



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Deficiência eritrocitária em piruvato cinase por suplementação de fluoreto de sódio (NaF), consequente aumento de difosfoglicerato (2,3-DPG) e a associação com a malária.

Maria de Lurdes Agostinho Francisco

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM PARASITOLOGIA MÉDICA**

JANEIRO, 2017



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Deficiência eritrocitária em piruvato cinase por suplementação de fluoreto de sódio (NaF), consequente aumento de difosfoglicerato (2,3-DPG) e a associação com a malária.

Maria de Lurdes Agostinho Francisco

Licenciada em Análises Clínicas e Saúde Pública pela Universidade Metodista de Angola.

Dissertação apresentada para o cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Parasitologia Médica.

Orientadora: Investigadora Doutora Ana Paula Arez

Global Health and Tropical Medicine (GHTM)

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Coorientador: Mestre Tiago Vaz, Mestre em Engenharia Biomédica, Doutorando no 3º ciclo de estudos em Genética Humana e Doenças Infecciosas, IHMT.

JANEIRO, 2017

Conteúdo

Agradecimentos	iii
Lista de abreviaturas	vi
Lista de figuras	viii
Lista de tabelas	viii
Resumo	ix
Abstract.....	x
Introdução	1
1. Malária.....	1
1.1 História da doença	2
1.2 Distribuição geográfica	3
1.3 Ciclo de vida.....	4
1.3.1 Morfologia do parasita	6
1.4 Diversidade da espécie	8
1.5 Epidemiologia.....	9
1.6 Manifestação clínica.....	10
1.7 Fatores do hospedeiro humano na suscetibilidade/resistência à malária.....	10
17.1 Variantes genéticas	11
1.8 Diagnóstico.....	19
1.8.1 Diagnóstico laboratorial	19
1.9 Fármacos.....	20
II. Justificação e Objetivos	22
II.1 Objetivos	23
III. Materiais e Métodos	24
III.1 Material.....	24
III.1.1 Clones	24
III.1.2 Dadores.....	24
III.2 Métodos	24
III.2.1 Cultura de <i>P. falciparum in vitro</i>	24
IV. Resultados e DISCUSSÃO	32
IV.1 Ensaio IC50 com adição de Fluoreto de sódio (NaF)	32

IV.2 Ensaio invasão/ maturação com adição Fluoreto de sódio (NaF)	34
VI. Considerações finais.....	38
VII. Referências.....	39

AGRADECIMENTOS

Eu sei em quem pus toda minha confiança!

A minha alma glorifica o senhor e meu espírito se alegra em Deus meu salvador.

Aos meus pais (em memória), por terem aceito colaborar no plano de Deus, quanto a minha existência neste mundo.

À Orientadora Investigadora Doutora Ana Paula Arez, por me ter aceite e contribuído com opiniões, pela orientação, disponibilidade e correções, assim como os conhecimentos transmitidos; por nunca ter desistido de tornar esta tese possível, mesmo com todas adversidades que surgiram.

Ao Coorientador Mestre Tiago Vaz, por tamanha paciência, ensinamentos, conselhos, disponibilidade, generosidade, compreensão ...

A toda Direção do IHMT e a docência do XII Mestrado em Parasitologia Médica, pela competência e excelência com que conduziram esta formação.

Ao grupo de Malária da Unidade de Parasitologia Médica do IHMT (Prof. Doutor Henriques Silveira, Inv^a. Doutora Fátima Nogueira, Mestre Ana Catarina Alves).

Um especial agradecimento ao Padre Antero dos Reis, por nunca ter desistido de apostar em mim.

Ao Doutor Aires Africano, por ter depositado sua credibilidade e confiança em mim.

Aos meus colegas de laboratório, por estarem sempre prontos a ajudar com todo o apoio, paciência, respeito, ensinamento e companheirismo.

Aos meus colegas de mestrado, pelos momentos bons e maus partilhados em conjunto, de um modo especial a Geraldina e a Mónica que para mim foram e serão sempre anjos enviados por Deus.

A toda minha família que tanto amo e amigos do coração, que tudo fizeram para que este momento se concretizasse, e por tudo que suportaram com a minha ausência.

Um especial agradecimento aos meus filhos, que são os meus presentes dados por Deus, mesmo sem querer, consentiam as minhas ausências.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para que esse trabalho se concretizasse, muito obrigado pela vossa companhia nessa jornada.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ass - Infecção malárica assintomática

ADP - Adenosina difosfato

ACTs - Tratamento com derivados de artimisinina

ATP - Adenosina trifosfato

CSP - Proteína circunsporozoítica

C_i - Concentração inicial

C_f - Concentração final

2,3-DPG - 2,3-difosfoglicerato

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control

ECG - Eletrocardiograma

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ou ensaio de imunoabsorção enzimática

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid

G - Infecção malárica grave

G6P - Glucose-6-fosfato

G6PD - Glucose-6-fosfato desidrogenase

GSH - Glutathione

Hb - Hemoglobina

HbC - Hemoglobinas C

HbE - Hemoglobinas E

HbS - Hemoglobinas S

HbSS - Hemoglobinas SS

HbAS - Hemoglobinas AS

Hp - Hemácias parasitadas

Hs - Hemácias sãs

HT - Hemácias totais

Hto - Hematócrito

IFI - Imunofluorescência indireta

IC₅₀ - 50% da concentração inibitória

K- Controlo
K⁺- Potássio
Mg²⁺ - Magnésio
mM- Milimolar
µm- Micromolar
NG- Infecção malárica não – grave
NADPH- Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NaCl- Cloreto de sódio
NaF- Fluoreto de sódio
nM - Nanomolar
Hb-O₂ - Oxihemoglobina
PBS - Phosphate buffered saline
PCR - Reação de polimerase em cadeia
PEP - Fosfoenolpiruvato
Pi - Parasitémia inicial
Pf - Parasitémia final
PK- Piruvato cinase
pklr - Gene que codifica as enzimas PKL e PKR
PPP- Via das pentoses-fosfato
PKL – Piruvato cinase expressa no fígado
PKR – Piruvato cinase expressa nos eritrócitos
PKD- Deficiência em piruvato cinase
TDR- Teste de diagnóstico rápido
RPMI- Roswell Park Memorial Institute medium – meio de cultura de células
spp.- várias espécies
RBC - Red Blood Cells
Rpm- Número de rotações por minuto
Vi- Volume inicial
Vf- Volume final
WHO- World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição Geográfica da Malária, 2015 -----	4
Figura 2- Ciclo de vida do Plasmodium sp. -----	5
Figura 3- Morfologia do parasita, desenho esquemático das principais estruturas do parasita -----	8
Figura 4- Metabolismo da glicose no eritrócito, Glicólise -----	13
Fig.5- Mecanismo proposto de proteção associada a PKD contra infecção parasitária---	18
Figura 6- Imagens de culturas de <i>P. falciparum</i> , tirada numa câmara de fluxo laminar -	25
Figura 7- Imagens dos eritrócitos infetados por <i>P.falcíparum</i> -----	27
Figura 8- Placa utilizada para o ensaio de suscetibilidade com 96 poços -----	28
Figura 9- Espectro de excitação e emissão de fluorescência do corante SYBR® Green ligado ao DNA -----	29
Figura 10- Placas utilizadas no ensaio de invasão e maturação com 6 poços -----	30
Figura 11- Influência do NaF sobre o clone sensível a cloroquina-3D7 após 48 horas de incubação com a parasitemia de esquizontes e anéis.-----	32
Figura 12- Influência do NaF sobre o clone resistente a cloroquina-Dd2 após 48 horas de incubação com a parasitemia de esquizontes e anéis-----	33
Figura 13- Média da parasitemia total, em hemácias sem adição de composto e com adição de composto (NaF).-----	34
Figura 14- Média da parasitemia de anéis e esquizontes no sangue controlo e na cultura suplementada com NaF.-----	35
Figura 15- Rácio de invasão dos parasitas nas culturas controlo e suplementada com NaF.- -----	36
Figura 16- Rácio de maturação dos parasitas nas culturas controlo e suplementada com NaF. -----	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores de IC50 obtidos com clone 3D7-----	33
Tabela 2- Valores de IC50 obtidos com clone Dd2-----	33

RESUMO

A malária é uma doença provocada por um parasita protozoário do género *Plasmodium*, transmitido por mosquitos fêmea do género *Anopheles* que pode provocar diversas complicações, e em inúmeros casos levar mesmo a morte. Constata-se maior prevalência nos continentes Africano, Asiático e Sul-americano, chegando mesmo a atingir cerca de 216 milhões de casos e 655 mil mortes a nível mundial. Entre as cinco espécies de *Plasmodium* que causam malária humana, a mais mortal é a espécie *Plasmodium falciparum*.

O impacto desta doença e a elevada mortalidade, fazem com que seja considerada uma das maiores forças seletivas da evolução da história recente da humanidade. Por este motivo, as variantes de determinados genes conferem ao seu portador uma resistência à malária ou sintomas atenuados; e isto tem sido conservado ao longo dos tempos.

Foram encontrados vários genes que aparentam desempenhar esta função, dos quais encontram-se alguns que regulam a produção de enzimas como no caso da PKLR (*pyruvate kinase liver red cells*).

O presente trabalho tem como objetivo estudar o efeito da deficiência em piruvato cinase (PK) no desenvolvimento parasitário, medindo a invasão e maturação do parasita em culturas *in vitro* de *P. falciparum* em eritrócitos normais e com adição de Fluoreto de Sódio (NaF) e 2,3-Difosfoglicerato (2,3-DPG), assim como a suscetibilidade dos parasitas na presença destes compostos.

O parasita durante o seu desenvolvimento intraeritrocitário depende única e exclusivamente dos nutrientes fornecidos pelos eritrócitos, fazendo deste a sua principal fonte de nutrientes e a realização do metabolismo. Segundo os resultados obtidos neste trabalho, pela adição do NaF e conseqüente diminuição de ATP, necessária para o seu desenvolvimento, verificou-se redução principalmente na invasão.

Os ensaios de suscetibilidade permitiram determinar a concentração necessária do composto para inibir 50% dos parasitas (IC50), sendo que para a estirpe sensível (3D7) foi necessária uma concentração de pelo menos 1mM e para a estirpe resistente (Dd2) 2mM.

Em relação ao ensaio de invasão e maturação verificamos novamente que o NaF tem influência sobre o desenvolvimento parasitário, visto que as hemácias parasitadas sem adição do composto (controlo), tiveram um pico de parasitémia maior quando comparadas com as hemácias suplementadas com o NaF. Este aumento na parasitémia do controlo reflete a invasão das hemácias por novos parasitas, a diminuição demonstra o período de maturação, e como há maior consumo de hemácias sem reposição de novas, os parasitas morrem no ciclo seguinte.

ABSTRACT

Malaria is caused by a protozoan parasite of the genus *Plasmodium*, transmitted by female mosquitoes of the genus *Anopheles*, which may be severe and even lethal. Malaria is more prevalent in the African, Asian and South-American continents and, each year is responsible by around 216 million cases and 655 thousand deaths worldwide. Among the five *Plasmodium* species that may infect humans, *Plasmodium falciparum* is the most lethal.

The high impact and mortality of malaria have made of malaria one of the strongest selective forces acting on the recent evolution of Man selecting genetic variants that confer resistance against the disease, such as those that code enzymes as PKLR (pyruvate kinase liver red cells).

The present work aims at studying the effect of the pyruvate kinase deficiency on the parasite development in *in vitro* cultures of *P. falciparum*, assessing the invasion and maturation of parasite in normal erythrocytes and in cultures supplemented with sodium fluoride (NaF) and 2,3-Diphosphoglycerate (2,3-DPG) as well as its susceptibility to both compounds.

During its intraerythrocytic development, parasite depends almost exclusively on the host cell to obtain nutrients and energy for its metabolism. In this work, the addition of NaF and subsequent ATP decrease, seemed to mainly affect the parasite invasion.

The susceptibility assays allowed to determine the concentration needed to inhibit the growth of parasite by 50%, being 1mM for the chloroquine-sensitive 3D7 clone and 2mM for the chloroquine-resistant Dd2 clone.

Regarding invasion and maturation assays, results also showed that NaF affected parasite development as parasitaemias were highest in control red blood cells (RBC) than in RBC supplement with NaF. This increase in parasitaemia of control reflects the RBC invasion while the decrease reflects the parasite maturation, as there is more parasitized RBC without addition of new ones, which leads to the parasite death in the next cycle.

INTRODUÇÃO

1. MALÁRIA

A malária é causada pela infecção dos glóbulos vermelhos, por parasitas protozoários do género *Plasmodium*, família Plasmodiidae, ordem Haemosporida, classe Hematozoa, filo Apicomplexa, os quais são transmitidos aos humanos por mosquitos fêmea do género *Anopheles* infetadas durante a sua refeição sanguínea (Ayala *et al.*, 1998; Carter, 2002).

Esta doença caracteriza-se por causar febres intermitentes que, dependendo das espécies de plasmódio (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*) designado também por malária terçã, ocorrem a cada 3 dias e a espécie (*Plasmodium malariae*) com a designação de malária quartã, ocorre a cada 4 dias dores de cabeça, dores no corpo, anemia, icterícia e inchaço do fígado e baço. No caso da malária cerebral, o parasita pode também comprometer progressivamente o sistema nervoso central. O tratamento da malária é complexo, longo e muitas vezes ineficaz devido à reinfeção do paciente, fenómeno muito comum em regiões endémicas. Isto acontece porque muitas das estratégias conhecidas eficazes para o combate a esta doença são pouco acessíveis nos países endémicos, como a educação da população de risco, a quimioterapia eficiente, o controlo do vetor por meio de inseticidas e o uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas para evitar o contato mosquito-hospedeiro (Soares, 1998).

A malária é classificada como endémica, numa área onde ocorra uma incidência constante de casos ao longo de vários anos consecutivos, e epidémica, quando ocorre agravamento súbito, ocasional ou periódico da incidência de casos. O indicador da endemicidade da malária numa região pode ser definido com base no índice esplénico, estimado pela proporção de crianças dos 2 aos 9 anos com baço hipertrofiado ou de acordo com a taxa parasitária (proporção de infeções existentes numa população numa determinada altura) (Mendis, *et al.* 2009). Sendo assim, a malária manifesta-se como:

Infeção malárica assintomática (Ass): Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO), é classificada como assintomática uma infeção malárica que apresente parasitémia confirmada laboratorialmente para qualquer espécie de *Plasmodium*, com ausência de febre e de outros sintomas indicadores de malária (WHO, 2007).

Apesar de ser elevada a quantidade de estudos sobre a gravidade clínica da doença, as infeções assintomáticas de malária não estão ainda bem compreendidas. O maior obstáculo no estudo destas infeções é a carência de um critério de diagnóstico padronizado.

Infeção malárica não – grave (NG): Considera-se uma infeção não-grave quando o doente apresenta parasitémia para qualquer espécie de *Plasmodium*, febre (temperatura axilar $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$) e um nível de hemoglobina de $\text{Hb} > 5 \text{ g/dL}$.

