANDIN *et al.*, 2004).

Os testes rápidos são muito úteis em investigações epidemiológicas devido à sua simplicidade e rapidez, porém, possuem alto custo e não quantificam a parasitemia do indivíduo. Além disso, há uma desvantagem na detecção de parasitas quando se trata de *P. vivax*, deixando clara a necessidade de estudos para o desenvolvimento de métodos específicos mais sensíveis para esta espécie (MUELLER *et al.*, 2009; MURRAY *et al.*, 2008; WHITE *et al.*, 2014).

A PCR convencional para detecção da subunidade menor do RNA ribossomal também pode ser usada, e o método de PCR em tempo real permite o monitoramento contínuo da formação dos produtos, além de possibilitar o processamento de um grande número de amostras ao mesmo tempo. Essas técnicas possuem várias vantagens sobre as técnicas de microscopia e testes rápidos, sendo altamente específicas e sensíveis, permitindo a detecção em pacientes com baixa parasitemia (cinco parasitas por microlitro de sangue) e oferecendo vantagem em infecções mistas. No entanto, este método também possui algumas limitações técnicas, como o alto custo e a necessidade de protocolos

4.6.1 Inibidores da produção de hemozoína

Quando dentro das hemácias, os parasitas precisam de uma grande quantidade de nutrientes para sua replicação, e por terem capacidade limitada de sintetizar aminoácidos, degradam a hemoglobina humana a fim de obter tais nutrientes. O processo ocorre dentro do vacúolo digestivo do parasita após endocitose da hemoglobina (Hb). Com a quebra de Hb, diversos componentes são liberados, entre eles o grupo heme, ou ferriprotoporfirina IX (FP), que é tóxico ao parasita, devido à sua capacidade de gerar oxigênio reativo. Para evitar a toxicidade, o parasita agrega este composto, gerando um pigmento cristalino, insolúvel e não tóxico chamado hemozoína (FITCH, 1998; O'BRIEN *et al.*, 2011).

Os antimaláricos quinolínicos, aril-alcoóis, e derivados da artemisinina ficam concentrados no vacúolo digestivo e sua ação parece estar relacionada à interferência no sequestro de FP e inibição da cristalização da hemozoína, por meio de interações com o grupo heme, fazendo com que o composto tóxico se acumule em concentrações suficientemente altas para matar o parasita. Esta interação explicaria a toxicidade dos medicamentos ao parasita, porém, o exato mecanismo não foi descrito até o momento (FITCH, 1998; FRANÇA; DOS SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

4.6.1.1 Derivados da artemisinina

A artemisinina (ou *qinghaosu*, como é conhecida em chinês) é um produto natural extraído das folhas e flores de uma erva medicinal chinesa, a *Artemisia annua*. Esta planta foi documentada entre 200 e 340 d.C. pelos chineses como tratamento para calafrios e febre, com sintomas típicos da malária, como a icterícia. O princípio ativo foi isolado em 1972, mas as pesquisas envolvendo este composto já faziam parte de um projeto militar secreto japonês desde 1967, intitulado “Projeto 523”, que tinha como objetivo ajudar os militares vietnamitas a combater a malária, conferindo assim uma vantagem estratégica contra os norte-americanos (MAUDE; WOODROW; WHITE, 2010).

Classificado como uma lactona sesquiterpênica, este composto pode ser facilmente reduzido, resultando na formação do metabólito diidroartemisinina, que é mais ativo do que a artemisinina em si. Vários outros compostos foram derivados a

partir da diidroartemisinina, como o artesunato de sódio, o arteméter e o arteéter (BALINT, 2001; MAUDE; WOODROW; WHITE, 2010).

Além de sua ação pela interferência na formação da hemozoína, citada anteriormente, existem outros modos de ação sendo discutidos para a artemisinina e seus derivados. Estes compostos possuem uma ponte de peróxido em sua estrutura química, importante na sua ação como esquizonticida sanguíneo e gametocida (BALINT, 2001).

Estudos mostram que a ponte de peróxido pode ser clivada pela redução do íon ferroso presente no grupo heme da hemoglobina. Ao ser liberado, o peróxido forma um ou mais radicais livres, que podem alquilar ou modificar covalentemente proteínas, consequentemente lesando a membrana e causando a degeneração do parasita no interior de eritrócitos (FRANÇA; DOS SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

A atividade antimalárica da artemisinina e de seus derivados é muito rápida, apresentando resposta de 1 a 3 dias após o início do tratamento e reduzindo rapidamente a parasitemia. A monoterapia não é recomendada, pois os compostos à base de artemisinina apresentam alta taxa de recrudescência (em torno de 10%) e é necessário um tratamento longo (7 dias) para que se obtenha o efeito terapêutico desejado. Quando usada em combinação com outro medicamento antimalárico, o tempo de tratamento cai para 3 dias e os parasitas são menos expostos à artemisinina, reduzindo a probabilidade do aparecimento de resistência. Estas associações com derivados da artemisinina são chamadas ACT's (terapia de combinação baseada em artemisinina), e são altamente recomendadas para o tratamento de malária resistente a outros medicamentos, principalmente a causada por *P. falciparum*. Em 2006, se tornaram oficialmente as drogas de primeira escolha no mundo todo para tratamento de malária não complicada causada por *P. falciparum*, por recomendação da organização mundial de saúde (BALINT, 2001; BIAMONTE; WANNER; LE ROCH, 2013; MILLER *et al.*, 2013).

Atualmente, a OMS recomenda a utilização de 5 combinações de ACT's, demonstradas na tabela 1, que são consideradas seguras e efetivas:

Tabela 1 – Terapia baseada na combinação de derivados da artemisinina

Componente a base de artemisinina	Droga associada	Tempo de meia-vida da droga associada	Áreas onde a ACT é geralmente utilizada
Artesunato	Mefloquina	2-3 semanas	Sudeste Asiático,
Arteméter	Lumefantrina	3-4 dias	América do Sul
Artesunato	Amodiaquina	~10 dias	África, sul da Ásia, Oriente médio,
Artesunato	Sulfadoxina-Pirimetamina	3-7 dias	Oeste africano
Diidroartemisinina	Piperaquina	4-5 semanas	Sul da Ásia, Oriente Médio, Sudeste Asiático, China, África

Fonte: Adaptado de (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014)

No entanto, ainda são poucas as agências autorizadas a produzir os ACT's, tornando difícil a tentativa de suprir a demanda dos mesmos. Isso faz com que o preço destes medicamentos seja até 20 vezes maior do que o de medicamentos não tão eficazes e com alta taxa de resistência, como a cloroquina e sulfadoxina-pirimetamina. Os altos preços tornam inviável sua utilização, principalmente levando-se em consideração que a maioria dos países, onde seu uso é mais necessário, possuem uma verba de aproximadamente \$100 per capita por ano para gastos com saúde (ARROW; PANOSIAN; GELBAND, 2004).

Em 2013, 79 dos 88 países nos quais *P. falciparum* é endêmico, já haviam adotado o protocolo de tratamento com base em ACT's, conforme recomendado pela OMS. No Brasil, o uso de combinados a base de artemisinina é preconizado pelo Ministério da Saúde em casos de malária *falciparum* (BRASIL, 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

4.6.1.2 Família das quinolinas

A quimioterapia da malária precedeu as descobertas sobre o parasita em aproximadamente 300 anos. No século XVII os padres jesuítas observaram que os índios da América do Sul utilizavam a casca de uma árvore nativa do Peru no preparo de chás e bebidas, ingeridas para tratamento de febre. Em 1742, a árvore recebeu o nome científico de *Cinchona sp.* Em 1820, a quinina foi descrita como principal componente ativo da casca da *Cinchona ledgeriana* e no início de 1821 seu

pó já era comercializado no mundo todo, sendo conhecido como “pó dos jesuítas” (CUNICO *et al.*, 2008; FRANÇA; DOS SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

A família das quinolinas é parte do grupo de inibidores da hemozoína, e seu modo de ação conhecido foi descrito anteriormente neste trabalho. Dentre estes compostos, a quinina é uma das mais conhecidas por ser precursora das 4-aminoquinolinas (que incluem amodiaquina, cloroquina, piperaquina e hidroxicloroquina), das 8-aminoquinolinas (primaquina e pamaquina) e dos álcoois quinolínicos (lumefantrina, mefloquina e halofantrina) (FRANÇA; DOS SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

Dentre as 4-aminoquinolinas, a mais relevante é a cloroquina (CQ), desenvolvida durante a segunda guerra mundial. A CQ é um esquizonticida sanguíneo que pode ser utilizado em infecções por *P. falciparum* ou *P. vivax*, sendo um potente gametocítico, no caso de *P. vivax*. No Brasil, desde 1946, a dosagem recomendada para tratamento com CQ em adultos é de 1,5 g distribuídos em 72 horas e, para a profilaxia, 0,3 g por semana. Durante anos a CQ foi utilizada como monoterapia contra a malária, fato que contribuiu para o aparecimento de cepas resistentes a esta droga. A cloroquina ainda é utilizada no tratamento de infecções por *P. vivax* não resistente (BAIRD, 2004; BRAY *et al.*, 2005).

Com a necessidade da descoberta de novos antimaláricos, foram sintetizados alguns derivados da CQ, como a mefloquina e a amodiaquina, que possuem a mesma ação esquizonticida do composto original. A amodiaquina é muito semelhante à CQ e foi descrita recentemente como um pró-fármaco (LEITE *et al.*, 2013).

A mefloquina é muito utilizada na prevenção de malária por seu grande tempo de meia vida, fazendo com que seja necessária apenas uma dose semanal do medicamento. No entanto, é conhecida por gerar diversos efeitos adversos neurológicos, como depressão, psicose e pesadelos (BIAMONTE; WANNER; LE ROCH, 2013).

As 8-aminoquinolinas são esquizonticidas teciduais, sendo a primaquina a mais importante por sua potente ação contra formas teciduais do *Plasmodium*. A primaquina tem ação lenta e é geralmente utilizada no tratamento de malária

causada por *P. vivax* em conjunto com outras drogas, como a cloroquina. Atualmente, é a única droga em uso provada totalmente efetiva contra gametócitos de todas as espécies de *Plasmodium*. No Brasil, para seu uso como hipnozoíta, a dose diária recomendada é de 0,25 mg/kg durante 14 dias, com exceção de gestantes no primeiro trimestre e crianças menores de um ano de idade (BIAMONTE; WANNER; LE ROCH, 2013; BRASIL, 2010).

Entretanto, ainda há um grande problema envolvido no uso da primaquina: em pacientes com deficiência de G6PD (Glicose-6-fosfato-desidrogenase), esta droga pode gerar anemia hemolítica aguda fatal. Estima-se que 8% das pessoas em zona endêmicas possuam esta deficiência e o seu diagnóstico é inacessível na maioria dessas regiões. Para tentar contornar este problema, os pacientes sob tratamento com primaquina são orientados a procurar um médico aos primeiros sinais clínicos de hemólise (KEVIN BAIRD, 2013).

Outra 8-aminoquinolina conhecida é a pamaquina, famosa por ter sido a primeira substância sintética a ser usada em humanos com fins terapêuticos. Foi primeiramente vista como um possível inibidor do crescimento de plasmódio, por Paul Erlich, que obteve sucesso ao curar dois pacientes utilizando o corante azul de metileno. Em 1925, a estrutura do corante foi modificada por pesquisadores alemães, dando origem à pamaquina. Porém, a mesma possui alta toxicidade e seu uso foi descontinuado após um breve período (HOBBS; DUFFY, 2011; VALE; MOREIRA; GOMES, 2005).

4.6.2 Inibidores da síntese do ácido fólico

O surgimento e a popularização de antimaláricos inibidores da síntese do ácido fólico ocorreram como resposta à crescente resistência à cloroquina. Durante a guerra do Vietnã, devido ao grande número de casos, o exército americano iniciou extensa pesquisa, com a esperança de encontrar algum medicamento eficaz no tratamento de malária resistente à CQ. Foi então que a Pirimetamina começou a ser comercializada e utilizada (CUNICO *et al.*, 2008).

O ácido tetrahidrofólico é sintetizado a partir do ácido fólico e é um importante cofator em processos metabólicos fundamentais para a viabilidade do parasita. As principais enzimas envolvidas nesta síntese, e que são, portanto, alvos tradicionais

para tratamento e profilaxia de malária há mais de meio século, são: a diidropteroato sintase (DHPS) e a diidrofolato redutase (DHFR) (GREGSON; PLOWE, 2005; HYDE, 2005; SCALERCIO, 2010).

O ácido para-aminobenzóico (PABA) do hospedeiro é utilizado pela DHPS na fase inicial da síntese. Análogos estruturais deste ácido, que competem pelo sítio de ligação da enzima DHPS, podem inibir a atividade da mesma, o que impede a formação de diidropteroato. Este é o mecanismo de ação de fármacos como as sulfonas (dapsona) e sulfonamidas (sulfadoxina, sulfadiazina e sulfaleno) (CUNICO *et al.*, 2008; FERONE, 1977; INOUE, 2014).

A enzima DHFR catalisa outra importante etapa da síntese: a conversão de diidrofolato para tetrahidrofolato. As diaminopirimidinas (pirimetamina e trimetropim) e biguanidas (proguanil, cloroproguanil e cicloguanil), inibem a atividade desta enzima mimetizando o anel piridínico do seu substrato e competindo com seu sítio ativo (CUNICO *et al.*, 2008; INOUE, 2014).

A inibição de DHPS e da DHFR gera redução na produção do ácido tetrahidrofólico, o que pode prejudicar processos fundamentais para a sobrevivência do parasita, como a biossíntese de purinas e pirimidinas para a replicação de DNA e o catabolismo de diversos aminoácidos, levando ao impedimento da divisão nuclear (CUNICO *et al.*, 2008; HYDE, 2005; INOUE, 2014).

Os principais medicamentos desta classe são a pirimetamina e a sulfadoxina. A partir dos anos 1970, descobriu-se maior eficácia no tratamento quando ambas foram ministradas de forma combinada, que foi denominada Sulfadoxina-pirimetamina (SP). A meia vida de SP é de cerca de cinco dias, o tratamento era feito em dosagem única, e foi altamente eficaz durante alguns anos. A combinação era uma excelente alternativa, devido ao seu baixo custo e grande eficácia, porém, devido ao surgimento de cepas resistentes que ocorreu pouco tempo depois de sua implantação, deixou de ser utilizado como tratamento e atualmente é recomendado apenas como prevenção para gestantes (PETERSEN; EASTMAN; LANZER, 2011).

A dapsona e o proguanil também foram utilizados em combinação, porém a dapsona possui efeito hemolítico em pacientes com deficiência de G6PD, assim

como a primaquina, mas de forma muito mais acentuada, por isso sua utilização não é mais recomendada (PETERSEN; EASTMAN; LANZER, 2011).

4.6.3 Inibidores da transcrição procariótica

Além dos medicamentos antimaláricos tradicionais, foi demonstrada em estudos a eficácia de tetraciclinas, que são antibióticos sintéticos derivados de uma ciclina produzida por várias espécies do gênero *Streptomyces*. Estes medicamentos oferecem uma alternativa de tratamento eficaz e de baixo custo, que pode ser utilizada em casos de malária resistente a cloroquina e SP e por isso, seu uso se tornou recomendado pela OMS em 1985 (BARATA; BOULOS; DUTRA, 1986; GAILLARD; MADAMET; PRADINES, 2015).