Infeção malárica grave (G): Considera-se uma infeção grave quando o doente apresenta parasitemia para qualquer espécie de *Plasmodium*, febre (temperatura axilar $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$), nível de hemoglobina de $\text{Hb} \leq 5 \text{ g/dL}$ e/ou outros sintomas, (Currie, 2000). Como manifestações graves da doença, no caso de *P. falciparum* destacam-se os quadros de malária cerebral, prostração ou convulsões, coma, anemia severa da malária, disfunção multiorgânica (hepático-renal), acidose metabólica e síndrome de stress respiratório do adulto (Farrar *et al.*, 2013).

Malária cerebral- Apresenta além dos sinais acima referidos, edema, convulsões, delírio, coma, anemia hemolítica, edema pulmonar agudo, insuficiência renal aguda, hepatopatia aguda, distúrbios do equilíbrio hidroeletrólítico, hipoglicemia, disritmias cardíacas e alterações gastrointestinais, como diarreia e hemorragia (Penna, *et al.*, 1998).

Anemia grave- Trata-se de uma manifestação frequente e precoce da malária, a qual ocorre devido a múltiplos fatores, incluindo destruição ou sequestro dos eritrócitos, alteração da eritropoese. A anemia da malária grave é definida como hematócrito \leq a 15% ou concentração de hemoglobina \leq a 5g/dl. Contudo, em áreas com condições de transmissão diferentes das africanas, essa definição é pouco apropriada, sendo a anemia da malária definida como a redução da hemoglobina ou do hematócrito abaixo dos níveis esperados por idade, sexo e condição na presença de *Plasmodium* spp. (Neves, *et al.*, 2005).

1.1 HISTÓRIA DA DOENÇA

A malária é uma doença milenar que tem colocado muitos desafios à comunidade científica não só no que diz respeito à erradicação mas também no que concerne à implementação de programas que visam a luta sustentável, principalmente em países em vias de desenvolvimento. Atinge principalmente as crianças de idade inferior a cinco anos, gestantes e indivíduos não imunes. É uma parasitose que afeta as regiões tropicais e subtropicais, sobretudo na África Subsariana onde as condições sanitárias e o clima favorecem o desenvolvimento do vetor e a disseminação da doença. (Ferrar, *et al.*, 2013).

A malária foi primeiramente citada na era pré-Cristã, por Hipócrates. Foi ele quem descreveu as suas características de ocorrência sazonal e de febre com padrão paroxístico e intermitente. Entretanto, foi somente no início do século XIX que o termo malária teve origem. Escritores italianos defendiam a tese de que a doença era causada por vapores prejudiciais exalados dos pântanos tiberianos, designando-a "mal aria", cujo sentido literal é "mau ar". Apenas em 1880, um médico francês, Charles Louis Alphonse Laveran, conseguiu observar microrganismos vivos em movimento ao examinar, a fresco, o sangue de um paciente com malária. A descoberta de que a malária era uma hemoparasitose foi posteriormente confirmada por Gerhardt, em 1884, que conseguiu reproduzir a doença a partir de transfusão de sangue infetado. Em 1885, Golgi *et al.* descreveram o ciclo

assexuado do parasita (por isso denominado ciclo de Golgi) e, em 1891, a morfologia dos parasitas sanguíneos foi demonstrada através do método de esfregaços corados. A transmissão, no entanto, só foi conhecida numa sucessão de descobertas. Em 1894, Manson, ao estudar a transmissão de *Wuchereria bancrofti* por mosquitos, aventou a hipótese de que os mesmos poderiam ser os transmissores da malária. Ronald Ross, em 1897, trabalhando na Índia, descobriu oocistos no estômago de mosquitos que se haviam alimentado sobre um paciente com malária. Esses estudos permitiram que os pesquisadores italianos Grassi, Bastianelli e Bignami, em 1898 e 1899, tivessem a alegria de descobrir o desenvolvimento completo das três espécies de plasmódio humano em anofelinos (Neves, *et al.*, 2005).

Em 1902, Ronald Ross foi premiado com o Prémio Nobel, por ter sido o primeiro investigador a reconhecer o papel do mosquito na transmissão da malária ao identificar o ciclo esporogónico no mosquito (Núncio, *et al.*, 2014).

Apesar de atualmente a malária ser essencialmente endémica na América do Sul, África e Ásia, também já foi endémica no sul da Europa e da América do Norte, só tendo sido eliminada após o final da 2ª Guerra Mundial (Hedrick, 2011). Na Europa, segundo o relatório anual de vigilância epidemiológica do *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC, 2013) nos estados membros da União Europeia a transmissão da malária é inexistente desde 1975, embora o vetor permaneça presente, tendo sido reportados em 2010 mais de 6700 casos importados pelos 26 estados membros da União Europeia. Portugal, segundo o relatório deste mesmo ano do *ECDC Annual epidemiological report*, reportou 246 casos importados entre 2007 e 2011 (Moody, 2002).

1.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A malária ocorre em países tropicais e subtropicais (figura 1). Os continentes Americano, Africano e Asiático são os mais afetados com a malária a nível mundial, sendo o continente Africano com a espécie mais grave do parasita. (WHO, 2011). Na África, predomina a espécie *P. falciparum*, enquanto que *P. vivax* é mais comum na parte central da América do Sul, África do Norte, Oriente Médio e subcontinente indiano. A prevalência de ambas espécies é aproximadamente igual em outras partes da América do Sul, Sudeste da Ásia e da Oceânia. *P. vivax* é raro na África Ocidental (mas é comum no Corno de África), enquanto que *P. ovale* é comum apenas na África Ocidental. *Plasmodium malariae* é encontrada na maioria das áreas, mas é relativamente incomum fora da África (White, 2011; Ferrar, *et al.*, 2013).

O continente Africano além de apresentar um clima favorável ao desenvolvimento do vetor e do parasita, apresenta também outros fatores preponderantes que acentuam a incidência desta patologia, assim como a distribuição geográfica das várias espécies de *Plasmodium spp.* De entre os casos de malária ocorridos em 2015 a nível mundial, 88%

foi em Africana, 10% no Sudoeste Asiático e 2% no Mediterrâneo Oriental. A transmissão da doença nas áreas endémicas, encontra-se associada a variáveis humanas, como a idade, o género e as condições económicas. Estima-se que 90% de todas as mortes por malária ocorre em crianças com idade inferior a 5 anos (WHO, 2015).

A malária já foi endémica na Europa, mas segundo a OMS é a primeira região no mundo a interromper a transmissão da malária, fazendo cair o número de casos autóctones de 90 mil para zero em 20 anos, atingindo assim a meta de erradicação em 2015 (<http://www.euro.who.int/en/media-centre/sections/press-releases/2016/04/from-over-90-000-cases-to-zero-in-two-decades-the-european-region-is-malaria-free>, último acesso em 11-01-2017).

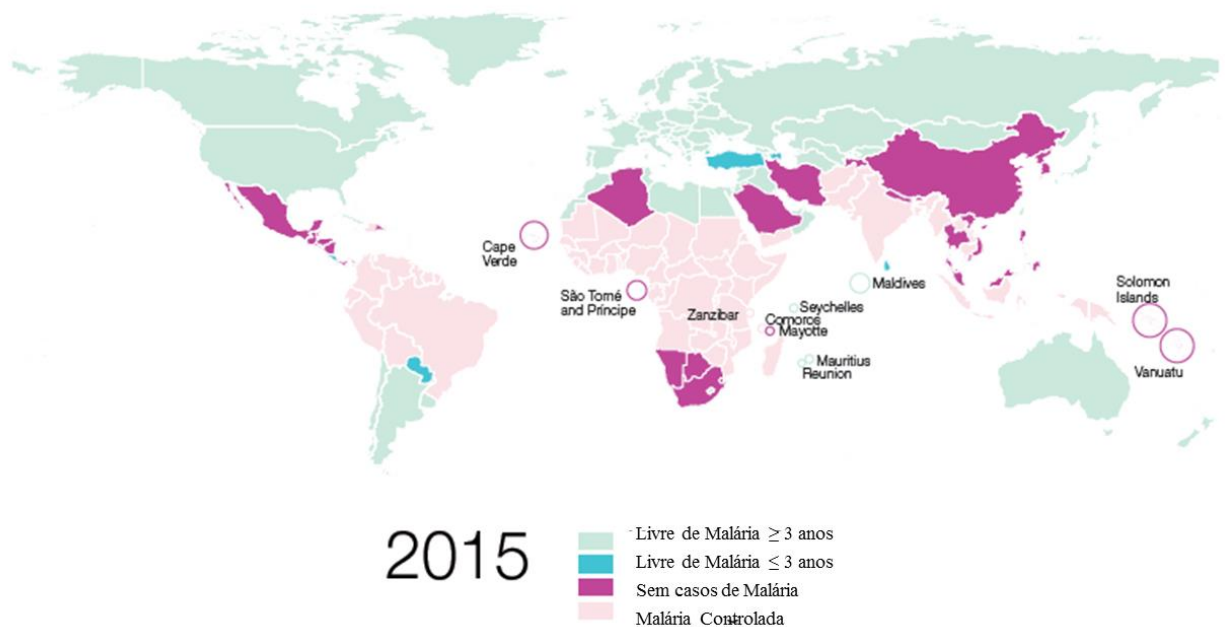


Fig.1 - Distribuição Geográfica da Malária (adaptado de Global Health Sciences, Global Health Group, 2015).

Até o ano 2000 havia 106 países e territórios com transmissão ativa de malária; mas no final de 2015, esta continua a ocorrer somente em 95 países (WHO, 2015).

1.3 CICLO DE VIDA

O ciclo de vida deste parasita é heteroxeno, sendo assim necessário dois hospedeiros para o completar (figura 2). Um deles o vetor, mosquito fêmea do género *Anopheles*, é o hospedeiro definitivo onde se dá a reprodução sexuada (esporogonia). O outro, o homem ou outro vertebrado, é o hospedeiro intermediário, onde ocorre a reprodução assexuada (esquizogonia).

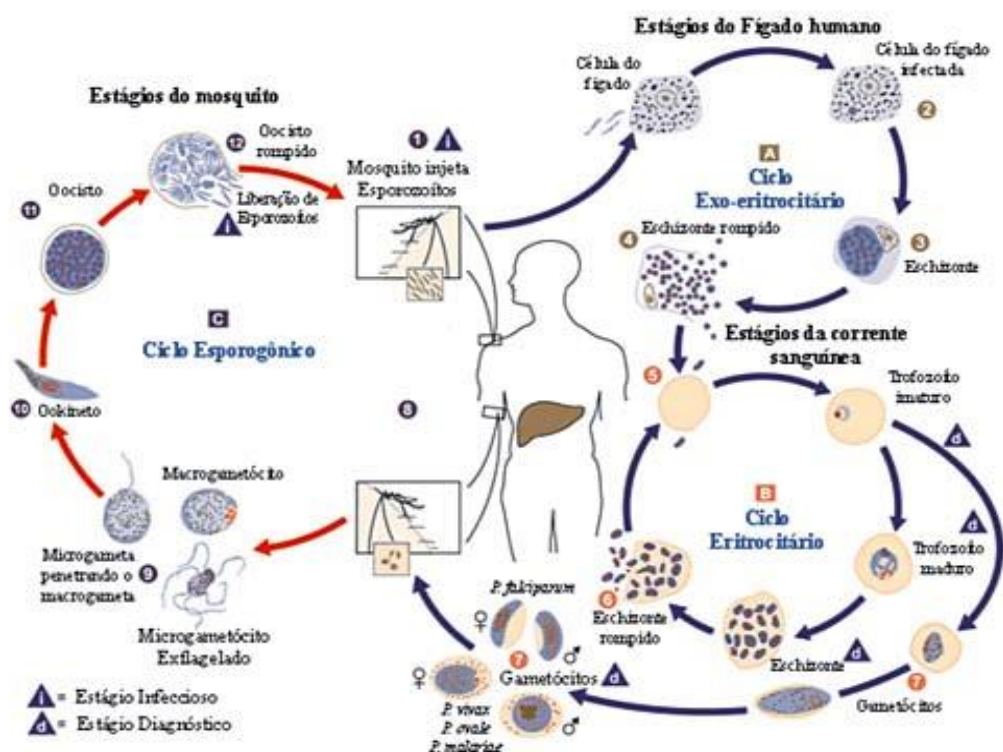


Fig. 2 - Ciclo de vida do *Plasmodium* [adaptado do Centers for Disease Control and Prevention (CDC)].

Ao alimentar-se de sangue, os esporozoítos infetantes são inoculados no homem pelo inseto vetor o que dá origem à infecção. Na maioria dos casos, poucos esporozoítos são injetados (aproximadamente 8-15), mas este número pode ascender a mais de 100. Estes permanecem na circulação por pouco tempo, invadem os hepatócitos, diferenciam-se em trofozoítos préeritrocitários que se multiplicam por reprodução assexuada do tipo esquizogonia, dando origem aos esquizontes teciduais e posteriormente a milhares de merozoítos que invadirão os eritrócitos (esta fase é assintomática para o hospedeiro humano) (Núncio, *et al.*, 2014). Na circulação sanguínea, os merozoítos penetram nos eritrócitos através de interações específicas entre proteínas presentes na superfície dos parasitas e recetores presentes na superfície destas células, dando início à fase eritrocitária do ciclo, que é responsável pela sintomatologia clínica da doença (Coatney, *et al.*, 1971). Após a invasão destes transformam-se em trofozoítos jovens e posteriormente em trofozoítos maduros; no interior do eritrócito o parasita consome 75% da hemoglobina, presente numa concentração de 340 mg/ml, servindo como um nutriente rico e fonte de metabolismo para o parasita (Morrison & Jeskey, 1948; Loria, *et al.*, 1999). O desenvolvimento intraeritrocitário do parasita dá-se por esquizogonia, com consequente

formação de esquizontes dando origem aos merozoítos que invadirão novos eritrócitos. Depois de algumas gerações de merozoítos sanguíneos, ocorre a diferenciação em estágios sexuais (os gametócitos). Somente os gametócitos serão capazes de evoluir no inseto, após a sua refeição sanguínea num indivíduo infetado, dando origem ao ciclo sexual ou esporogónico. O gametócito masculino, por um processo denominado exflagelação, dá origem a oito microgâmetas e o gametócito feminino transforma-se em macrogâmeta. Cada microgâmeta fecundará um macrogâmeta, formando o ovo ou zigoto que é móvel (oocineto) e atinge a parede do intestino médio, se encista na camada epitelial basal, passando a ser chamado oocisto. Inicia-se então o processo de divisão esporogónica e, após a ruptura da parede do oocisto, os esporozoítos formados são libertados e atingirão as células das glândulas salivares do mosquito (Penna, *et al.*, 1998; Cowman, 2012; Farrar, *et al.*, 2014).

1.3.1 Morfologia do parasita

Os plasmódios variam consoante a espécie, em tamanho, forma e aparência, de acordo com o seu estágio de desenvolvimento (figura 3) e com suas características específicas. As formas evolutivas extracelulares, capazes de invadir as células hospedeiras (esporozoítos, merozoítos e oocineto), possuem um complexo apical formado por organelos conhecidos como róptrias e micronemas, diretamente envolvidas no processo de interiorização celular. O parasita apresenta nestas formas uma membrana externa simples e outra interna dupla observada pela microscopia eletrónica que é fenestrada e incompleta, principalmente na extremidade anterior, onde está localizado o complexo apical. Este está ausente nas formas intracelulares (trofozoítos, esquizontes e gametócitos).