A doxiciclina é um dos antibióticos mais utilizados neste contexto e que apresenta maior evidência de sua efetividade contra malária. Em *P. falciparum*, foi demonstrado o bloqueio da expressão do apicoplasto, impedindo o desenvolvimento de parasitas viáveis. Outra teoria para seu modo de ação é que atuem inibindo diretamente a síntese de proteína e reduzindo a atividade mitocondrial (GAILLARD; MADAMET; PRADINES, 2015; TAN *et al.*, 2011).

Sua associação a antimaláricos se mostrou eficaz contra cepas de malária resistentes à CQ, podendo ser usada como profilaxia para viajantes e como tratamento para malária por *P. falciparum*, quando associada com sulfato de quinina (quinino), e *P. vivax*, quando associada ao sulfato de quinina e à primaquina. No entanto, seu uso é altamente contraindicado em gestantes e crianças menores de 8 anos (GAILLARD; MADAMET; PRADINES, 2015; TAN *et al.*, 2011).

A clindamicina é outro antibiótico que pode ser usado no tratamento de malária. Possui atividade antimalárica similar à da doxiciclina e é muito usada em combinação com quinino na América do Sul e na África (PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 2000).

Uma das desvantagens na utilização destes medicamentos é sua ação lenta, por isso são sempre administrados em associação com esquizotomicidas de ação rápida, como o sulfato de quinino, para que ocorra prontamente a melhora dos sintomas e seja evitada a complicação da doença. Além disso, um ponto negativo no uso destes medicamentos é a necessidade de um longo período de tratamento (em

torno de sete dias) o que diminui a aceitação por parte dos pacientes e aumenta a probabilidade do uso incorreto da medicação (BARATA; BOULOS; DUTRA, 1986).

4.6.4 Inibidores do transporte de elétrons mitocondrial

A principal droga nesta categoria é a atovaquona, que começou a ser desenvolvida logo após o início da segunda guerra mundial, durante a corrida americana que visava à descoberta de novos antimaláricos que pudessem suprir a alta necessidade da época (NIXON *et al.*, 2013).

O *Plasmodium* vive em condições anaeróbicas e por isso é necessária a ação da mitocôndria em alguns processos metabólicos. A Atovaquona é uma hidroxi-nafto-quinona que atua como um inibidor competitivo da ubiquinona, inibindo a cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria do parasita (CUNICO *et al.*, 2008; VALE; MOREIRA; GOMES, 2005).

A droga atua, mais especificamente, inibindo o acoplamento do complexo citocromo bc1 à diidroorotato desidrogenase, enzima fundamental na síntese de nucleotídeos. Esta inibição gera perda da função mitocondrial e afeta a biossíntese de pirimidinas, necessárias à formação de nucleotídeos, impedindo a replicação de DNA e, conseqüentemente, levando à morte do parasita (BIAMONTE; WANNER; LE ROCH, 2013; CUNICO *et al.*, 2008; NIXON *et al.*, 2013).

Além disso, ainda há outro mecanismo de ação sugerido para este medicamento. Estudos mostram que a mitocôndria pode exercer um papel na cascata de morte celular programada (PCD) em protozoários. Srivastava; Rottenberg; Vaidya (1997), sugerem que a inibição do transporte de elétrons mitocondrial pela Atovaquona possa desencadear uma cascata similar à da PCD, levando à morte do parasita.

A ação da Atovaquona, assim como de outras drogas inibidoras dos processos mitocondriais, foi demonstrada mais lenta do que de outras drogas antimaláricas, provavelmente por atuar apenas em trofozoítos. Nos dias atuais, é usada em combinação com o proguanil no tratamento de casos de malária não complicados e como profilaxia preventiva para viajantes (NIXON *et al.*, 2013).

4.7 Mecanismos moleculares que geram variabilidade genética

O genoma de *P. falciparum* possui 23 Mb, distribuídas por 14 cromossomos haploides (durante os estágios no hospedeiro vertebrado). Grande parte é constituída por AT, que representa uma porcentagem muito maior do genoma de *P. falciparum* do que o de *P. vivax*, por exemplo (CONWAY, 2007; FENG *et al.*, 2003).

Um dos atributos genéticos mais marcantes do parasita é a característica altamente polimórfica de seu genoma, que configura um grande desafio quando se trata do desenvolvimento de vacinas e manutenção da eficácia de antimaláricos. É evidente que o parasita se beneficia de sua alta diversidade genética, mas o mecanismo de manutenção de tal diversidade ainda é desconhecido (DAS *et al.*, 2007; FENG *et al.*, 2003).

A taxa de mutações de *Plasmodium* pode variar, não só entre as diferentes cepas do parasita, mas também entre os cromossomos, que podem ser mais ou menos propensos à recombinação. A taxa de recombinação pode ser influenciada pela intensidade de transmissão e pela diversidade na população local de parasitas e possibilita a este que se adapte rapidamente às condições adversas (EKLAND; FIDOCK, 2007; JIANG *et al.*, 2011).

A distribuição geográfica de cepas resistentes é influenciada por fatores como diferença de estratégia de tratamento, que resulta em uma diferente pressão farmacológica, intensidade de transmissão e diferença na imunidade da população (PASVOL, 2003).

As mutações genéticas envolvidas na resistência, em sua maioria, ocorrem naturalmente, sendo consideradas mutações espontâneas. A resistência a antimaláricos surge quando estas mutações espontâneas são selecionadas por diferentes concentrações da droga, o que leva à inibição diferencial de distintas populações genéticas do parasita. Portanto, podemos dizer que o início da resistência ocorre em duas fases: na primeira, um evento genético produz uma mutação “de novo”, conferindo vantagem ao parasita em relação à droga, e na segunda, os parasitas resistentes são selecionados e se multiplicam, criando uma população parasitária com susceptibilidade reduzida ao tratamento (ANGELICA; FONG, 2008; CONWAY, 2007; SINHA; MEDHI; SEHGAL, 2014).

Dentre os tipos de polimorfismos, estão os microssatélites, que são repetições de pequenas sequências de nucleotídeos, as pequenas inserções ou deleções (indel) e os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (EKLAND; FIDOCK, 2007).

O tipo de mutação mais envolvido no desenvolvimento de resistência é o SNP, característico por envolver a troca de apenas uma das bases. Esta troca pode gerar uma mutação sinônima (quando a mutação não interfere no aminoácido codificado) ou uma mutação não sinônima (quando a mutação altera o códon de forma que este passa a codificar um aminoácido diferente do original, podendo ou não acarretar em mudança ou perda de função da proteína produzida) (ALBERTS *et al.*, 2010).

Alguns estudos sugerem que devido ao seu genoma rico em AT, ocorre uma redução no número de sítios sinônimos, o que explicaria a grande quantidade de nsSNP (Polimorfismos de nucleotídeo único não sinônimos) (FENG *et al.*, 2003).

Outra possível explicação para o alto número de nsSNPs seria a seleção positiva gerada por pressão de medicamentos ou do sistema imune sobre alguns dos genes, além da escassez de sítios sinônimos (FENG *et al.*, 2003).

As nsSNP variam muito entre as populações de *P. falciparum* e precisam ser estudadas mais profundamente, pois muitas delas acarretam variações funcionais importantes para a saúde pública e para o entendimento da biologia do parasita (NEAFSEY *et al.*, 2008).

4.8 Resistência

Um dos maiores obstáculos na luta contra a malária é a resistência aos antimaláricos. O primeiro caso reportado de resistência é o da quinina em 1844 e depois em 1910, mas o mais relevante foi a resistência à cloroquina, que surgiu no fim dos anos 60. Desde então, cada vez que um novo medicamento é introduzido como um tratamento eficaz, a resistência ao mesmo surge pouco tempo depois, prejudicando os esforços para controle da doença. Até mesmo no caso dos derivados de artemisinina, que até então pareciam mais seguros em relação ao desenvolvimento de resistência, já houve relatos do aparecimento de cepas resistentes, gerando uma grande preocupação (D'ALESSANDRO; BUTTIENS, 2001;

PETERSEN; EASTMAN; LANZER, 2011; TALISUNA; BLOLAND; D'ALESSANDRO, 2004).

A resistência pode ser definida como a incapacidade de uma droga de realizar o efeito desejado, mesmo quando sua concentração na corrente sanguínea é considerada adequada. No caso dos antimaláricos, quando estes não são mais capazes de matar parasitas antes susceptíveis, é dito que houve desenvolvimento de resistência (SHANKS, 2006).

Conforme explicado anteriormente, a resistência aos medicamentos ocorre pela seleção de parasitas com mutações genéticas aleatórias que conferem vantagem aos indivíduos portadores (SHANKS, 2006; WHITE; PONGTAVORNPINYO, 2003).

O aparecimento de cepas resistentes pode ser notado quando há falha no tratamento, alta taxa de recidivas ou aumento no número de casos em regiões onde a doença é controlada. No entanto, não é sempre que as falhas no tratamento podem ser associadas ao aparecimento de resistência. Também podem ocorrer como resultado de outros fatores como uso da dosagem incorreta, interrupção do tratamento antes do tempo recomendado, deficiência na absorção intestinal da droga, entre outros (SHANKS, 2006).

O monitoramento de resistência é feito por testes padronizados de eficácia terapêutica, testes *in vitro* e tipagem de marcadores moleculares (PASVOL, 2003).

4.8.1 Marcadores moleculares de resistência de *P. falciparum*

Os mecanismos de resistência envolvem mudanças na acumulação do medicamento ou nos mecanismos de efluxo, como no caso da cloroquina, amodiaquina, quinina, halofantrina e mefloquina, ou por uma redução na afinidade da droga com seu alvo, devido a mutações pontuais nos genes que os codificam, como no caso da pirimetamina, cicloguanil, sulfonamidas, atovaquona e artemisinina (SINHA; MEDHI; SEHGAL, 2014)

Os estudos a fim de encontrar marcadores de resistência a antimaláricos têm se tornado cada vez mais comuns, e muitos já foram descritos, conforme demonstrado na tabela 2. Neste trabalho serão abordados alguns dos principais marcadores conhecidos para as drogas antimaláricas mais utilizadas.

Tabela 2 – Primeira resistência a antimaláricos relatada e marcadores moleculares

Droga antimalárica	Data de introdução	Primeira resistência relatada	Marcador molecular
Quinino	1632	1910	<i>pfmhe</i> : microssatélite ms4670
Cloroquina	1945	1957	<i>crt</i> : C72S, M74I, N75D/E, K76T, A220S, Q271E <i>mdr1</i> : N86Y, Y184F, S1034C, N1042D, D1246Y
Proguanil	1948	1949	<i>dhfr</i> : A16V, S108T ou N51I, C59R, S108N, I164L
Sulfadoxina + Pirimetamina	1967	1967	<i>dhps</i> : S436A/F, A437G, K540E, A581G, A613S/T <i>dhfr</i> : N51I, C59R, S108N, I164L ou C50R, N51I, S108N, I164L
Mefloquina	1977	1982	Mudanças no número de cópia <i>pfmdr1</i>
Halofantrina	1988	1993	Mudanças no número de cópia <i>pfmdr1</i>
Atovaquona	1996	1996	<i>cyt b</i> : Y268S/N
Artemisinina	1971	1980	Amplificação do número de cópias de <i>pfmdr1</i> , Mutações de <i>pfatpase6</i> e <i>pfubp-1</i> , Recentemente, foi confirmada a mutação no domínio K13-Propeller
Artesunato	1975	2008	NA
Artesunato + Mefloquina	2000	2009	Mudanças no número de cópia <i>pfmdr1</i>

Fonte: (SINHA; MEDHI; SEHGAL, 2014)

4.8.1.1 Resistência a antifolatos

A resistência a antimaláricos inibidores da síntese de ácido fólico foi primeiramente documentada em 1969. Esta resistência consiste em mutações pontuais em alguns genes, incluindo o *pfdhfr*, que codifica para a diidrofolato redutase (DHFR). A maioria das mutações neste gene afeta aminoácidos próximos ao sítio ativo, o que interfere na ligação de inibidores competitivos dos antifolatos (COSTANZO; HARTL, 2011).

Ao contrário da resistência à CQ, a resistência a antifolatos surgiu rapidamente. A resistência a pirimetamina surgiu meses após sua introdução como tratamento de primeira linha. Supõe-se que a mutação confira vantagem de sobrevivência adicional, como eficiência na invasão ou reprodução. Outra possibilidade é de que a desvantagem na ausência da droga seja menor, quando comparada a de fenótipos resistentes à cloroquina. A resistência a pirimetamina e proguanil pode ocorrer simultaneamente (PASVOL, 2003).

4.8.1.1.1 PfDHFR

As mutações do gene *dhfr* podem surgir e se manter independentemente de pressão do medicamento, pois, ao contrário da maioria das mutações de resistência, esta não causa prejuízo à aptidão do parasita e nem gera custos metabólicos para a sua manutenção (COSTANZO; HARTL, 2011).

A DHFR de *P. falciparum* é codificada por um gene de cópia única localizado no cromossomo 4. Juntamente com a timidilato sintase, a DHFR forma uma enzima bifuncional de 608 aminoácidos (PfDHFR-TS), que atua na conversão de diidrofolato para tetrahidrofolato no ciclo da síntese do ácido fólico, e sua inibição gera a supressão da síntese de DNA, conforme explicado anteriormente (GREGSON; PLOWE, 2005).

Dieckmann e Jung (1986), afirmam que em cepas resistentes a captação da droga é a mesma que a observada em cepas sensíveis, e que a diferença entre ambas é a redução da sensibilidade de DHFR à atividade inibitória do medicamento, que pode ser até 300 vezes menor.

Uma mutação crucial, mas não exclusiva deste grupo, é a troca de uma serina por uma asparagina na posição 108 do gene (S108N). Esta mudança afeta a acomodação da droga no sítio ativo da enzima, pois a interação entre o NH₂ da asparagina 108 e o átomo de Cl da pirimetamina, faz com que esta seja deslocada dentro do sítio ativo. O mesmo ocorre com o cicloguanil, mas em menor proporção, pois sua molécula é menos rígida (GREGSON; PLOWE, 2005).

Em outras cepas resistentes isoladas, foram observadas as mutações N51I, C59R e I164L. Estudos demonstram que estas mutações, apesar de não serem essenciais, intensificam a resistência e geram aumento no valor de IC₅₀ (concentração inibitória média) para pirimetamina. O efeito das mutações N51I e C59R é essencialmente silencioso na ausência de S108N, mas possui características aditivas em sua presença. A mutação I164L é frequentemente relacionada à resistência cruzada entre pirimetamina e proguanil (CORTESE; PLOWE, 1998; GREGSON; PLOWE, 2005).

As mutações N51I e C59R não são localizadas próximas ao sítio de ligação, mas estão na mesma hélice do resíduo 54, que é fundamental para a ligação do

substrato. A cadeia lateral de C59R está envolvida na ligação de DHFR, e gera uma melhora na afinidade da ligação do substrato em presença de S108N e N51I (GREGSON; PLOWE, 2005).

Cepas com mutações triplas incluindo S108N, N51I e C59R chegam a ser 225 vezes mais resistentes à pirimetamina e 45 vezes mais resistentes ao Cicloguanil do que as cepas do tipo selvagem, além de estarem envolvidas na resistência a outro importante medicamento desta classe: o trimetopim (GREGSON; PLOWE, 2005).