Esporozoíto- é alongado, medindo cerca de 11µm de comprimento por 1 µm de largura e apresenta núcleo central único. A sua estrutura interna é semelhante nas diferentes espécies de plasmódio. A membrana é formada por duas camadas sendo a mais externa formada principalmente pela proteína circunsporozoítica, (CS), a qual participa em diversas interações celulares durante o ciclo de vida do parasita.

Forma exoeritrocitária- após a penetração do esporozoíto ao atingir os hepatócitos, ocorre a perda dos organelos do complexo apical e o parasita toma a forma arredondada. Esta forma é chamada trofozoíto e após sucessivas divisões celulares dará origem ao esquizonte composto por uma massa citoplasmática e posteriormente núcleos filhos (merozoítos). O número de

merozoítos formados varia entre as espécies de plasmódios humanos mas é em geral acima de 100.000 parasitas.

Merozoítos- independente da sua origem, préeritrocitária ou sanguínea, são células similares e capazes de invadir somente hemácias. Os merozoítos são menores e mais arredondados do que os esporozoítos, com 1 a 5 μm de comprimento por 2 μm de diâmetro com uma membrana externa composta por três camadas. O processo de invasão de merozoítos envolve uma sequência complexa de eventos que inclui a fixação a superfície do eritrócito, reorientação, formação apertada-junção e, finalmente, a internalização (Sibley, 2004; Núncio, *et al.*, 2014).

Formas eritrocitárias- compreendem os estágios de trofozoítos jovens, trofozoítos maduros, esquizontes e gametócitos.

Microgâmeta- (gâmeta masculino) é uma célula flagelada originária do processo de exflagelação no estômago do mosquito, apresenta de 20 a 25 μm de comprimento, sendo constituída de uma membrana que envolve o núcleo e um único flagelo.

Macrogâmeta- (gâmeta feminino), célula que apresenta uma estrutura proeminente na superfície, por onde se dá a penetração do microgâmeta (fecundação).

Oocineto- tem a forma alongada de aspeto vermiforme, móvel, com o comprimento entre 10-20 μm de comprimento, contendo núcleo volumoso e excêntrico.

Oocisto- estrutura esférica com 40-80 μm . Apresenta grânulos pigmentados no seu interior, os quais têm características de cor e distribuição que varia entre as espécies. (Neves, *et al.*, 2005).

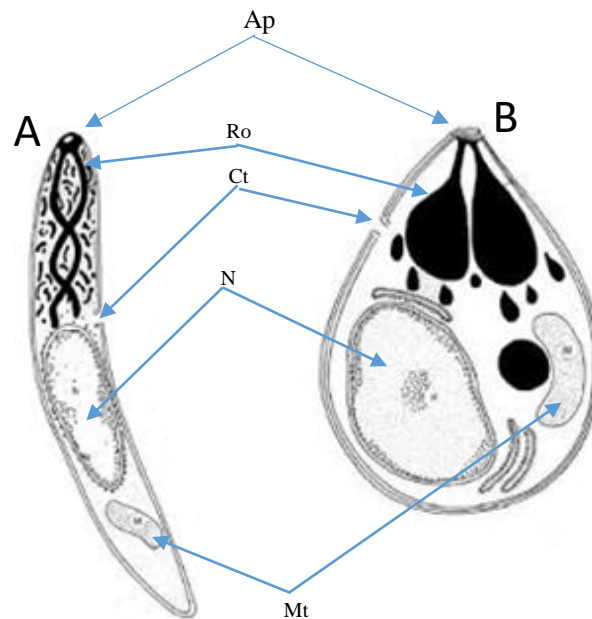


Fig. 3 - Morfologia do parasita (esporozoítio A e merozoítio B), desenho esquemático das principais estruturas Ro: roptrias; Ap: anel polar, Ct: citósoma; N: núcleo; Mt: mitocôndria; adaptado do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC)

1.4 DIVERSIDADE DA ESPÉCIE

A malária nos humanos é causada por cinco espécies de protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida pelos mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*. De entre as aproximadamente 100 espécies desses protozoários apenas cinco espécies são responsáveis por infectar seres humanos: *P. falciparum* (Welch, 1987); *P. ovale* (Stephens, 1922); *P. vivax* (Grassi & Feletti, 1890); *P. malariae* (Laveran, 1881) e *Plasmodium knowlesi* (Sinton & Mulligan, 1932) sendo a espécie *P. falciparum* a mais perigosa por causar formas graves de malária, que na maioria dos casos levam à morte (Soares, 1998).

Deste modo, tem-se: a malária por *P. falciparum*, também conhecida como malária grave ou “terçã” maligna que ocorre principalmente na África subsaariana, mas também está presente em todas as regiões tropicais do mundo; esta tem um período de incubação de 1 a 3 semanas (média de 12 dias).

A malária por *P. vivax*, chamada de malária benigna, muito comum na América do Sul e que também é a forma de malária mais largamente distribuída e observada em regiões temperadas do mundo; também conhecida como “terçã” benigna, pois é caracterizada pela intermitência dos ataques paroxísticos da doença provenientes da infecção eritrocitária que ocorrem a cada 3 dias, é a forma de malária mais frequente no Brasil, tendo um período de incubação de 1 a 4 semanas (média de 2 semanas).

A malária por *P. malarie* é a forma "quartã" da doença, tem a mesma distribuição geográfica de *P. falciparum* embora seja muito menos prevalente e ocorra em zonas mais restritas; apresenta uma intermitência a cada 4 dias e um período de incubação de 2 a 4 semanas (média de 3 semanas). Além dos sintomas gerais, esta forma da doença pode também causar nefrites.

A malária por *P. ovale* tem um período de incubação de 9 a 18 dias (média de 14 dias) e é basicamente uma forma terçã da doença, que ocorre quase exclusivamente na África.

As espécies *P. vivax* e *P. ovale* são caracterizadas por apresentarem relapsos ou recidivas, que ocorrem quando reaparecem sintomas mesmo após os parasitas terem sido eliminados do sangue, devido à persistência de populações de hipnozoítos dormentes nas células do fígado (Warrel & Gilles 2002; WHO, 2010).

A espécie *P. knowlesi* infeta normalmente macacos (*Macaca fascicularis*) e é encontrada principalmente em países do Sudeste Asiático, tem um período incubação de aproximadamente 11 dias (Ng *et al.*, 2008; Vythilingam *et al.*, 2008).

1.5 EPIDEMIOLOGIA

A malária é uma doença que ocorre nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. A sua transmissão nas áreas endêmicas, encontra-se associada a variáveis humanas, como a idade, o género e as condições económicas; a variáveis de lugar, como o local onde a pessoa se encontra; e a variável temporal, em que a maior e menor intensidade das picadas infetantes, encontram-se dependente dos diferentes períodos do ano e do dia (Nelson & Williams, 2007), aumentando ou diminuindo, respetivamente, o risco de transmissão da doença.

Entretanto sua distribuição nessas regiões não é homogénea, podendo ser endémica ou epidémica. As condições ótimas para a transmissão são alta humidade e uma temperatura ambiente entre 20 e 30°C. A epidemiologia da malária é complexa e pode variar consideravelmente mesmo dentro de áreas geográficas relativamente pequenas (Neves, *et al.*, 2005).

O impacto da malária na saúde e no desenvolvimento económico das populações humanas é maior nas regiões tropicais e subtropicais. A WHO estimou no ano 2000, que ocorressem, anualmente, entre 300 e 500 milhões de novos casos clínicos e 2,7 milhões de mortes. A maioria destes casos ocorreram em África (85%), onde 98% dos casos foram causados por *P. falciparum*. De acordo com as últimas estimativas, 198 milhões de casos de malária ocorreram globalmente em 2013 e que a doença levou a 584 000 mortes (intervalo de incerteza de 367 000-755 000), o que representa uma diminuição na incidência de casos de malária e das taxas de mortalidade de 30% e 47% respetivamente desde 2000. Na Região Africana da WHO, estima-se que 90% de todas as mortes por malária ocorre em crianças com idade inferior a 5 anos (WHO, 2014).

Segundo a WHO, em 2015, a Região Africana foi responsável pela maioria dos casos mundiais de malária (88%), seguida pela Região da Ásia do Sudeste (10%) e da Região do Mediterrâneo Oriental (2%) e havia uma estimativa de 438 000 mortes por malária (variação de 236 000-635 000) em todo mundo. A maioria dessas mortes ocorreu na Região Africana (96%), seguida pela Região da Ásia do Sudeste (7%) e da Região do Mediterrâneo oriental (2%) (WHO, 2015).

1.6 MANIFESTAÇÃO CLÍNICA

Apenas o ciclo eritrocitário assexuado é responsável pelas manifestações clínicas e patologia da malária. A passagem do parasita pelo fígado (ciclo exoeritrocitário) não apresenta sintomas. O período de incubação varia de acordo com a espécie e a manifestação sintomática inicial é caracterizada por mau estar, cefaleia, cansaço, mialgia, e geralmente precede a clássica febre da malária. Em muitas outras infecções estas manifestações são comuns não permitindo assim um diagnóstico seguro.

O ataque paroxístico agudo (acesso malárico) coincidente com a rotura das hemácias ao final da esquizogonia, é geralmente acompanhado de calafrios e sudorese. Esta fase dura de 15min a 1h sendo seguida por uma fase febril, com temperatura corporal que pode atingir 41°C ou mais. Após um período de duas a seis horas, ocorre defervescência da febre e o paciente apresenta sudorese profusa e fraqueza intensa. Depois de algumas horas, os sintomas desaparecem e o paciente sente-se melhor. Passada esta fase inicial, a febre assume um carácter intermitente relacionado com o tempo de rutura de uma quantidade suficiente de hemácias contendo esquizontes maduros. Desta forma a periodicidade dos sintomas depende do tempo de duração dos ciclos eritrocitários de cada espécie de plasmódio sendo estes referidos já anteriormente na diversidade das espécies (terça ou quartã) (Neves, *et al.*, 2005).

1.7 FATORES DO HOSPEDEIRO HUMANO NA SUSCETIBILIDADE/RESISTÊNCIA À MALÁRIA

Os fatores que determinam o desenvolvimento da infeção e da doença são muito importantes e devem ser clarificados. Há vários aspetos interligados como: a taxa de inoculação do mosquito, a dose de esporozoítos, a imunidade adquirida de infeções anteriores, a virulência do parasita, os polimorfismos genéticos do hospedeiro humano, o estado de nutrição do indivíduo infetado, as condições ambientais e o acesso a um tratamento adequado e/ou eficiente. (Snow, *et al.*, 2005; Rowe, *et al.*, 2006; WHO, 2008).

Sendo a malária uma doença infecciosa, tem sido apontada como a mais forte pressão seletiva na história recente do genoma humano, tendo contribuído para descoberta de fatores genéticos responsáveis pela suscetibilidade / resistência do hospedeiro (Kwiatkowski, 2005). A componente genética da suscetibilidade à malária é complexa e multigénica, estando relatada uma variedade de polimorfismos que influenciam quer a

patogênese, quer as diferentes respostas do hospedeiro à infecção (Min-Oo & Gros, 2005; Tuite & Gros, 2006; Williams, 2006). Desta forma, a imunidade, o estado de saúde, resposta inflamatória, idade, genética e gravidez têm sido os fatores mais inerentes à suscetibilidade / resistência do hospedeiro humano à malária (Weatherall, *et al.*, 2002).

Os fatores genéticos do hospedeiro humano dão uma contribuição significativa para a diversidade observada na malária. Numa mesma população, existe um elevado grau de variação entre os indivíduos relativamente aos fenótipos de suscetibilidade à doença, tendo em conta a carga parasitária, a incidência da doença, a severidade, a magnitude, e tipo de resposta imune aos antígenos da malária (Riley, *et al.*, 1990; Greenwood, 1991; Modiano, *et al.*, 1996).

Foram feitos estudos na Gâmbia com crianças gêmeas (Jepson, *et al.* 1997), no Sri-Lanka onde o fator hereditário determina a incidência da sintomatologia ou não da infecção (Mackinnon, *et al.*, 2000), no Quênia a monitorização da incidência de malária clínica não complicada (Mackinnon, *et al.*, 2005) e em todos estes estudos estimou-se que 25% da variação total era explicada pela soma dos efeitos dos genes do hospedeiro. Destes, a hemoglobina S, fator genético de resistência à malária mais conhecido e responsável pela anemia falciforme, explica somente 2% da variação total; sugerindo assim a existência de muitos genes protetores e que ainda são desconhecidos, resultando cada um em pequenos efeitos na população.

17.1 Variantes genéticas

As hemácias desempenham um papel fundamental como células hospedeiras no ciclo de vida do parasita. Deste modo, os genes que afetam as estruturas e/ou funcionalidade dos eritrócitos são os que apresentam maior número de variantes genéticas descritas e que estão associadas com a proteção contra a malária (Williams, 2006), entre elas, algumas hemoglobinopatias, as talassémias, o sistema ABO, o antígeno Duffy, a deficiência em glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e em piruvato cinase (PK). Novas linhas de investigação da malária têm surgido para se debruçar sobre a estreita relação entre o hospedeiro e o parasita, explicando por um lado a elevada abundância de *P. falciparum* em África e por outro lado a razão de grande parte dos indivíduos parasitados não desenvolverem complicações de malária severa, enquanto outros sucumbem à mesma doença (Wellems, 2009).

Um adulto tem a hemoglobina normal composta por duas cadeias α -globina com 141 aminoácidos e duas de β -globina com 146 aminoácidos; estas podem apresentar desordem e serem divididas em dois grupos: num destes há diminuição na produção das formas estruturais normais das α ou β -globinas, originando as α e β talassémias respetivamente; na outra há a produção de formas estruturais mutantes, surgindo as hemoglobinas S (HbS), C (HbC) ou E (HbE). Apesar de terem sido identificadas centenas destas variantes

estruturais da hemoglobina, somente estas três apresentam frequências polimórficas. As HbS e HbC são muito frequentes especialmente na África Ocidental e a HbE é comum no Sudeste Asiático (Weatherall, 2001; Ohashi, *et al* 2004). É de realçar que as cadeias β -globina são codificadas por um único gene que se localiza no cromossoma 11; e as cadeias α são codificadas por dois genes intimamente ligados ao cromossoma 16. Sendo assim, num indivíduo normal diploide, existem dois *loci* que codificam para a cadeia β , mas quatro que codificam para a cadeia α . As variantes são causadas por alterações na sequência nucleotídica do DNA, tais como: deleções, inserções, e mutações pontuais em um dos genes estruturais da globina (Hocking, 1997).

Dentre as variantes genéticas temos as mais comuns e as menos comuns. Das mais comuns temos a hemoglobina S (Hb S) que é a mais frequente Hb variante no homem; ocorre como resultado de uma mutação pontual no gene da β globina, que leva a troca de um único aminoácido na sexta posição da cadeia polipeptídica (β_6 ácido glutâmico por valina). As hemoglobinas menos comuns são as que ocorrem com pouca frequência como por exemplo as hemoglobinas D,G, J, M, F, H e outras. A maioria destas hemoglobinas ocorre na forma heterozigótica, sendo assintomáticas; mas a presença de uma destas hemoglobinas variante junto de outras hemoglobinopatias e talassémias pode resultar em doença grave. Estas hemoglobinas são geralmente detetadas quando o paciente apresenta hipocromia, microcitose, hipóxia, eritrocitose, ou parâmetros hematológicos alterados que não podem ser explicados por deficiência de ferro e/ou talassemia (Harteveld *et al.*, 2005; Harteveld *et al.*, 2006; Fucharoen *et al.*, 2007; Harteveld *et al.*, 2007a; Harteveld *et al.*, 2007b).

A glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) catalisa a primeira reação da via das pentoses-fosfato na qual se dá a oxidação da glucose-6-fosfato a 6-fosfoglucono- δ -lactona, havendo simultaneamente a produção do NADPH (Ruwende,1998; Mehta, 2000).

A sua deficiência é causada por mutações no gene localizado no cromossoma X (Xq28), sendo os dois gêneros afetados de forma diferente, e está geograficamente relacionada com a malária (África e Mediterrâneo). Em África, a frequência da variante denominada A- atinge 5-25% e esse efeito de seleção é suportado pelas baixas parasitêmias presentes em indivíduos deficientes em relação a indivíduos normais (Enevold *et al.*, 2005; Saunders *et al.*, 2005). Os sintomas dependem do grau de deficiência, e os mais comuns são: icterícia neonatal e anemia hemolítica aguda provocada pela ingestão de fármacos por exemplo, antimálaricos como a primaquina ou certos alimentos como as favas, sendo também denominada favismo. Em todo mundo cerca de 400 milhões de pessoas são afetadas por esta enzimopatia, o que a torna uma das mais comuns (Ruwende, 1998; Kaneco *et at.*, 1998). A codistribuição geográfica referida anteriormente, pode ser justificada pela hipótese da G6PD conferir uma proteção parcial contra a malária. A deficiência em G6PD pode potencializar a fagocitose dos eritrócitos infetados num estado precoce do desenvolvimento parasitário, resultante dos danos oxidativos manifestados

nas células deficientes (Cappellini, *et al.*,2008). Embora o grau de proteção conferida e quais os indivíduos que usufruem dessa proteção sejam alvo de controvérsia (Fortin, 2002; Kwiatkowisk, 2005; Min-Oo, 2005). Há diversos estudos que referem estas controvérsias como: a não observação de evidências de qualquer tipo de proteção contra a infecção por *P. falciparum* em afroamericanos e na população nigeriana (Powell *et al.*, 1965 & Martin *at al.*, 1979). Estando esta desordem enzimática ligada ao cromossoma X (Xq28), num estudo realizado com crianças também nigerianas, concluíram que apenas as do sexo feminino, e não as do sexo masculino (heterozigóticas/hemizigóticos) estavam protegidas contra a malária (Bienzle *et al.*,1972; Ruwende *et al.*,1995). Ainda num outro estudo realizado no Quênia e Gâmbia, verificaram que o alelo G6PD A- conferia proteção contra a malária severa tanto em mulheres heterozigóticas como em homens hemizigóticos (Ruwende *et al.*,1995).

1.7.1.2 Deficiência em piruvato cinase (PK)

Na glicólise, a PK catalisa a conversão de fosfoenolpiruvato (PEP) em piruvato com a síntese de ATP (figura 4).

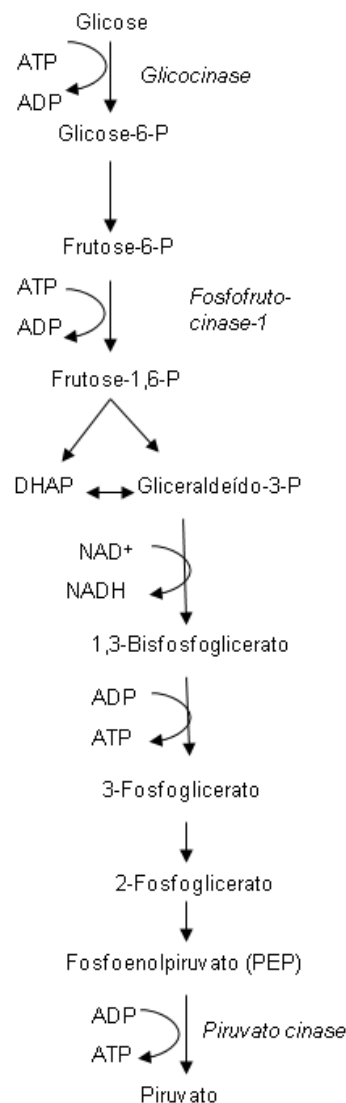


Fig.4- Glicólise (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Glicolise-gliconeogenese.png>)

A deficiência em PK encontra-se distribuída mundialmente, mas estabelecer a prevalência atual da doença tem vindo a ser bastante difícil e confuso, devido às metodologias aplicadas (Carey *et al*, 2000). A doença é transmitida de forma autossômica recessiva. A prevalência da mesma é estimada com base no número de pacientes afetados e tende a ser substancialmente inferior à estimativa efetuada com base na prevalência dos heterozigóticos na população, uma vez que a mortalidade pré-natal e neonatal diminui a frequência da doença na população em geral (Beutler & Gelbart, 2000b). A prevalência da doença estimada através de estudos da frequência do gene na população branca é de 1:20.000 (Beutler & Gelbart, 2000a) e a estimada na Ásia através de medição da atividade da PK é de 0,1% a 3,12% (Feng *et al*, 1993; Abu-Melha *et al*, 2001; Yavarian *et al*, 2008). Em África, a sua prevalência ainda é pouco estudada, no entanto sabe-se que a frequência dos heterozigóticos é cerca de 1% a 2% nas populações da maioria dos estudos, variando entre cerca de 0,2% e 6% (Beutler & Gelbart, 2000a, Yavarian *et al*, 2008; Berghout *et al*, 2012).

Nos mamíferos, existem quatro isoenzimas da PK: PK-M1, PK-M2, PK-L e PK-R, codificadas por dois genes distintos, *pkm* (codifica as PKM) e *pklr* (codifica as PKL e PKR), expressas em tecidos diferentes. A PK-M é expressa no músculo, a PK-L é expressa no fígado, intestino delgado e córtex renal e a PK-R é expressa única e exclusivamente nos eritrócitos (PK-R) (Zanella, *et al* 2007). A deficiência de PK-R afeta seriamente o metabolismo dos eritrócitos, causando a depleção de ATP que acaba por conduzir a hemólise (Bianchi, 2000).

O gene *pklr* localiza-se no cromossoma 1q21 e codifica a PKL e PKR, dependendo da acção de promotores específicos para cada tecido; a região codificante (574 aminoácidos) divide-se em 12 exões, sendo 10 deles partilhados entre as duas isoenzimas e sendo os exões 1 e 2 específicos para o eritrócito e hepatócito, respetivamente. As anomalias no gene *pklr* podem gerar alterações, quer na enzima do eritrócito (PK-R), quer na enzima do fígado (PK-L), no entanto as manifestações clínicas encontram-se apenas associadas à PKR, uma vez que a deficiência hepática é geralmente compensada pela persistência da síntese da enzima nos hepatócitos. Nos eritrócitos isto não acontece, pois as células são anucleadas e não há síntese de nova proteína.

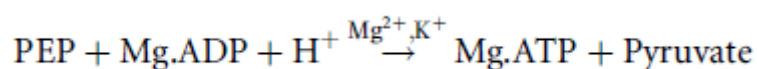
A deficiência em PK (PKD) é a segunda desordem enzimática eritrocitária mais comum, estando associada a 180 mutações no gene *pklr* (Zanella, *et al* 2005; Durand & Coetzer, 2008a). A sua prevalência mundial não foi ainda bem estudada e embora a PKD tenha sido relatada em todas regiões do mundo onde a malária era endémica anteriormente, não se conhecem elevadas frequências da deficiência nessas áreas (Zanella, *et al* 2005; Hay, *et al* 2004); no entanto, um estudo nos Estados Unidos da América, informou que PKD foi 2,4 vezes mais comum entre os afro-americanos do que entre os brancos (Mohrenweiser, 1987).

A deficiência em PK assim como a deficiência em G6PD, consistem em doenças hemolíticas não esferocíticas hereditárias. As manifestações clínicas incluem anemias hemolíticas crônicas de vários graus, variando de pouco severa à forma muito severa que pode ser uma ameaça à vida, e requerem uma terapia contínua de transfusão sanguínea sobretudo no período neonatal. (Zanella, 2000; Wang, *et al*, 2001 Zanella, *et al*, 2007).

A associação da deficiência em PK com a malária foi descrita muito recentemente, onde o primeiro estudo sobre tal associação foi efetuado por Min-Oo e colaboradores em 2003. (Min-Oo, *et al*, 2003). Neste estudo observaram que duas estirpes congénitas recombinantes de ratinho eram resistentes à infecção por *Plasmodium chabaudi*, e identificaram a mutação 269T> A no exão 3 do gene *pklr* como indutora da resistência, com significativa redução na parasitémia e na mortalidade após a infecção. Já em 2008, foram publicados estudos comparando o crescimento de culturas *in vitro* de *P. falciparum* em eritrócitos humanos normais e com a deficiência, em que tal deficiência reduziu a taxa de replicação parasitária nos eritrócitos e promoveu a fagocitose (Ayí, *et al*, 2008; Durand, 2008), tendo-se observado uma diminuição na infecção e nos eritrócitos com deficiência. Poucos anos depois, foram feitos outros estudos por Alves e colaboradores usando como amostra humana o DNA de Cabo Verde (Alves, *et al*, 2010). Esta mesma equipa realizou um novo estudo populacional por meio da genotipagem dos polimorfismos localizados no gene *pklr* e regiões adjacentes em diferentes grupos clínicos de Angola e Moçambique, e indivíduos com deficiência em PK e normais de Portugal. Com os resultados obtidos sustenta-se a hipótese de que a malária exerce pressão nesta região específica do genoma e fortalecem os resultados obtidos anteriormente com cultura *in vitro* e com modelo de ratinho).

Função da PK

A PK tem como função catalisar o último passo da glicólise que corresponde à transfosforilação do PEP em piruvato, através da utilização de ADP o que leva à síntese de ATP, sendo esta reação irreversível a nível fisiológico como mostra a fórmula seguinte:



Para que a reação ocorra é necessária a presença de K^+ e Mg^{2+} (ou Mn^{2+}).

O PEP e o piruvato estão envolvidos em várias vias biossintéticas e energéticas e como tal, a correta regulação da PK é de extrema importância não só para a glicólise, mas também para todo o metabolismo celular. Uma das principais características do PK é a sua resposta alostérica a diversos efetores, pelos quais podem liga-se e modificar a atividade catalítica desta enzima, alternando assim a sua natureza química (Fothergill-Gilmore, 1992; Valentini *et al.*, 2002; Zanella *et al.*, 2005; Zanella *et al.*, 2007; Berghout *et al.*, 2012).

A produção de ATP nos eritrócitos depende exclusivamente da glicólise, como tal a PK desempenha um papel fundamental no metabolismo dos eritrócitos, pois catalisa um dos dois passos de produção de ATP nos glóbulos vermelhos. Como tal a diminuição da atividade da PK tem grandes consequências nas funções celulares e na esperança de vida celular, uma vez que reduz a quantidade de energia produzida podendo levar à depleção do ATP e consequentemente à hemólise. Para além disso a deficiência em PK leva à acumulação dos intermediários glicolíticos próximos ao bloqueio metabólico, em especial o 2,3 difosfoglicerato (2,3-DPG, doravante designado apenas por DPG) que pode aumentar até três vezes e assim dificultar ainda mais o fluxo glicolítico, através da inibição da hexocinase (Valentini *et al.*, 2002; Zanella *et al.*, 2005; Zanella *et al.*, 2007; Berghout *et al.*, 2012). O DPG é um metabolito intermediário importante na via glicolítica dos eritrócitos e é o mais abundante fosfato orgânico-ácido-solúvel nos glóbulos vermelhos. É sintetizado a partir de seus intermediários por uma única via presente nos eritrócitos conhecida como via de Rapoport-Luebering. A produção deste metabolito pela enzima multifuncional bifosfoglicerato mutase (BPGM) depende das quantidades relativas de seu precursor 1,3-DPG e da taxa de hidrólise do DPG. O efeito deste metabolito na afinidade do oxigénio da hemoglobina (Hb) é a sua principal função (Sasakt *et al.*, 1975, Dubey *et al.*, 2003).

A hemoglobina normal (Hb A) no estado desoxigenado liga-se a DPG numa proporção molar de 1: 1, o que resulta numa alteração conformacional e numa afinidade reduzida ao oxigénio e num fornecimento aumentado de oxigénio aos tecidos. No estado oxigenado, a capacidade da Hb para se ligar a DPG está diminuída e a maior parte do DPG está no estado livre. Como resultado, a afinidade da Hb para o oxigênio é aumentada e liga-se mais oxigênio. A afinidade do oxigênio da hemoglobina também é influenciada por ligeiras alterações do pH sanguíneo e a sua função foi descoberta por Reinhold e Ruth Benesch em 1967 (Benesch e Benesch, 1967).

As alterações nos níveis de DPG têm um papel importante na adaptação à hipóxia. Em pacientes anémicos (como aqueles com PKD) a concentração intraeritrocitária de DPG é geralmente elevada, facilitando o fornecimento de oxigênio aos tecidos (Dubey *et al.*, 2003). A concentração normal de DPG nos eritrócitos é de 3,6-5,0 mM (Asakuta *et al.*, 1966).

Para além deste efeito benéfico no fornecimento de oxigénio aos tecidos, o 2,3-DPG, quando em elevada concentração, tem um efeito adverso na estabilidade mecânica da membrana dos eritrócitos. Este efeito é relatado como sendo produzido pelo aumento da mobilidade lateral das proteínas da membrana integral e interrupção das ligações entre a membrana celular e a rede de proteínas do citoesqueleto, em especial o complexo da banda espectral-actina. As concentrações normais do ATP e do 2,3-DPG presentes nos eritrócitos, podem enfraquecer as associações no citoesqueleto, mas não dissociarão o complexo dos locais de ligação à membrana (Sheetz e Casaly, 1980; van Wijk e van Solinge, 2005).

O “desvio” para a via de Rapoport-Luebering acarreta a etapa mediada pela fosfoglicerato-quinase (PGK) geradora de ATP, levando a um custo energético para a célula (Van Wijk e van Solinge, 2005; Cho *et al.*, 2008). Em eritrócitos normais esta perda é compensada pelo ganho respiratório através da capacidade de DPG de libertar oxigénio para os tecidos. Para os parasitas da malária, que dependem largamente da glicólise anaeróbia, tal perda seria grave. Ao contrário dos eritrócitos de mamíferos, *P. falciparum* não parece possuir uma BPGM específica para a produção de DPG (Roth, 1990; Mehta *et al.*, 2005).

Portanto, é razoável supor que o parasita não tem utilidade para o DPG e que um nível reduzido de DPG é observado em RBC parasitados (PRBCs), provavelmente devido à PK do parasita. Em geral, esses resultados também sugerem que o DPG, quando em concentração elevada, pode ser tóxico para o parasita (Dubey *et al.*, 2003; Mehta *et al.*, 2005). Assim, o DPG pode estar envolvido na proteção contra a malária, mediada pela deficiência em PK visto que o aumento da sua concentração interfere com o crescimento parasitário.