A resistência ao cicloguanil ocorre frequentemente por uma mutação A16V, que causa perda da sua planaridade devido à interação entre os grupos metil da valina 16 e do cicloguanil, além de interferir na ligação de NADPH (GREGSON; PLOWE, 2005).

Outras mutações descritas incluem a C50R, encontrada na América Latina (similar à mutação africana C59R), e uma repetição de 5 aminoácidos inserida entre os códons 30 e 31, chamada *Bolivia repeat*, que compensa a redução da função enzimática de PfDHFR causada pela mutação I164L (BACON *et al.*, 2009; CORTESE; PLOWE, 1998).

4.8.1.1.2 PfDHPS

PfDHPS (diidropteroato sintase de *P. falciparum*) é um polipeptídio bifuncional que aparece logo em seguida no processo de síntese do folato. Esta proteína é codificada pelo gene *pf dhps*, que também codifica a enzima 7,8-diidro-6-hidroximetilpterina pirofosfoquinase (GREGSON; PLOWE, 2005).

Estudos comparativos entre cepas resistentes e sensíveis às sulfonamidas demonstraram cinco mutações em regiões bem conservadas de *dhps*: S436A/F, A437G, K540E, A581G e A613T/S, sugerindo a correlação destas com a resistência à SP (SRIDARAN *et al.*, 2010).

O mecanismo de resistência à sulfadoxina é muito similar ao dos inibidores de DHFR, sendo que quanto maior o número de mutações pontuais, maior o nível de resistência. Altos níveis de resistência requerem a presença de mutações múltiplas, em adição à mutação nos códons 436, 437 e/ou 540, indicando que talvez a

mutação destes códons seja essencial para a resistência à sulfonamida (PASVOL, 2003).

As mutações em *pf dhps* parecem apenas reduzir a capacidade de ligação da enzima à droga, sem prejudicar a sua atividade normal. Estas mutações causam uma alteração estrutural no sítio de ligação da enzima, fazendo com que a droga seja incapaz de reconhecê-lo (PASVOL, 2003; SRIDARAN *et al.*, 2010).

Quando se trata de resistência *in vivo*, ainda há controvérsias sobre a importância das mutações de DHPS, principalmente aquelas envolvendo os códons 436 e 613, mas sabe-se que é importante que haja resistência em algum nível tanto à sulfadoxina quanto à pirimetamina, para que a combinação (SP) não seja eficaz (GREGSON; PLOWE, 2005; KUBLIN *et al.*, 2002).

4.8.1.2 Mutações em genes transportadores

O genoma de *P. falciparum* codifica múltiplos transportadores e os polimorfismos nestas proteínas podem mediar a resistência a vários agentes antimaláricos, como o sulfato de quinina e a cloroquina, aumentando o efluxo ou diminuindo o influxo destes para a célula (CUI *et al.*, 2015).

4.8.1.2.1 PfCRT

Um estudo comparativo entre cepas resistentes e sensíveis identificou uma região de 36 Kb no cromossomo 7, possivelmente responsável pela resistência à cloroquina. Foi então identificado o gene *pf crt* (Transportador de resistência à cloroquina de *P. falciparum*), que codifica uma proteína transmembrana de 424 aminoácidos (PfCRT), localizada no vacúolo digestivo (VD) do parasita. Homólogos desta proteína foram identificados em várias espécies de *Plasmodium*, incluindo o *P. vivax*. No entanto, em *P. vivax* não foi encontrada correlação alguma entre a mutação do gene homólogo e redução na sensibilidade à CQ, sugerindo-se um diferente mecanismo de desenvolvimento de resistência para esta espécie (BRAY *et al.*, 2005; PETERSEN; EASTMAN; LANZER, 2011).

A tentativa de criação de mutantes com deleção de *pf crt* falhou diversas vezes, sugerindo um papel fundamental desta proteína para a sobrevivência do parasita. Estudos demonstraram que, enquanto em cepas sensíveis ocorre grande

acúmulo de cloroquina no vacúolo digestivo do parasita, nas cepas resistentes este acúmulo é significativamente menor (PETERSEN; EASTMAN; LANZER, 2011).

Dentre as mutações identificadas no gene *pfcr*t, a mais importante é a substituição de uma lisina por uma treonina no resíduo 76 (K76T). Parasitas com esta mutação possuem ao menos três mutações adicionais, que provavelmente compensam a perda de função causada pela mutação inicial. Ao menos 19 resíduos polimórficos adicionais foram identificados em experimentos de suscetibilidade, fazendo deste, um gene extraordinariamente polimórfico. Há várias hipóteses sobre o mecanismo de ação gerado por estes polimorfismos, em especial pelo K76T, porém ainda não há evidências suficientes que suportem estas teorias (PETERSEN; EASTMAN; LANZER, 2011; TRAVASSOS; LAUFER, 2009).

Uma hipótese mais recente é a de que a presença da lisina carregada positivamente na posição 76 no tipo selvagem de PfCRT repeliria a forma catiônica de CQ, prevenindo sua interação com o transportador. Já na forma mutante, a substituição por tirosina remove a carga positiva permitindo que CQ interaja com o transportador PfCRT e saia do vacúolo em direção ao gradiente de concentração (BRAY *et al.*, 2005).

Outra hipótese é que parasitas resistentes à CQ mantenham um pH elevado no interior do VD, levando a uma redução no acúmulo de CQ em sua forma estável. Em teoria, cada molécula de CQ pode se associar a dois prótons, gerando gradiente de concentração na membrana do VD, proporcional ao quadrado do gradiente de prótons. Sendo assim, mesmo uma pequena alteração no pH teria um dramático efeito na concentração de CQ nessa organela. No entanto, as evidências que suportam ambas as teorias ainda não são suficientes e o assunto continua em discussão (BRAY *et al.*, 2005).

A resistência à cloroquina em *Plasmodium falciparum* é multigênica e em experimentos *in vitro* foi observada a modulação do nível de resistência por mutações secundárias na proteína transportadora PfMDR (Proteína de *P. falciparum* de multirresistência à droga), quando em conjunto com a mutação em PfCRT, mas o papel destas mutações na determinação da resposta terapêutica ao tratamento com cloroquina ainda não é bem entendido (TRAVASSOS; LAUFER, 2009; WHITE, 2004).

Outras mutações adicionais foram localizadas nas posições 72 a 78, 97, 220, 271, 326, 356 e 371, e se supõe que estejam entre os segmentos transmembrânicos. A mutação no códon 220, na qual ocorre a troca de arginina por serina acompanha a maioria das mutações K76T. Como dito anteriormente, é provável que a maioria das mutações adicionais seja compensatória e que permitam ao parasita manter sua aptidão, mesmo com a perda de função endógena associada à mutação K76T. Entretanto, não se pode ignorar a hipótese de que algumas contribuam diretamente com a alteração de sensibilidade a agentes antimaláricos (BRAY *et al.*, 2005; CUI *et al.*, 2015; TALISUNA; BLOLAND; D’ALESSANDRO, 2004).

As alterações de PfCRT também influenciam a suscetibilidade a outros antimaláricos além da CQ, incluindo amodiaquina, quinino e lumefantrina. Estudos mostram que mutações no códon 76 podem aumentar a sensibilidade do parasita a mefloquina e artemisinina. Além disso, foi demonstrado que PfCRT é fosforilado nos resíduos S33, S411 e T416, e esta fosforilação pode ter um papel importante na regulação da atividade transportadora ou na especificidade da proteína (CUI *et al.*, 2015; PETERSEN; EASTMAN; LANZER, 2011).

4.8.1.2.2 PfMDR

Conforme explicado anteriormente, PfCRT não é a única proteína envolvida na resistência a cloroquina. Estudos indicam que mutações no gene *pfmdr* (gene de *P. falciparum* de multirresistência à droga) modulam a extensão da resistência conferida por mutações em PfCRT (TRAVASSOS; LAUFER, 2009).