Além disso, é conhecido que a glicose pode ser impedida pela adição de um inibidor competitivo da enolase como o fluoreto de sódio (NaF), simulando a PKD.

O NaF é um sal inorgânico derivado do ácido sulfídrico (HF). Trata-se de um pó cristalino branco em condições ambientes, solúvel em água e parcialmente solúvel em etanol; apresenta densidade de 2,56 g/cm³, ponto de fusão de 993°C e ponto de ebulição de 1695°C; a sua massa molar é de 41,99 g mol⁻¹.

O NaF usado para modelar os efeitos fisiológicos da PKD em eritrócitos, inibe a ação catalisadora da enzima glicolítica enolase,

A inibição da enolase pela suplementação de NaF e o aumento da concentração do DPG, impede a transformação de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato, compromete assim a geração de ATP nos eritrócitos (Warburg, 1941; Keitt, 1966) e pode funcionar como modelo de deficiência de PK e mecanismo de proteção contra a malária por *P. falciparum* (Figura 5).

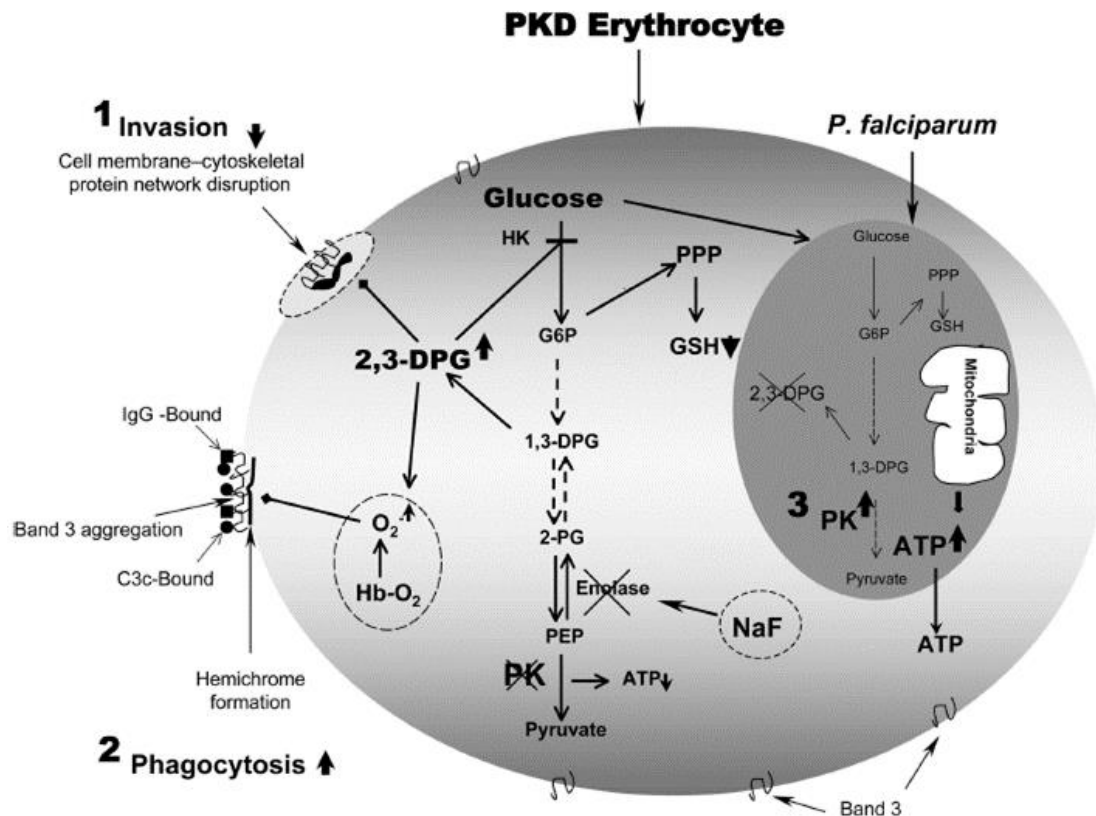


Fig.5- Mecanismo proposto de proteção associada a PKD contra infecção parasitária. A PKD está associada a níveis diminuídos de ATP nos eritrócitos e ao aumento da produção de 2,3-DPG. 1,3-difosfoglicerato (1,3-DPG); 2-fosfoglicerato (2-PG); glucose-6-fosfato (G6P); glutathione (GSH); oxiemoglobina (Hb-O₂); superóxido (O₂); fosfoenolpiruvato (PEP); via pentose fosfato (PPP) (de Ayi *et al.*, 2009).

Variantes da PK

A deficiência de PK nos eritrócitos, identificado no início dos anos 1960 (Valentine *et al.*, 1961), é uma das mais frequentes anomalias enzimáticas da via glicolítica, em conjunto com a classe I de deficiência em glucose-6-fosfato desidrogenase (Glader, 2004).

Uma nova variante de piruvato-cinase, PK Osaka, foi identificada num paciente com anemia hemolítica por deficiência de PK. Por isso houve a necessidade de ser feita a revisão da nomenclatura das várias isoenzimas da PK (Shinohara *et al.*, 1976), para tal, Zanella *et al.*, 1978), usaram um composto genético para 2 mutações diferentes da PK tendo em conta as normas da Comissão Internacional para Padronização em Hematologia (1979).

As principais mutações na PKD distribuem-se segundo regiões e etnias. Nos Estados Unidos da América é mais frequente a mutação 1529 (Arg510Gln) e representa (42%); no norte e centro da Europa corresponde a 41%; já no sul da Europa a mutação mais frequente 1456 T, em que a Espanha representa 32%, Portugal com 35% e a Itália com 29%, sendo que no continente Asiático a mutação mais comum é 1468 T. Outras

mutações frequentes na raça caucasiana são nomeadamente a 721 T e a 994 A, (Jacobasch & Rapoport, 1996; van Wijk & van Solinge, 2005, Zanella *et al.*, 2007).

1.8 DIAGNÓSTICO

A proporção de casos suspeitos de malária tem aumentado constantemente desde 2005 a 2010, a WHO recomendou que todas as pessoas com suspeita de malária em todas as configurações devem ser submetidas a testes diagnóstico de malária, quer por microscopia ou teste de diagnóstico rápido (TDR) (WHO, 2013; 2014; 1015).

De fato, recentes estudos apontam o atraso no diagnóstico como fator de agravamento dos casos de malária, principalmente a causada por *P. falciparum*. (Alves, *et al.*, 2007; Costa, *et al.*, 2010; CDC 2007; Parise, 2009). A possibilidade de malária deve ser cogitada em todo indivíduo que apresente quadro febril a esclarecer e história de deslocamento para regiões endêmicas ou entrada em região de Mata Atlântica no Brasil (Costa, *et al.*, 2010). Além de pensar nas viagens em associação ao quadro de malária por transmissão natural, ou seja, pela picada do mosquito *Anopheles spp.*, deve-se também suspeitar da possibilidade em casos de hemotransfusão, transplante de órgãos ou acidentes com material perfurante ou cortante. Para o diagnóstico da malária é necessário fazer um diagnóstico clínico, laboratorial e diferencial.

O diagnóstico clínico consiste em: Anamnese e Exame Objetivo.

1.8.1 Diagnóstico laboratorial

A sintomatologia inespecífica da malária, que se apresenta como uma síndrome febril, não é clinicamente distinguível de um vasto leque de outras doenças, pelo que é absolutamente necessário a realização do diagnóstico laboratorial.

Nos últimos 100 anos a malária foi diagnosticada, por microscopia ótica, pela observação direta do esfregaço sanguíneo e gota espessa em lâminas coradas por Giemsa, metodologia que continua a ser o “*gold standard*” para o diagnóstico desta parasitose, pois permite a identificação da infecção, a diferenciação da espécie e a determinação da parasitemia. Apesar da microscopia ser considerada o método padrão para o diagnóstico e tratamento da malária, essa técnica exige pessoal treinado e experiente na observação dos exames como:

1) Gota espessa, considerado o exame padrão para diagnóstico da malária por microscopia ótica. A recolha do sangue pode ser por punção venosa ou punção da polpa digital. Permite a contagem da parasitemia, fator preditor de gravidade na infecção por *P. falciparum*, além de permitir o acompanhamento da queda da mesma, após o início da terapêutica;

2) Esfregaço sanguíneo, a qual permite a identificação da morfologia do protozoário, e consequente diferenciação da espécie em causa que é importante para um tratamento adequado. No diagnóstico pela observação de lâminas deve-se ter em conta as características morfológicas das diversas espécies. O *P. falciparum* pela sua propriedade de citoaderência, só permite a deteção de trofozoítos no sangue periférico e ao observar a lâmina só se verificará a presença dessas estruturas.

Existem outras metodologias para o diagnóstico da malária nomeadamente os testes rápidos (imunodeteção da proteína plasmodial), muito utilizados em saídas de campo nas zonas endémicas, mas que apresentam uma baixa sensibilidade. Desde a década de 80, as técnicas de biologia molecular, como a reação de polimerização em cadeia (PCR), têm sido desenvolvidas com sucesso (Moody, 2002) e nos últimos anos, vários estudos a têm utilizado como método de deteção de DNA de *Plasmodium* circulante (Speers, 2003; Andrade, 2010). Contudo, devido ao elevado custo da técnica, a mesma não é utilizada como rotina para diagnóstico de casos, permanecendo restrita a centros de pesquisa (WHO, 2011).

Em contrapartida, o método de captura de antígeno através de anticorpos monoclonais que, além de baixo custo é de fácil realização, auxilia apenas para malária por *P. falciparum*, não fornece resultados quantitativos e ainda pode levar a resultados falsos positivos. De entre os métodos de imunodiagnóstico, temos imunofluorescência indireta (IFI), imunoabsorção enzimática (ELISA), aglutinação, precipitação e radiodiagnóstico; sendo o IFI e o ELISA de fácil execução (Penna, *et al.*, 1998).

Os ensaios de nova geração com base na deteção de plasmódio por lactato desidrogenase (LDH), são ativos para o diagnóstico de ambas as infeções *vivax* e *falciparum*, embora tenham uma sensibilidade baixa com uma densidade abaixo de 200 parasitas (*p. vivax*)/ μ l de sangue. O uso destes testes não elimina a necessidade de confirmar a presença de parasitas por microscopia ótica, sendo esta considerada regra de ouro (WHO, 2010; 2011).

No diagnóstico diferencial incluem-se outras patologias com sinais e sintomas semelhantes como: hepatites virais, leptospirose, dengue, meningite, febre tifoide, encefalite doença de Chagas, gripe, endocardite bacteriana, febre-amarela (Bremner, *et al.*, 2012). Para o seu diagnóstico poderão ser necessários os seguintes exames complementares: hemograma, função hepática e renal, glicémia, ionograma, hemocultura, urocultura, gasometria, raio X torácico, eletrocardiograma (ECG), ecografia abdominal, ecocardiograma (Okie Susan, 2008).

1.9 FÁRMACOS

A malária é uma doença que pode ser evitada e tratada. O objetivo primário do tratamento consiste em assegurar a eliminação rápida e completa do parasita plasmódio a partir do

sangue do paciente, a fim de evitar a progressão da malária não complicada para doença grave ou morte, e para prevenir a infecção crónica que conduz a anemia relacionada com malária.

De uma perspetiva de saúde pública, o objetivo do tratamento é reduzir a transmissão da infecção a outras pessoas, através da redução do reservatório infeccioso, e para prevenir o surgimento e a disseminação da resistência aos medicamentos antimaláricos. A maioria dos países com malária por *P. falciparum* adotaram a terapia combinada com derivados da artemisinina (ACTs) como um tratamento de primeira linha. A WHO recomenda que a malária não complicada por *P. falciparum*, deve ser tratada com um ACT (Price RN, *et al.*, 1996; World Health Organization, 2010). Em áreas onde a cloroquina ainda é eficaz, a malária por *P. vivax* deve ser tratada com este fármaco. Em áreas onde a resistência à cloroquina tem sido documentada, a malária por *P. vivax* deve ser tratada adequadamente para evitar recaídas, e tanto a cloroquina e ACT devem ser combinadas com um curso de 14 dias de primaquina; a utilização deste último requer a consideração do risco de hemólise em pacientes com deficiência em G6PD.

Os ACTs ou terapia combinada com derivados de artemisinina é uma combinação de fármacos (derivados artemisinina combinados com compostos que são eliminados mais lentamente) utilizados no tratamento da malária não complicada por *P. falciparum* ou para completar o tratamento da malária grave após administração de artesunato injetável. Os ACTs são administrados ao longo de 3 dias, e as opções atualmente recomendadas pela WHO são:

- arteméter mais lumefantrina (A + L);
- artesunato mais amodiaquina (AS + AQ);
- artesunato mais mefloquina (AS + MQ);
- artesunato mais sulfadoxina-pirimetamina (AS + SP);
- dihidroartemisinina mais piperaquina.

Em áreas onde há ameaça de resistência à artemisinina e em áreas alvo de eliminação de *P. falciparum*, todos os pacientes confirmados por *P. falciparum* no primeiro dia de seu tratamento com ACT, devem ser tratados com uma dose única de primaquina (0,25 mg / kg). Em 2013, tinha sido adotado como política nacional para o tratamento de primeira linha em 79 de 87 países onde *P. falciparum* é endémico. Além disso, também uma dose única de primaquina estava a ser utilizada para o tratamento gametocida de casos de *P. falciparum* em 39 países de baixa transmissão para reduzir mais ainda a transmissão da malária.

A proporção de crianças na África subsariana com malária por *P. falciparum* a receber ACT tem aumentado significativamente desde 2005, mas manteve-se abaixo de 20% em 2013 (Bousema, *et al* 2006; WHO, 2014; WHO, 2015).

II. JUSTIFICAÇÃO E OBJETIVOS

A malária é, ainda hoje, a doença que mais mortes causa a nível mundial sobretudo em crianças. Várias pesquisas têm sido feitas, no que concerne ao tratamento, com objetivo de alcançar a cura da doença, mas mesmo com os avanços a nível da ciência, ainda não foi possível encontrar a terapêutica eficaz.

O ciclo de vida do parasita *P. falciparum* é muito complexo, assim como as interações entre o parasita e o (s) hospedeiro (s). É importante referir que entre as infeções causadas por este parasita, somente alguns casos evoluem para as formas graves da doença, o que nos leva a pensar que podem existir mecanismos de proteção contra a doença desenvolvidos pelo hospedeiro e que resultaram de uma coadaptação ao longo de milhares de anos.

A malária tem exercido uma pressão seletiva sobre o genoma humano e tem sido um fator preponderante na seleção de uma vasta gama de polimorfismos que conferem maior resistência ao parasita. Desta feita, o ser humano como hospedeiro, acumulou várias adaptações que lhe conferem resistência ao *Plasmodium sp.*, assim como aos efeitos que a infeção causa ao organismo. Estas variantes estão associadas a doenças humanas e dificilmente seriam mantidas nas populações devido ao seu impacto na saúde humana, mas atingem elevadas frequências nas regiões endémicas para a malária devido à proteção que proporcionam contra esta última.