O gene *pfmdr1*, localizado no cromossomo 5, codifica Pgh-1 (Glicoproteína-P homóloga 1), uma bomba de glicoproteína dependente de ATP, envolvida na expulsão de diversos agentes quimioterápicos da célula. Alguns resultados identificaram Pgh-1 como moduladora da absorção e secreção da cloroquina em culturas de parasita *in vitro* e apesar dos polimorfismos não serem primordiais para a resistência, possuem um importante papel na modulação da mesma quando na presença de polimorfismos do gene *pfcr* (SILVA; OLIVEIRA, 2002).

Evidências experimentais mostram que ampliações de *pfmdr1* levam à redução na sensibilidade ao quinino, halofantrina, lumefantrina, mefloquina e

artemisinina. Já polimorfismos nos aminoácidos 86, 184, 1034, 1042 e 1246 de Pgh-1, além de alterarem a sensibilidade a estes fármacos, podem também ser associados à alteração na resposta à CQ. Na África, as mutações N86Y e D1246Y são comuns e foram relacionadas à redução na sensibilidade à CQ e amodiaquina respectivamente. A alteração de *pfmdr* é secundária quando se trata de resistência à CQ, mas é muito importante na redução de sensibilidade à mefloquina, à halofantrina e ao quinino (EKLAND; FIDOCK, 2007; PASVOL, 2003; SANCHEZ *et al.*, 2008; SHAH *et al.*, 2015).

Atualmente no Brasil todas as cepas conhecidas de *P. falciparum* possuem mutação que confere resistência à cloroquina (PINHEIRO, 2013).

4.8.1.2.3 PfMRP1

PfMRP1 (Proteína de *P. falciparum* associado à múltipla resistência) é membro da superfamília de proteínas transportadoras. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nesta proteína foram correlacionados com redução na sensibilidade à cloroquina e ao sulfato de quinina em experimentos *in vitro* (CUI *et al.*, 2015)

4.8.1.2.4 PfNHE

O gene *pfnhe1* (Gene trocador de sódio-hidrogênio de *P. falciparum*) está localizado no cromossomo 13, codifica uma proteína responsável pela troca de Na^+/H^+ (PfNHE) e é altamente polimórfico. PfNHE é uma proteína transmembrana composta por 1920 aminoácidos, localizada na membrana plasmática do parasita. Sua função não foi completamente elucidada, mas a hipótese é de que esta proteína transporte ativamente prótons para o meio extracelular para manter o pH do parasita a 7,4, compensando a acidez gerada pela glicólise, que é a maior fonte de energia do parasita (PETERSEN; EASTMAN; LANZER, 2011).

Polimorfismos em um dos três microssatélites de *pfnhe1*, com um aumento nas repetições de DNNND em ms-4760 foram associadas com um aumento no IC_{50} e uma moderada resistência a quinina em testes *in vitro*. Além disso, a redução da expressão de *pfnhe* demonstrou uma associação entre o nível de expressão da proteína e o grau de resistência à droga (CUI *et al.*, 2015; EKLAND; FIDOCK, 2007; VALDERRAMOS; FIDOCK, 2006).

Pesquisas tentando relacionar as mutações à resposta clínica ao tratamento com diferentes drogas ainda são inconsistentes, mas além do moderado impacto na sensibilidade à quinina, parecem afetar a sensibilidade a outras drogas (CUI *et al.*, 2015; GADALLA *et al.*, 2015).

4.8.1.2.5 PfATP6

Uma das proteínas do parasita que tem sido muito estudada é a PfATP6 (Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático de *P. falciparum*), um ortólogo da SERCA de mamíferos. Alguns estudos utilizando ensaios de resposta dose-dependente demonstraram uma redução da sensibilidade à artemisinina mediante a mutação no gene *pfatp6* (Gene Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático de *P. falciparum*) (O'BRIEN *et al.*, 2011).

Alguns estudos sugerem uma associação entre a mutação S769N e um aumento nos valores de IC₅₀ de arteméter, fazendo com que esta mutação seja sugerida como marcador de resistência. Além disso, parasitas sensíveis a artesunato carregando mutação neste gene foram identificados no Camboja e na Guiana Francesa, mas curiosamente, o polimorfismo não foi encontrado na China, onde a artemisinina tem sido usada há mais tempo. Ainda não é completamente entendido o papel de PfATP6 do modo de ação dos derivados de artemisinina (TRAVASSOS; LAUFER, 2009; VALDERRAMOS; FIDOCK, 2006).

4.8.1.3 Resistência à artemisinina

A artemisinina é considerada a droga de primeira linha no tratamento de malária. Desde o início do uso de ACT's, houve uma atenuação no impacto mundial de malária e até poucos anos atrás a única característica de resistência que havia sido citada era uma redução na sensibilidade causada pela amplificação do número de cópias de *pfmdr*. No entanto, foi descoberta a associação de outra proteína à resistência, a proteína Kelch (K13), codificada por um gene localizado no cromossomo 13 de *P. falciparum*. Foi demonstrado que mutações nesta proteína levam à redução na sensibilidade à artemisinina, colocando em risco sua utilização e preocupando os cientistas de todo o mundo (FAIRHURST, 2015; TAKALA-HARRISON *et al.*, 2015)

A resistência foi relatada primeiramente na parte ocidental do Camboja e agora foi encontrada em outras partes do Camboja, na Tailândia, Mianmar, Vietnam e China (FAIRHURST, 2015; TAKALA-HARRISON *et al.*, 2015)

A validação de K13 como um marcador molecular para a resistência de artemisinina foi feita demonstrando que havia uma mutação C580Y predominante nas cepas do Camboja ocidental, e esta, juntamente com as mutações Y493H e R539T estavam associadas com uma maior taxa de sobrevivência dos parasitas e aumento no tempo de depuração do parasita (FAIRHURST, 2015)

4.8.2 Marcadores moleculares de resistência de *P. vivax*

As cepas de *P. vivax* resistente à CQ surgiu na Ásia nos anos 80 e se espalhou para América do Sul. *P. vivax* também apresenta resistência a outras drogas, incluindo antifolatos, no entanto pouco se sabe sobre marcadores moleculares e sobre o mecanismo de resistência desta espécie (WWARN, 2016).

O estudo de marcadores moleculares de resistência de *P. vivax* têm se baseado na análise de marcadores já conhecidos de *P. falciparum*, por isso, as mais estudadas são as proteínas PvMDR1, PvCRT, PvDHFR e PvDHPS (PETERSEN; EASTMAN; LANZER, 2011).

Foi demonstrada uma associação entre PvMDR1 e alteração na sensibilidade à CQ, em particular a mutação Y976F. No entanto, em alguns estudos, foram encontrados parasitas resistentes com o tipo selvagem do gene ou com mutações diferentes, fazendo com que o papel desta proteína na resistência do parasita seja questionado. Já no caso de PvCRT não foi possível estabelecer uma relação direta entre mutações neste gene e a resistência à CQ (GONÇALVES; CRAVO; FERREIRA, 2014; PETERSEN; EASTMAN; LANZER, 2011).

Em localidades onde a combinação SP é muito utilizada foram encontradas mutações em PvDHFR e PvDHPS, que são alvo destes medicamentos. Também foi demonstrada uma ligação entre a variação no número de cópias de *pvmdr1* e a alteração na sensibilidade do parasita à mefloquina e ao artesunato (PETERSEN; EASTMAN; LANZER, 2011).

5 CONCLUSÃO

A malária continua sendo um grande problema mundial, afetando milhões de pessoas todos os anos. Medidas visando controle e prevenção desta doença são aprimorados cada vez mais, porém, a resistência a medicamentos antimaláricos continua sendo um desafio.

O mapeamento de genótipos resistentes e estudo de marcadores moleculares possuem uma qualidade preditiva e podem ser utilizados no rastreamento de cepas resistentes, para que possa haver a elaboração de uma estratégia que possibilite a contenção da disseminação de tais cepas. Além disso, o melhor entendimento do genoma do parasita e dos mecanismos que levam à resistência pode auxiliar no desenvolvimento de táticas para aumentar a eficácia de medicamentos já em uso e de medicamentos em desenvolvimento.

O monitoramento da resistência a antimaláricos é tão importante no controle e na tentativa de erradicação da doença quanto outras táticas preventivas e de controle, demonstrando, portanto, a necessidade da continuidade de estudos aprofundados sobre os possíveis marcadores moleculares, os tipos de resistência e sua forma de aparecimento.

6 REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1054 p.

ALMEIDA, L. CARDOSO *et al.* Revisão de literatura sobre o mecanismo de ação da artemisinina e dos endoperóxidos antimaláricos. **Textura**, v. 5, n. 9, p. 43–51, 2012.

ALY, A. S. I.; VAUGHAN, A. M.; KAPPE, S. H. I. Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 195–221, out. 2009.

ANGELICA, M. D.; FONG, Y. NIH Public Access. **October**, v. 141, n. 4, p. 520–529, 2008.

ARROW, K. J.; PANOSIAN, C.; GELBAND, H. **Saving Lives, Buying Time: Economics of Malaria Drugs in an Age of Resistance**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2004a.

BACON, D. J. *et al.* Effects of point mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropterate synthase genes on clinical outcomes and *in vitro* susceptibility to sulfadoxine and pyrimethamine. **PloS one**, v. 4, n. 8, p. e6762, jan. 2009.

BAIRD, J. K. Chloroquine Resistance in *Plasmodium vivax*. **Antimicro. Agents Chemo.**, v. 48, n. 11, p. 4075–4083, 2004.

BALINT, G. A. Artemisinin and its derivatives: an important new class of antimalarial agents. **Pharmacology & therapeutics**, v. 90, n. 2-3, p. 261–5, 2001.

BARATA, L. C.; BOULOS, M.; DUTRA, A. P. Emprego da associação tetraciclina e quinino no tratamento da malária causada pelo *Plasmodium falciparum*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 19, n. 3, p. 135–137, 1986.

BARRAS, V.; GREUB, G. History of biological warfare and bioterrorism. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 497–502, 1 jun. 2014.

BARROS, M. P. DE *et al.* Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários intracelulares: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania spp.*, *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium spp.* **Revista Liberato**, p. 01–134, 2012.

BIAMONTE, M. A.; WANNER, J.; LE ROCH, K. G. Recent advances in malaria drug discovery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 10, p. 2829–2843, maio 2013.

BRABIN, B. J. Malaria's contribution to World War One - the unexpected adversary. **Malaria journal**, v. 13, p. 497, jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011. **Boletim Epidemiológico**, v. 44, n. 1 Brasília: Ministério da Saúde, 2013. 16p.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 36p.

BRAY, P. G. *et al.* Defining the role of PfCRT in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance. **Molecular microbiology**, v. 56, n. 2, p. 323–33, abr. 2005.

CAMARGO, E. P. MALÁRIA, MALEITA, PALUDISMO. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 55, n. 1, p.26-30, mar. 2003.

CAMPOS, A. L. V. DE. Combatendo nazistas e mosquitos: militares norte-americanos no Nordeste brasileiro (1941-45). **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 5, n. 3, p. 603–620, fev. 1999.

CONWAY, D. J. Molecular epidemiology of malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 188–204, 2007.

CORTESE, J. F.; PLOWE, C. V. Antifolate resistance due to new and known *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase mutations expressed in yeast. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 94, n. 2, p. 205–214, 1998.

COSTA, M. D. S.; KIRALJ, R.; FERREIRA, M. M. C. Estudo teórico da interação existente entre a artemisinina e o heme. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 25–31, 2007.

COSTANZO, M. S.; HARTL, D. L. The evolutionary landscape of antifolate resistance in *Plasmodium falciparum*. **Journal of genetics**, v. 90, n. 2, p. 187–90, ago. 2011.

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 755–766, 2006.

COX, F. E. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 5, jan. 2010.

CROMPTON, P. D. *et al.* Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. **Annual review of immunology**, v. 32, p. 157–87, jan. 2014.

CUI, L. *et al.* Antimalarial Drug Resistance: Literature Review and Activities and Findings of the ICEMR Network. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 93, n. 3 Suppl, p. 57–68, 2015.

CUNICO, W. *et al.* Antimalarials drugs – history and new approaches. **Rev. Bras. Farm.**, v. 89, n. 1, p. 49–55, 2008.

D'ALESSANDRO, U.; BUTTIENS, H. History and importance of antimalarial drug resistance. **Tropical Medicine and International Health**, v. 6, n. 11, p. 845–848, nov. 2001.

DAS, A. *et al.* Genetic diversity and evolutionary history of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. **Current Science**, Deli, v. 92, n. 11, p.1516-1524, jun. 2007.

Dieckmann, A.; Jung, A. Mechanisms of sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*. **Mol Biochem Parasitol.**, X, v. 19, n. 2, p.143-147, maio 1986.

EKLAND, E. H.; FIDOCK, D. A. Advances in understanding the genetic basis of antimalarial drug resistance. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, n. 4, p. 363–370, 2007.

FAIRHURST, R. M. Understanding artemisinin-resistant malaria: what a difference a year makes. **Curr Opin Infect Dis**, v. 28, n. 5, p. 417–425, 2015.

FENG, X. *et al.* Single-nucleotide polymorphisms and genome diversity in *Plasmodium vivax*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8502–7, 2003.

FERONE, R. Folate metabolism in malaria. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 55, n. 2-3, p. 291–8, jan. 1977.

FITCH, C. D. Involvement of heme in the antimalarial action of chloroquine. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 109, p. 97–105; discussion 105–6, jan. 1998.

FRANÇA, T. C. C.; DOS SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: Aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271–1278, 2008.

GADALLA, N. B. *et al.* Prevalence of *Plasmodium falciparum* anti-malarial resistance-associated polymorphisms in *pfcr*, *pfmdr1* and *pfhe1* in Muheza, Tanzania, prior to introduction of artemisinin combination therapy. **Malaria journal**, v. 14, n. 1, p. 129, 2015.

GAILLARD, T.; MADAMET, M.; PRADINES, B. Tetracyclines in malaria. **Malaria journal**, v. 14, n. 1, p. 445, jan. 2015.

GILLESPIE, Stephen; PEARSON, Richard D.. **Principles and Practice of Clinical Parasitology**. Wiley, 2001. 680 p.

GONÇALVES, L. A.; CRAVO, P.; FERREIRA, M. U. Emerging *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in South America: an overview. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 534–9, ago. 2014.

GREENWOOD, B. M. *et al.* Malaria: Progress, perils, and prospects for eradication. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1266–1276, 2008.

GREGSON, A.; PLOWE, C. V. Mechanisms of Resistance of Malaria Parasites to Antifolates. **Pharmacol Rev**, v. 57, n. 1, p. 117–145, 2005.

HOBBS, C.; DUFFY, P. Drugs for malaria: something old, something new, something borrowed. **F1000 Biology Reports**, v. 3, n. November, 2011.

HORTA, T. *et al.* Estudo De Modelagem Molecular De Complexos Ferriprotoporfirina-Ix E Quinolinocarbinolaminas Antimaláricas: Proposta De Um Farmacóforo. **Quim. Nova**, v. 28, n. 2, p. 244–249, 2005.

HYDE, J. E. Exploring the folate pathway in *Plasmodium falciparum*. **Acta tropica**, v. 94, n. 3, p. 191–206, jun. 2005.

INOUE, J. **Marcadores moleculares para análise do polimorfismo genético relacionado à resposta de *Plasmodium falciparum* aos antimaláricos**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2014.