Entre os maiores desafios na luta contra a malária está compreender os determinantes de suscetibilidade desta doença e conhecer os mecanismos envolvidos a fim de serem utilizados como alvos para novos fármacos ou vacinas, numa nova abordagem de terapêutica direcionada ao hospedeiro [*host directed therapies* (HDTs)], ou seja simular os efeitos normalmente exibidos pelos indivíduos com as doenças associadas aos variantes genéticos selecionados (Lelliott *et al*, 2015).

A deficiência em PK, é uma enzimopatia dos eritrócitos que resulta num défice energético e num aumento da concentração de DPG, que leva a cabo uma anemia hemolítica (Dubey *et al.*, 2003).

O composto intermediário da glicólise, DPG, é sintetizado pela bifosfoglicerato mutase (BPGM), num passo que é exclusivo dos eritrócitos (e células placentares), não estando presente em *P. falciparum*. Assim, sendo existente apenas na célula hospedeira e não no parasita, pode ser interessante utilizar esta diferença nas vias metabólicas, contra o parasita. Quer os níveis diminuídos de ATP eritrocitário, quer os níveis aumentados de intermediários metabólicos na via glicolítica, podem tornar o ambiente tóxico ou desfavorável e interferir no crescimento parasitário. Alguns estudos apontam para possíveis danos na rede de proteínas do citoesqueleto associados à membrana celular devidos ao baixo nível de ATP e elevada concentração de DPG (Roth, 1987; Ayi *et al*, 2008; Sabeti, 2008; Ayi *et al*, 2009).

Resultados preliminares obtidos anteriormente pelo grupo (Rosa 2011) mostraram que o DPG tem um efeito nocivo em *P. falciparum* e será importante confirmar como se exerce este efeito no desenvolvimento parasitário.

Sabendo que 1) o eritrócito é a principal célula hospedeira do parasita e que todo o metabolismo eritrocitário para obtenção de energia se baseia na via glicolítica, qualquer alteração nesta via metabólica poderá afetar o parasita e 2) Ayi *et al.* (2009) utilizou NaF para inibir a enolase, comprometer a geração de ATP em eritrócitos normais, e simular os efeitos fisiológicos de uma deficiência em PK (défice de ATP e aumento de DPG); este composto (NaF), será utilizado em ensaios de invasão e maturação. A inibição da enolase e o aumento da concentração de DPG, poderão funcionar como modelos experimentais para simular o mecanismo protetor contra *P. falciparum* pela deficiência em PK.

II.1 OBJETIVOS

Tendo conhecimento de um reduzido número de trabalhos realizados a nível da PKD, e sabendo que a mesma pode conferir proteção contra a malária, faz com que este trabalho tenha como objetivo geral estudar o efeito da deficiência em PK associada a proteção contra a malária, utilizando culturas *in vitro* de *P. falciparum*, através dos seguintes objetivos específicos:

- 1- Avaliar a suscetibilidade do parasita em concentrações crescentes do composto NaF através da determinação do IC50.
- 2- Avaliar os níveis de invasão e maturação do parasita *P. falciparum* na cultura suplementada com os compostos NaF, baseando-se na concentração determinada no objetivo anterior.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 MATERIAL

Foram recolhidas amostras de sangue em indivíduos humanos saudáveis, a fim de manter as culturas com os parasitas *P. falciparum*, para posterior realização de ensaios. Para tal, foi necessário o uso de vários reagentes, materiais, assim como equipamentos de leitura e observação.

III.1.1 Clones

Os clones para o presente estudo foram 3D7 e Dd2, de *P. falciparum*, que foram mantidas em frascos e/ou placas de cultura, tratadas diariamente em condições de máxima esterilidade, temperatura e CO₂ favorável para o crescimento e multiplicação dos parasitas.

III.1.2 Dadores

Neste estudo, para a realização das culturas *in vitro* de *P. falciparum* foi utilizado sangue humano de voluntários considerados saudáveis que apresentavam os seguintes critérios: não ter feito nenhuma medicação com anti maláricos ou outros fármacos, nunca ter estado em área endémica para malária, e ser portador do grupo sanguíneo O⁺ (dador universal).

III.2 MÉTODOS

III.2.1 Cultura de *P. falciparum* *in vitro*

Foram usadas os dois clones de *P. falciparum* já referidas anteriormente, sabendo que um dos clones é mais suscetível à cloroquina (3D7) e o outro é mais resistente ao fármaco (Dd2). Estas passaram por vários processos como, descongelação para mantê-las em culturas; manutenção diária para garantir melhores condições de crescimento; e sincronização sempre que se pretendesse fazer algum ensaio. Estas culturas contínuas foram mantidas com parasitémia (percentagem de eritrócitos infetados) inferior a 2% e um hematócrito (Hto) de 5%. O meio de cultura foi substituído diariamente (figura 6).



Fig 6 - Imagens de culturas de *P. falciparum*, A- fotografia tirada numa câmara de fluxo laminar pela doutoranda Lis Lobo no dia 20 de Maio de 2016 as 10 horas; B e C- fonte: <https://www.google.pt/search?q=recipiente+de+cultura+de+plasmodium+in+vitro>.

III.2.1.1 Preparação de hemácias sãs (50%)

Foi feita a colheita do sangue e preservado com anticoagulante (EDTA), e dentro da câmara de fluxo transferiu-se para vários tubos de 15 ml para ser feita a centrifugação 2800 rpm, 5 min.

Descartou-se o sobrenadante e a camada leucoplaquetária, adicionando-se igual volume de meio de cultura ao *pellet* e de seguida a sua homogeneização. O procedimento foi realizado por mais duas vezes para garantir a total remoção dos outros elementos do sangue. Depois da última lavagem, mediu-se o *pellet* e acrescentou-se meio RPMI em igual volume para obter-se hemácias sãs a 50%, e estas foram conservadas a uma temperatura de 4°C e num período máximo de 3 semanas.

Como controlo de esterilidade, foi feita uma alíquota de 1 ml para cada frasco estéril que continha estas hemácias, e estas foram mantidas na estufa a 37°C e 5% CO₂, durante 24h e ou 48h para posterior observação.

III.2.1.2. Parasitas

Descongelção

Para descongelar os clones, foram usadas as seguintes soluções: Solução A (12% NaCl em água destilada), Solução B (1,6% NaCl em água destilada) e Solução C (0,2 % dextrose + 0,9% NaCl em água destilada), após serem esterilizadas por filtração.

Os clones foram retirados do azoto líquido e descongelados a 37°C, e seguidamente transferidos para um tubo de 15 ml onde se adicionou para cada 1ml de sangue 0,2ml da solução A. Deixou-se repousar por 3 min e foi adicionada a solução B onde para cada 1ml se adicionou o volume de 10ml e foi feita a centrifugação a 2000 rpm (670,8 g), 5min a temperatura ambiente, desprezando-se o sobrenadante.

Por fim, adiciona-se ao *pellet* a solução C nas mesmas proporções que a solução B. Todas as soluções foram adicionadas gota a gota com homogeneização constante com o intuito de evitar o choque térmico nos parasitas e/ou hemólise. Após a nova centrifugação foi desprezado o sobrenadante e o *pellet* transferido para o frasco de cultura com hematócrito a 5% após a homogeneização da mesma. As duas estirpes foram continuamente mantidas em cultura a 37°C e 5% CO₂ de acordo com o método descrito por Trager & Jensen, (1976).

Manutenção

Diariamente foram feitos esfregaços onde as lâminas foram fixadas com metanol a 100% (Merck, Lisboa, Portugal), depois de secas foram coradas com a solução ou corante de Giemsa (Merck, Lisboa, Portugal) preparada em água tamponada (20%), durante 20 a 30 minutos. Passado este tempo, estas lâminas foram lavadas em água corrente a fim de retirar o excesso de corante. Depois de seca foi-lhe colocado óleo de imersão, e observada num microscópio ótico (ampliação 1000x) com a objetiva 100x e determinava-se a parasitémia. Antes da observação com esta lente foi sempre necessário focar o campo microscópico com a lente de 40x e posteriormente a de 100x para identificação dos parasitas. Para o cálculo da parasitémia foi aplicada a seguinte fórmula:

$$\text{Parasitémia \%} = \frac{\text{total de hemácias parasitadas}}{\text{total de hemácias no campo microscópico}} \times 100$$

Em geral eram observados 5 a 10 campos, e o resultado expresso em %.

O meio de cultura foi substituído diariamente e adicionado novo meio à cultura após a aspiração do meio anterior. A cada 3 a 4 dias foi feita a centrifugação das culturas a 2500 rpm / 5min, e medido o *pellet* ao qual se adicionaram hemácias sãs para repor o valor de 5% do hematócrito.

Sincronização

Para obter um predomínio de formas jovens na cultura, recorreu-se ao protocolo de sincronização de Lambros e Vanderberg, (1979), utilizando uma solução de D-sorbitol (Sigma-Aldrich, Sintra Portugal) a 5%. Esta solução foi adicionada gota a gota aos eritrócitos infetados que se encontravam em cultura que (corresponde a 0,5ml de uma cultura de 10ml), depois de serem transferidos a um tubo de centrífuga de 15ml a fim de remover as formas parasitárias mais maduras e manter na cultura somente as formas mais jovens.

Deste modo as culturas foram centrifugadas a 2000 rpm, por 5 min e adicionou-se ao *pellet* sorbitol a 5% numa quantidade aproximadamente de 10 vezes superior ao do *pellet*, deixando-se incubar na estufa durante 10 min. Centrifugou-se novamente e descartou-se

o sobrenadante, e foi adicionado PBS em igual volume ao usado anteriormente para o sorbitol e voltou-se a centrifugar. Este processo permite a lise dos eritrócitos infetados com parasitas mais maduros ou em fase mais avançadas, trofozoítos e esquizontes (figura7).

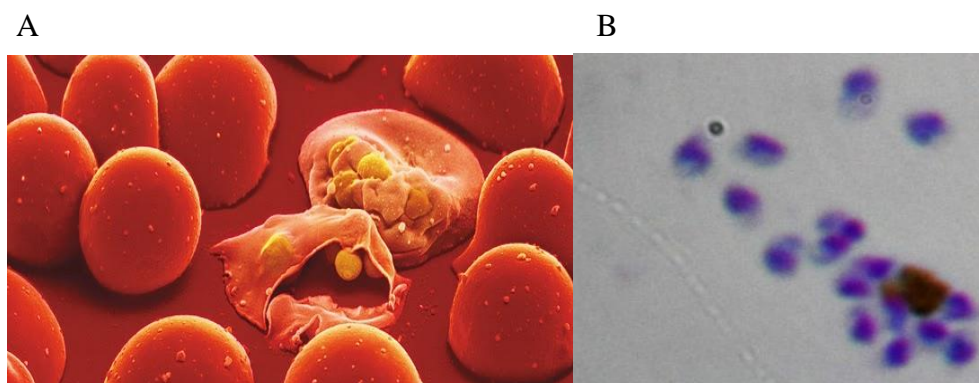


Fig.7- Imagens dos eritrócitos infetados por *P.falciparum*. A- eritrócitos numa cultura; B- merozoítos observado por microscopia ótica.

Fonte: http://4.bp.blogspot.com/-ujjgyXza_bM/Us2PVqB_DcI/AAAAAAAAAHNI/_tvHOcqBIQ4/s1600/Phenom-Malaria-parasite-631.jpg

Muitas vezes foi necessário adicionar hemácias sãs para que o volume final dos eritrócitos fosse de 0,5ml e o hematócrito se mantivesse a 5% numa cultura com 10ml de meio (RPMI 1640) e finalmente foi posta na estufa com a devida identificação. Este procedimento foi aplicado tanto para os ensaios de suscetibilidade como para invasão e maturação.

III.2.2 Ensaio de suscetibilidade – determinação de IC50

O IC50 é a concentração de um composto necessária para matar ou reduzir 50% dos parasitas *in vitro* num determinado ensaio, avaliando assim o grau de desenvolvimento do parasita na presença de diferentes concentrações (diluição seriada) deste mesmo composto. Este protocolo é baseado no método de fluorescência com SYBR Green I descrito por Bennett (Bennett *et al*, 2004) mas com algumas adaptações.

Para o ensaio de suscetibilidade foi necessária uma cultura previamente sincronizada, visto que só as formas mais jovens do parasita devem estar presentes. Foram então definidas como condições iniciais de crescimento *in vitro*, 1% de parasitemia inicial (Pi) e 3% de hematócrito (Hto); isto é o ajuste da Pi e do Hto.

Tendo em conta o volume final da solução, foi necessário o ajuste das quantidades de Hemácias totais (HT) que resulta da adição de hemácias parasitadas (Hp) e hemácias sãs (Hs) com o volume do meio necessário para o número de poços contidos na placa.

Numa calha, colocou-se meio de cultura, as hemácias parasitadas e as hemácias sãs, previamente ajustadas. Após a sua homogeneização, a mistura foi transferida com uma pipeta multicanal BioPette™ Plus para uma placa de 96 poços (VWR, Carnaxide, Portugal) de fundo plano conforme (figura 8). Adicionaram-se nos três primeiros poços o composto NaF e foram feitas diluições seriadas (1:2) com concentrações entre 10 mM a 0,00635mM, onde foram feitos ajustes necessários para cada ensaio com a exceção dos últimos poços que serviram de controlo (K). Foram escolhidas estas concentrações pois, aproximam-se dos valores utilizados em trabalhos realizados previamente neste grupo de malária e demonstram ser apropriadas.



Fig.8 - Placa utilizada para o ensaio de suscetibilidade com 96 poços (VWR, Carnaxide, Portugal).

Fonte: http://www.lojalab.com.br/produtos_fotos/K30-5096P%20VERMELHA_138958.JPG

A placa esteve a encubar durante 48h (ciclo de vida do parasita) na estufa a 37°C e numa atmosfera de 5% CO₂. Para identificar os eritrócitos infetados após este tempo de incubação, foi-lhe adicionada o composto SYBR Green I, por se tratar de um agente intercalante (permeável à membrana), fluorescente quando ligado ao DNA em cadeia dupla (Izumiyama, et al 2009); de modo a marcar o DNA do parasita viável, numa concentração de 0,25% da solução stock de SYBR Green em PBS. A microplaca com as amostras, foi a incubar novamente na estufa com as condições já referidas anteriormente, durante 1h, antes da leitura no Fluorímetro TRIAD™ 1065 (DYNEX Technologies, E.U.A.). Posteriormente foi feita a centrifugação a 4000 rpm, 2 min, aspirado o sobrenadante, adicionou-se 100µl de PBS em cada poço, homogeneizando suavemente para evitar as bolhas a fim de não interferir na leitura. Fez-se a leitura no Fluorímetro já

referido anteriormente, num comprimento de onda que vai de 485nm-535nm, como mostra a (figura 9) e para tal foi indispensável identificar a estirpe, o composto utilizado e a sua concentração. Estes ensaios foram realizados várias vezes, em triplicado nas diferentes concentrações do composto, a fim de obter melhores resultados. Para garantir máximas condições de esterilidade e evitar contaminações, quase todo procedimento foi efetuado no interior de uma câmara de fluxo laminar.