JIANG, H. *et al.* High recombination rates and hotspots in a *Plasmodium falciparum* genetic cross. **Genome Biology**, v. 12, n. 4, p. R33, 2011.

KEVIN BAIRD, J. Malaria caused by *Plasmodium vivax*: recurrent, difficult to treat, disabling, and threatening to life--the infectious bite preempts these hazards. **Pathogens and global health**, v. 107, n. 8, p. 475–9, 2013.

KUBLIN, J. G. *et al.* Molecular Markers for Failure of Sulfadoxine - Pyrimethamine and Chlorproguanil - Dapsone Treatment of *Plasmodium falciparum* Malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 3, p. 380–388, 2002.

LEITE, F. H. A. *et al.* Malária: Dos velhos fármacos aos novos alvos moleculares. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, p. 59, 2013.

MAUDE, R. J.; WOODROW, C. J.; WHITE, L. J. Artemisinin Antimalarials: Preserving the “Magic Bullet”. **Drug development research**, v. 71, n. 1, p. 12–19, fev. 2010.

MILLER, L. H. *et al.* Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nature medicine**, v. 19, n. 2, p. 156–67, 2013.

MUELLER, I. *et al.* Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 9, p. 555–566, 2009.

MURRAY, C. K. *et al.* Update on Rapid Diagnostic Testing for Malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 97–110, 17 jan. 2008.

NEAFSEY, D. E. *et al.* Genome-wide SNP genotyping highlights the role of natural selection in *Plasmodium falciparum* population divergence. **Genome biology**, v. 9, n. 12, p. R171, 2008.

NIXON, G. L. *et al.* Antimalarial pharmacology and therapeutics of atovaquone. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 68, n. 5, p. 977–85, maio 2013.

O'BRIEN, C. *et al.* Recent clinical and molecular insights into emerging artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*. **Current opinion in infectious diseases**, v. 24, n. 6, p. 570–7, dez. 2011.

OAKS, S. C. *et al.* **Malaria: Obstacles and Opportunities**. Washington D.C.: National Academy Press, 1991.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. *et al.* Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 115, 2010.

PACKARD, R. M.. **The Making of a Tropical Disease: A Short History of Malaria**. Baltimore: JHU Press, 2010. 320 p.

PASVOL, G. How many pathways for invasion of the red blood cell by the malaria parasite? **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 10, p. 430–432, 2003.

PERANDIN, F. *et al.* Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1214–9, mar. 2004.

PETERSEN, I.; EASTMAN, R.; LANZER, M. Drug-resistant malaria: Molecular mechanisms and implications for public health. **FEBS Letters**, v. 585, n. 11, p. 1551–1562, 2011.

PINHEIRO, P. N. E. A. Quimioterapia da malária causada por *Plasmodium falciparum*. **Rev. Quim.**, p. 1–5, 2013.

PUKRITTAYAKAMEE, S. *et al.* Therapeutic responses to quinine and clindamycin in multidrug-resistant falciparum malaria. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 9, p. 2395–8, set. 2000.

RAHMAH, Z. *et al.* Parasitemia induces high plasma levels of interleukin-17 (IL-17) and low levels of interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor- β (TGF- β) in pregnant mice infected with malaria. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, v. 22, n. 3, p. 25–32, 2015.

SANCHEZ, C. P. *et al.* Polymorphisms within PfMDR1 alter the substrate specificity for anti-malarial drugs in *Plasmodium falciparum*. **Molecular microbiology**, v. 70, n. 4, p. 786–98, nov. 2008.

SCALERCIO, S. R. R. A.. **Estudo Teórico Do Mecanismo Redox De Derivados Quinolínicos Na Atividade Antimalárica**. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

SHAH, M. *et al.* Assessment of molecular markers for anti-malarial drug resistance after the introduction and scale-up of malaria control interventions in western Kenya. **Malaria journal**, v. 14, p. 75, jan. 2015.

SHANKS, G. D. Treatment of falciparum malaria in the age of drug resistance. **Journal of postgraduate medicine**, v. 52, n. 4, p. 277–80, 1 jan. 2006.

SILVA, L. H. P. DA; OLIVEIRA, V. E. G. DE. O desafio da malária: o caso brasileiro e o que se pode esperar dos progressos da era genômica. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, p. 49–63, 2002.

SILVA, R. DA; HOCHMAN, G. Um método chamado Pinotti: sal medicamentoso, malária e saúde internacional (1952-1960). **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 18, n. 2, p. 519–543, 2011.

SINHA, S.; MEDHI, B.; SEHGAL, R. Challenges of drug-resistant malaria. **Parasite**, v. 21, p. 61, 2014.

SRIDARAN, S. *et al.* Anti-folate drug resistance in Africa: meta-analysis of reported dihydrofolate reductase (*dhfr*) and dihydropteroate synthase (*dhps*) mutant genotype frequencies in African *Plasmodium falciparum* parasite populations. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 247, 2010.

SRIVASTAVA, I. K.; ROTTENBERG, H.; VAIDYA, A. B. Atovaquone, a Broad Spectrum Antiparasitic Drug, Collapses Mitochondrial Membrane Potential in a

Malarial Parasite. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 7, p. 3961–3966, 14 fev. 1997.

STURM, A. *et al.* Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science (New York, N.Y.)**, v. 313, n. 5791, p. 1287–1290, 2006.

TAKALA-HARRISON, S. *et al.* Independent emergence of artemisinin resistance mutations among *Plasmodium falciparum* in Southeast Asia. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 5, p. 670–679, 2015.

TALISUNA, A. O.; BLOLAND, P.; D'ALESSANDRO, U. History, Dynamics, and Public Health Importance of Malaria Parasite Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 235–254, 1 jan. 2004.

TAN, K. R. *et al.* Doxycycline for malaria chemoprophylaxis and treatment: report from the CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 84, n. 4, p. 517–31, abr. 2011.

TARANTO, A. G. *et al.* Estudos sobre o mecanismo de ação da artemisina e dos endoperóxidos, a mais nova classe de agentes antimaláricos - Parte 1. **Sitientibus**, n. 75, p. 47–58, 2006.

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

TRAMPUZ, A. *et al.* Clinical review: Severe malaria. **Critical care (London, England)**, v. 7, n. 4, p. 315–323, 2003.

TRAVASSOS, M. A.; LAUFER, M. K. Resistance to antimalarial drugs: molecular, pharmacologic, and clinical considerations. **Pediatric research**, v. 65, n. 5 Pt 2, p. 64R–70R, maio 2009.

VALDERRAMOS, S. G.; FIDOCK, D. A. Transporters involved in resistance to antimalarial drugs. **Trends in pharmacological sciences**, v. 27, n. 11, p. 594–601, nov. 2006.

VALE, N.; MOREIRA, R.; GOMES, P. Quimioterapia da malária: Um século no desenvolvimento de antimaláricos. **Quimica**, p. 57–99, 2005.

WHITE, N. J. Antimalarial drug resistance. **The Journal of clinical investigation**, v. 113, n. 8, p. 1084–92, abr. 2004.

WHITE, N. J. *et al.* Malaria. **Lancet**, v. 383, n. 9918, p. 723–35, 22 fev. 2014.

WHITE, N. J.; PONGTAVORNPINYO, W. The de novo selection of drug-resistant malaria parasites. **Proceedings of the Royal Society of London (Series B)**, v. 270, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Who Global Malaria Programme. **World Malaria Report**. 2014. 242p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Treatment of Severe Malaria. **Guidelines For The Treatment of Malaria**. 3 ed. 2015. 313p.

WORLDWIDE ANTIMALARIAL RESISTANCE NETWORK (Org.). **Plasmodium vivax and drug resistance**. Disponível em: <<http://www.wwarn.org/about-us/malaria-drug-resistance/plasmodium-vivax-and-drug-resistance>>. Acesso em: 21 abr. 2016.