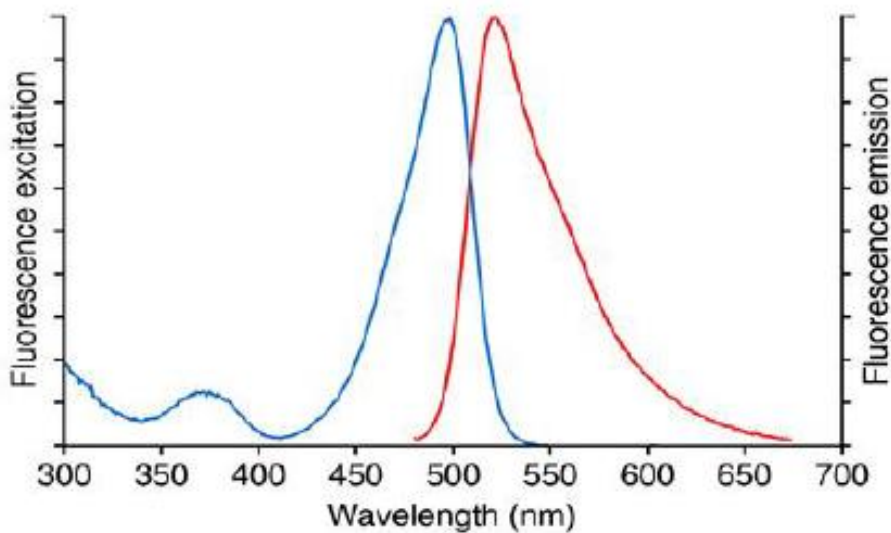


Fig 9- Espectro de excitação (linha azul) e emissão (linha vermelha) de fluorescência do corante SYBR® Green ligado ao DNA. (adaptado de Molecular Probes, 2006)

III.2.3 Ensaio de invasão/ maturação

O período estabelecido para cada ensaio de invasão e maturação foi de 10 dias, e as culturas parasitadas eram sincronizadas com uma janela de 6h. Passado 72h determinava-se a parasitemia por meio de esfregaços e observação microscópica. Este ensaio deve ser iniciado com o estágio de esquizontes e a parasitemia ajustada a 0,5% e o Hto a de 5%.

Preparou-se o meio (RPMI), uma parte foi utilizado para as amostras controlo, e a outra parte foi suplementada com composto a uma concentração final de 0,5 mM para o ensaio, a partir da fórmula: $C_i.V_i = C_f.V_f$.

A concentração do composto utilizada neste ensaio, dependeu dos resultados dos ensaios de suscetibilidade, utilizando uma concentração inferior a esta, a fim de garantir a viabilidade dos parasitas pelo menos durante quatro ciclos.

As hemácias parasitadas (Hp) foram obtidas por centrifugação da cultura a 2500 rpm em 5 min, a fim de obter o *pellet*, e calcular a percentagem a partir da fórmula: $P_i.V_i = P_f.V_f$;

as hemácias sãs (Hs) foram obtidas após uma prévia preparação. Utilizou-se uma placa de 6 poços de fundo plano (figura 10), onde 3 poços foram para as amostras (hemácias parasitadas e sãs) de 3ml de meio com composto (os tratados) NaF a uma concentração conhecida, e nos outros 3 poços haviam as mesmas amostras mas com 3ml de meio sem composto (isto é os não tratados) que serviram de controlo.



Fig 10- Placas utilizadas no ensaio de invasão e maturação com 6 poços (VWR, Carnaxide, Portugal).

Fonte: <http://cyd.ro/wp-content/uploads/2015/06/cultura-celule.png>

Este procedimento permitia comparar o crescimento parasitário na presença do composto durante o período previsto. Diariamente eram feitos esfregaços destas culturas que eram fixados com metanol a 100%, corados com Giemsa durante 30 min e observado ao microscópio ótico com a objetiva de 100x aplicando o óleo de imersão (Merck). Contava-se a parasitémia, e determinava-se a sua percentagem por meio da fórmula:

$$\text{Parasitémia \%} = \frac{\text{total de hemácias parasitadas}}{\text{total de hemácias no campo microscópico}} \times 100$$

Durante a observação microscópica dos parasitas, foi muito importante ter em conta o estágio, a morfologia, e o tempo do ensaio. Isto é, saber se em cada dia os parasitas apresentam maioritariamente em estágio de anel ou trofozítio/esquizontes, se a morfologia está alterada, e em que dia do ensaio foi possível observar tais alterações, assim como a presença de gametócitos e formas picnóticas, que aparecem em consequência do stress oxidativo.

As contagens no campo microscópico eram feitas em separado para cada estágio do parasita, isto é anel e trofozoítos/esquizonte em cinco campos diferentes. Contavam-se o número de hemácias por campo, o número destas hemácias que estivessem parasitadas, calculava-se o total de hemácias, assim como o total de hemácias parasitadas com o referido estágio. Dividiu-se o total de hemácias parasitadas pelo total de hemácias dos cinco campos observados, e multiplicou-se por 100 a fim de se encontrar a percentagem. Após a aspiração dos meios e feitos os esfregaços, eram colocados os novos meios, mas sem adição de hemácias e conservados adequadamente até completar o tempo previsto para o ensaio. Apesar destes poderem ser interrompidos caso a cultura estivesse contaminada e também pela morfologia que o parasita apresentasse. A troca do meio e os esfregaços eram feitos a mesma hora a fim de garantir maior uniformização dos resultados.

Terminado o tempo previsto para o ensaio, e a determinação da percentagem de parasitémia para cada dia, foram calculadas as médias das parasitémias totais tanto na cultura controlo como na cultura tratada com o composto referido anteriormente, as médias de anéis e esquizontes, os rácios de invasão e maturação no programa excel e as respetivas representações gráficas.

Os rácios dão uma ideia da continuidade do crescimento parasitário. O rácio de invasão mostra o número de parasitas originário de esquizontes 24h antes de invadirem novas hemácias; e obtém-se pela seguinte fórmula: 1º ciclo anéis 24h/esquizonte 0h, 2º ciclo anéis de 72h/ esquizontes 48h; 3º ciclo anéis de 120h/ esquizontes 96h; 4º ciclo anéis 168h/esquizontes 144h isto é, dividir os anéis do presente dia pelos esquizontes do dia anterior durante quatro ciclos consecutivos.

O rácio de maturação mostra o número de parasitas originários de anéis 24h depois de invadirem as hemácias e obtém-se pela fórmula: 1º ciclo esquizonte 48h/anéis 24h, 2º ciclo esquizontes 96h/ anéis 72h, 3º ciclo esquizontes 144h/ anéis 120h, 4º ciclo 192h/anéis 168h, neste caso divide-se os esquizontes do presente dia pelos anéis do dia anterior durante quatro ciclos consecutivos.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1 ENSAIO IC50 COM ADIÇÃO DE FLUORETO DE SÓDIO (NaF)

Os ensaios de suscetibilidade de *P. falciparum*, dos clones sensível à cloroquina 3D7 e resistente à cloroquina Dd2, foram realizados na presença do composto NaF durante 48 horas, tendo sido aplicadas várias concentrações para o composto entre 10 mM a 0,00635mM, em pelo menos três ensaios e em triplicado, com o intuito de se obter a melhor curva. Posteriormente, foi medida a viabilidade celular por fluorescência.

Os valores da parasitemia em anéis e esquizontes foram transformados em percentagem de sobrevivência em função do logaritmo da concentração dos compostos. A análise e representação gráfica foi efetuada no programa Graph Pad Prism, versão 4.00 para Windows, da GraphPad Software, San Diego, USA.

Foi possível observar diferenças na sobrevivência dos parasitas com as concentrações testadas, tornando possível a determinação do IC50 tanto na estirpe sensível como na resistente (Figuras 11 e 12).

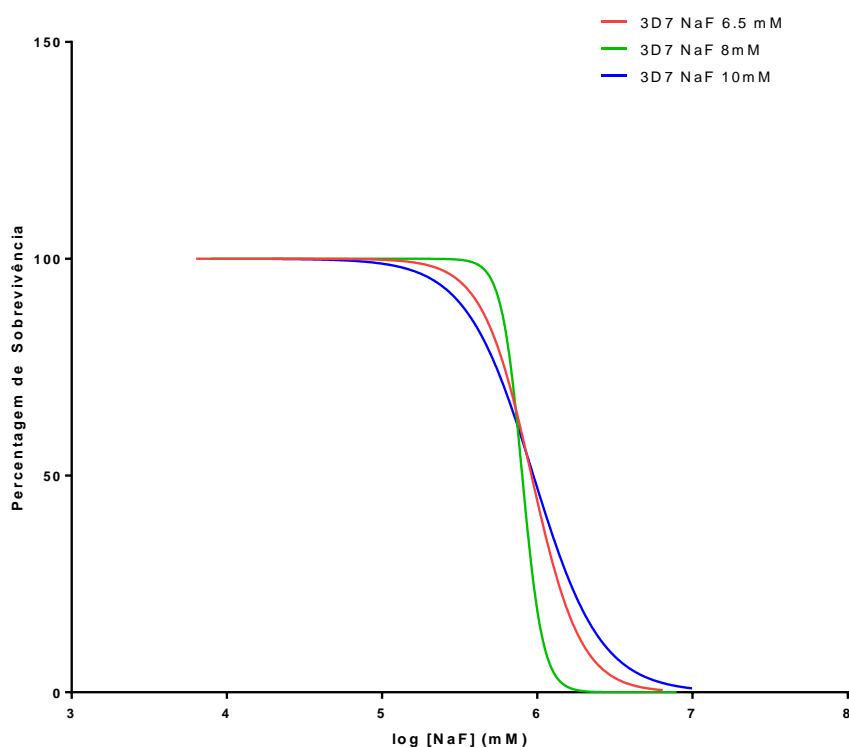


Fig 11-Influência do NaF sobre o clone sensível à cloroquina (3D7) após 48 horas de incubação.

Na Tabela 1 é apresentado o valor de IC₅₀ correspondente ao clone 3D7.

Clones <i>P.falciparum</i>	IC ₅₀ (mM)	SD
3D7clone sensível a cloroquina	0,89	0.08

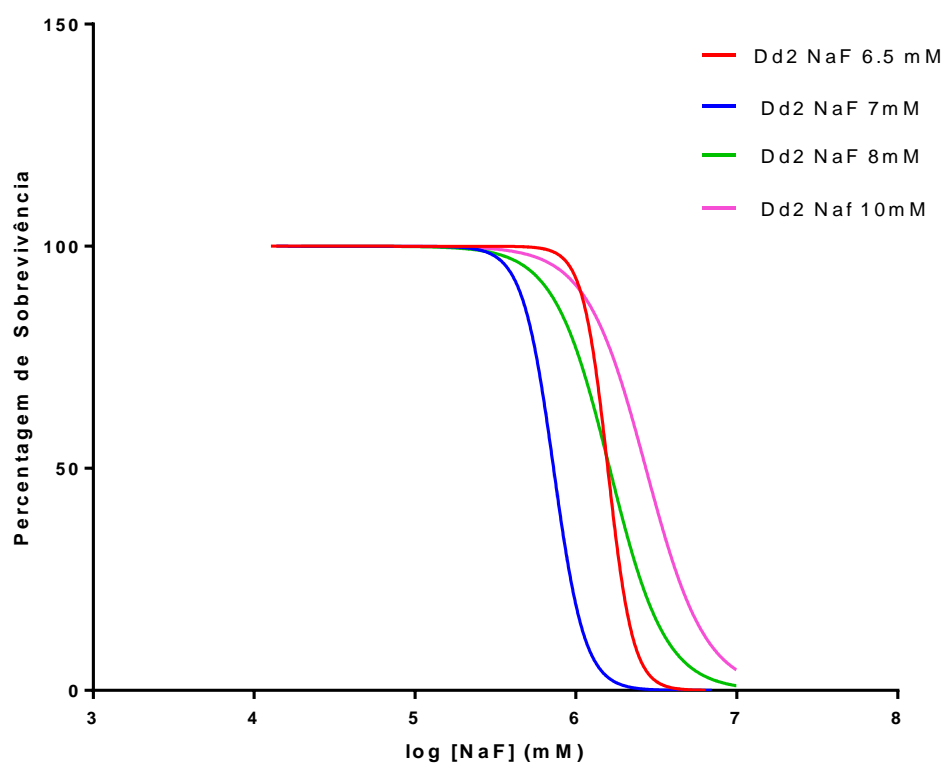


Fig 12- Influência do NaF sobre o clone resistente à cloroquina (Dd2) após 48 horas de incubação.

Na Tabela 2 é apresentado o valor de IC₅₀ correspondente à estirpe Dd2.

Clones <i>P.falciparum</i>	IC ₅₀ (mM)	SD
Dd2clone sensível a cloroquina	1,66	0,82

Como já foi referido anteriormente, o NaF tem a capacidade de inibir a enolase na via glicolítica das hemácias, o que tem um efeito imediato na geração de ATP. Como consequência desta diminuição há um aumento de 2,3-DPG o que leva a alterações a nível membranar dificultando a invasão dos parasitas, sendo por isso alvo de estudo para a produção de novos fármacos tendo em vista as questões de resistência já existentes. Com os valores obtidos, neste trabalho, verificamos que o clone Dd2 (resistente) requer uma maior concentração do composto ($\approx 2\text{mM}$) para inibir 50% dos parasitas em comparação com o clone 3D7 (sensível), na qual apenas foi necessário $\approx 1\text{mM}$ para o mesmo fim.

IV.2 ENSAIO INVASÃO/ MATURAÇÃO COM ADIÇÃO FLUORETO DE SÓDIO (NAF)

O ensaio de invasão e maturação foi realizado na presença do composto NaF com as estirpes 3D7 e Dd2 em quatro ciclos consecutivos, e em triplicado. No início do ciclo a cultura tratada e o controlo, pareciam seguir o mesmo ritmo de crescimento, mas no fim do segundo ciclo verificaram-se alterações no desenvolvimento parasitário na cultura tratada; tendo conhecimento que o composto simula o fenótipo associado a PKD, foi possível constatar uma média de parasitémia total menor na cultura suplementada com NaF, quando comparado ao controlo. Para o clone 3D7, a uma concentração de 0,5 mM de NaF obtivemos os resultados representados na Figura 13.

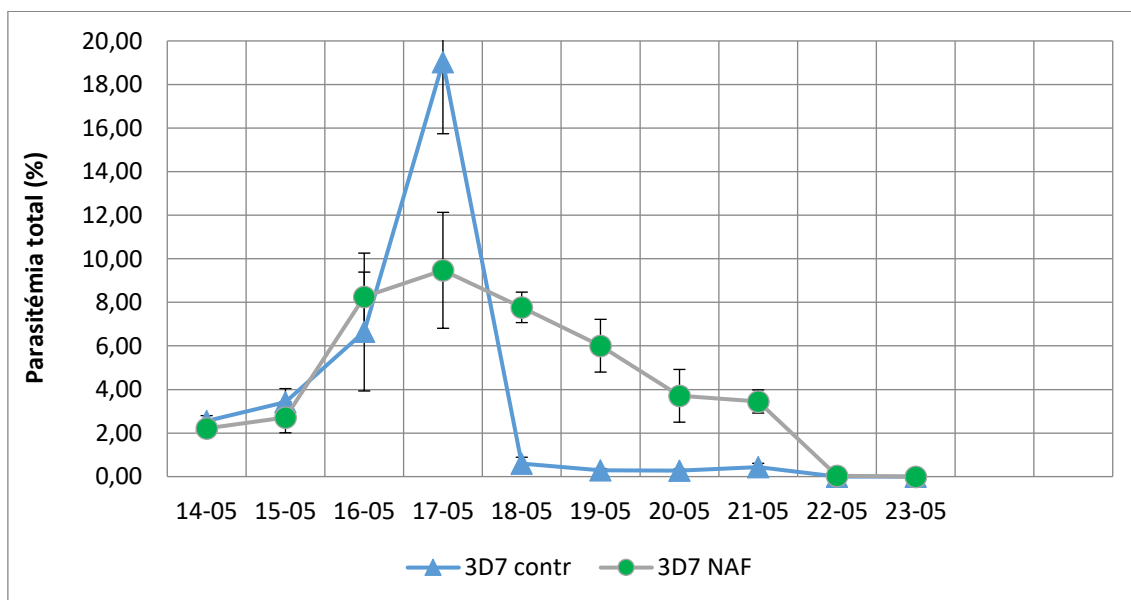


Fig 13- Médias da parasitémia total, em hemácias sem adição de composto e com adição de composto (NaF).

Este gráfico mostra claramente que o composto tem algum efeito sobre o parasita, visto que as hemácias parasitadas sem adição do composto tiveram um pico de parasitémia muito alto em relação as que foram suplementadas com o NaF. A parasitémia mais

elevada foi no sangue controlo e o pico de parasitémia dá-se no segundo ciclo, tanto para o controlo como para a amostra. Depois a parasitémia decresce até a hemólise. O aumento da parasitémia reflete a invasão das hemácias por novos parasitas, a diminuição demonstra o período de maturação, e como há maior consumo de hemácias sem reposição de novas os parasitas morrem. Observa-se alternância clara entre os estádios de crescimento anéis e esquizontes, clara definição dos ciclos de crescimento de 48h e o padrão de crescimento não varia com o tipo de sangue (figura 14).

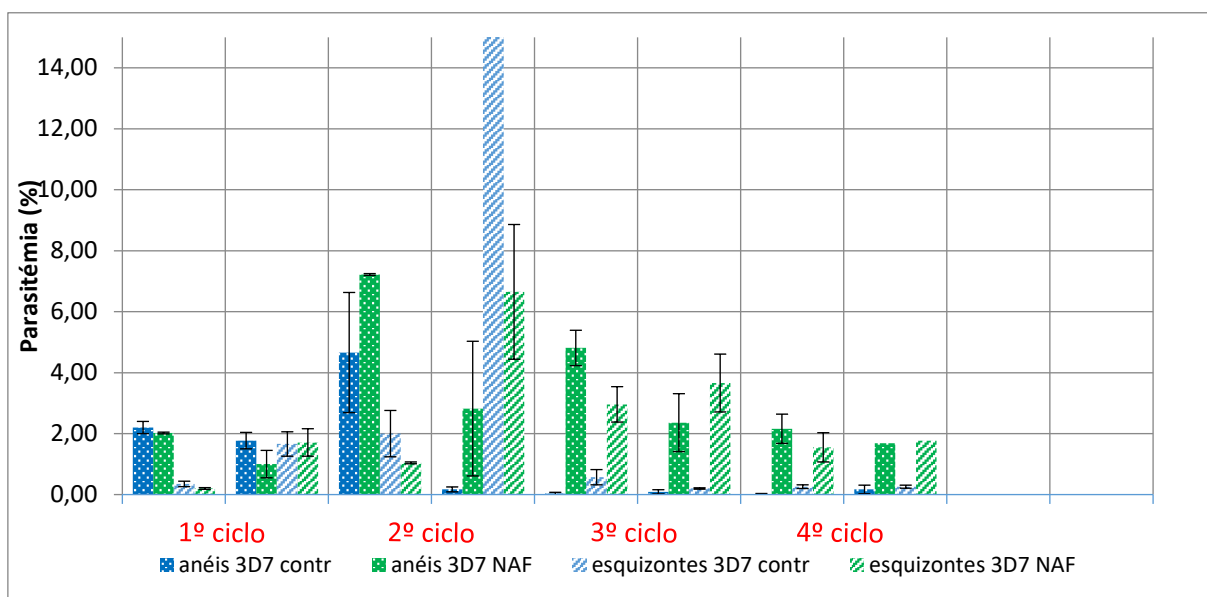


Fig 14- Média de anéis e esquizontes no sangue controlo e no sangue suplementado com NaF.

Foi possível observar diferença na morfologia do parasita no sangue suplementado com NaF em relação ao sangue controlo. Quanto a presença de gametócitos, é de realçar que no início do segundo ciclo, foi possível observar gametócitos nas amostras, reflexo de uma cultura stressada devido ao ambiente desfavorável criado pelo composto e raramente foram observadas formas picnóticas nas amostras. Nos controlos, somente no fim do segundo ciclo estas foram observadas, devendo-se ao aumento da parasitémia no dia anterior e ao maior número de hemácias invadidas. No início do 4º ciclo já se podiam observar gametócitos na cultura controlo.

Estas observações foram verificadas com um aumento gradual até ao fim do ensaio, chegando mesmo a dificultar a contagem tanto das hemácias como dos parasitas. Foi possível observar microscopicamente alterações morfológicas do parasita nas amostras.

O aumento da parasitémia no 2º ciclo, reflete a invasão das hemácias por novos parasitas enquanto que a diminuição demonstra o período de maturação, como não há reposição de novas hemácias, estes acabam por morrer.

Os rácios de invasão e maturação dão uma ideia da continuidade do crescimento parasitário; assim, o rácio de invasão mostra o número de parasitas originário de esquizontes 24h antes de invadirem novas hemácias. Estas experiências requerem o número elevado de réplicas e maior quantidade de sangue disponível.

Aquando da análise da invasão, notámos que no primeiro ciclo os parasitas da cultura controlo, invadiram maior quantidade de hemácias devido à maior quantidade de merozoítos originário da geração anterior. Como não houve reposição de novas hemácias, e sendo maior a quantidade de merozoitos do ciclo seguinte, fez com que a invasão deste último fosse diminuído.

Ao contrário dos parasitas da cultura suplementada com NaF, que tiveram menor invasão no primeiro ciclo, tiveram maior quantidade de hemácias por invadir no ciclo seguinte, pelos merozoítos da nova geração, permitindo maior invasão no ciclo seguinte (Figura 15). Os nossos resultados encontram-se de acordo com os que se encontram escritos na literatura (Ayi *et al.*, 2009), onde foi demonstrado que estes eritrócitos são relativamente refratários à invasão por *P. falciparum*.

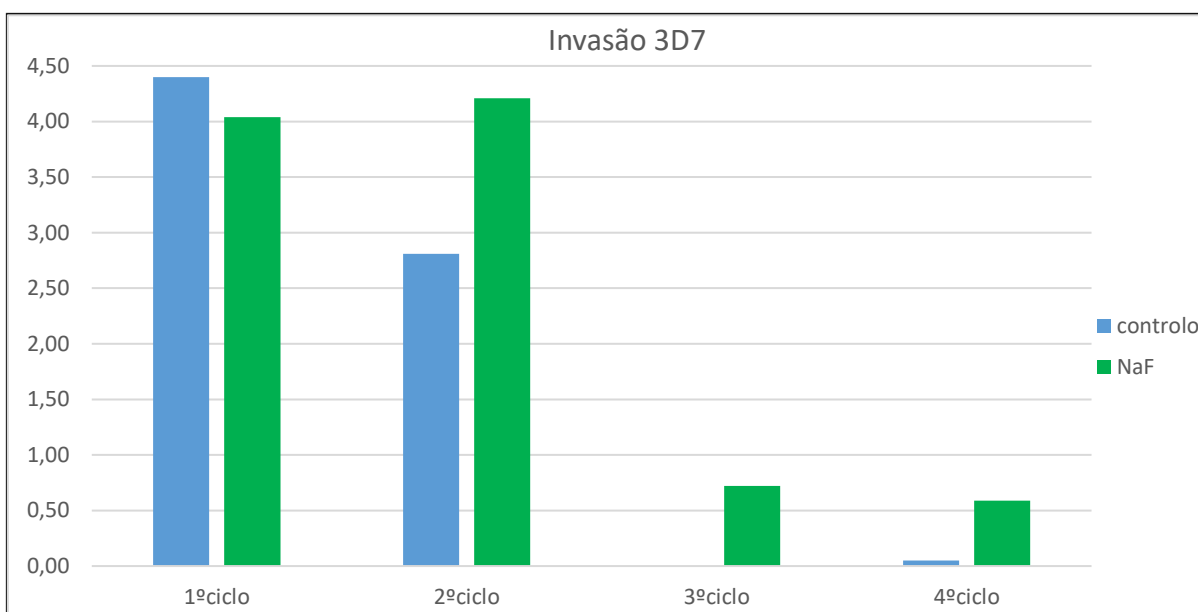


Fig 15- Rácios de invasão dos parasitas no sangue controlo e no sangue suplementado com NaF.

Quanto ao rácio de maturação (Figura 16), mostra o número de parasitas originário de anéis 24h depois da invasão nas hemácias, e como representa o gráfico, a maturação nos parasitas da cultura controlo foi maior em comparação à cultura suplementada com NaF.

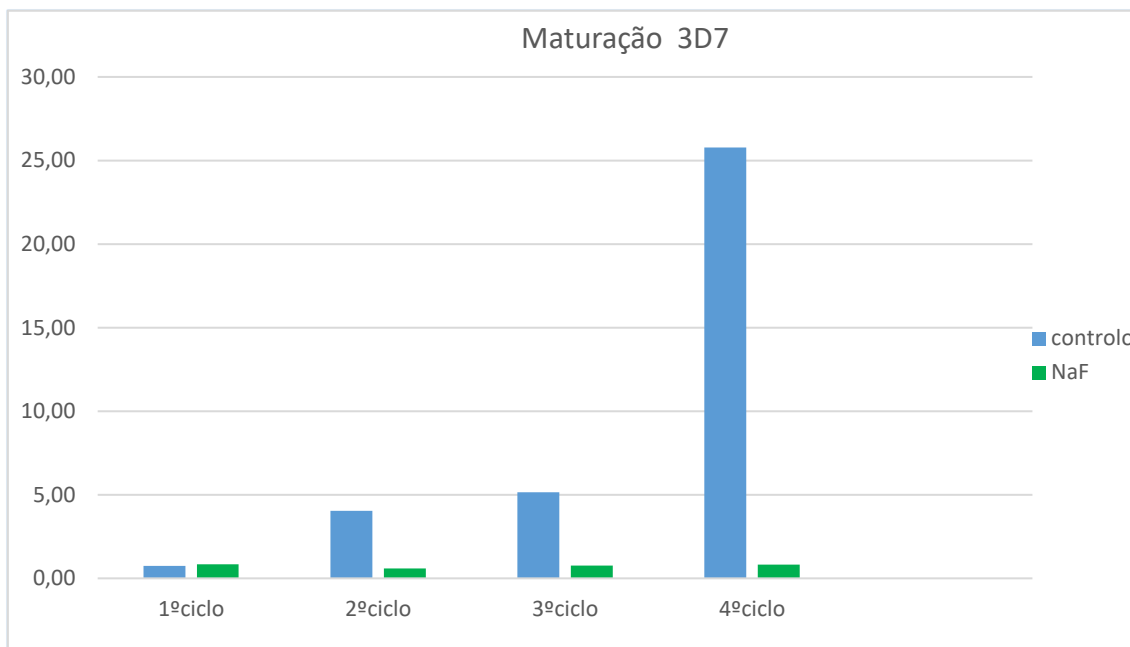


Fig 16- Rácios de maturação dos parasitas no sangue controlo e no sangue suplementado com NaF.

A partir do 3º dia do ensaio foram observados gametócitos, em baixa quantidade nas amostras, enquanto que os controlos não apresentavam qualquer alteração visível microscopicamente.

No 4º dia as formas picnóticas já eram evidentes nos controlos e as amostras continuaram a apresentar gametócitos. No 5º dia uma boa parte dos parasitas nas amostras, apresentavam um aspeto não saudável e deformados. E a medida que os dias foram passando, aumentavam o número de gametócitos nas amostras, sendo muito raro observar formas picnóticas. Por outro lado, nos controlos aumentavam as formas picnóticas, a quantidade de hemácias era diminuída, chegando a impossibilitar a contagem tanto das hemácias como dos parasitas. É de realçar que do sétimo dia em diante os controlos também apresentavam gametócitos. O efeito da inibição da Enolase pelo NaF, no clone sensível, parece ter afetado os níveis de invasão e maturação do parasita.

VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com Ayi *et al.* (2009), os níveis baixos de ATP por consequência da supressão do último passo da glicólise, podem alterar as propriedades da membrana dos eritrócitos, reduzindo a capacidade de invasão dos parasitas.

Os resultados sugerem que NaF tem influência sobre a viabilidade, crescimento e invasão dos parasitas nas hemácias. Por isso, este composto torna-se um bom candidato na simulação da deficiência em PK *in vitro*.

Foi observado que o clone resistente, requer uma concentração maior do composto em relação à sensível, para inibir 50% dos parasitas. No entanto, a falta de dados *in vivo* põe em causa a eficiência do composto contra o *P. falciparum* sendo necessário efetuar outros ensaios.

Os testes *in vitro* de suscetibilidade aos compostos, têm um papel muito importante nas estratégias que visam a descoberta de novos fármacos para o tratamento da malária.

Este estudo poderá ser alargado ao testar a sua aplicação, na análise das atividades anti maláricas de novos compostos, sobretudo em áreas aonde a malária é endémica.

Futuramente seria interessante que os estudos fossem realizados com sangue deficiente, pois isto permitir-nos-ia obter resultados mais fiáveis e fidedignos.

Estudos genómicos e proteómicos poderão ser realizados nos países suspeitos com a deficiência em PK pois isso irá contribuir para o melhor conhecimento desta deficiência, uma vez que se sabe pouco sobre ela.

VII. REFERÊNCIAS

- Aidoo, M., Terlouw, D. J., Kolczak, M. S., McElroy, P. D., ter Kuile, F. O., Kariuki, S., Nahlen, L. B., Lal, A. A. & Udhayakumar, V., 2002. Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *The Lancet*, 359:1311-1312.
- Alves, J., Machado, P., Silva, J., Gonçalves, N., Ribeiro, L., Faustino, P., ... & Arez, A. P., 2010. Analysis of malaria associated genetic traits in Cabo Verde, a melting pot of European and sub Saharan settlers. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 44:62-68.
- Allison, A. C., 1954. Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *British medical journal*, 1:290.
- Asakuta, T., Sato, Y., Minakami, S., & Yoshikawa, H., 1966. Ph dependency of 2,3-diphosphoglycerate content in red blood cells, *Clinica Chimica Acta*, 14: 840-841.
- Ashley, E., McGready, R., Proux, S., & Nosten, F., 2006. Malaria, *Travel Medicine and Infectious Disease*, 4:159-173.
- Ayi, K., Min-Oo, G., Serghides, L., Crockett, M., Kirby-Allen, M., Quirt, I., Gros, P., & Kain, K. C., 2008. Pyruvate kinase deficiency and malaria. *New England Journal of Medicine*, 358:1805-1810.
- Ayi, K., Liles, W. C., Gros, P., & Kain, K. C., 2009. Adenosine triphosphate depletion of erythrocytes simulates the phenotype associated with pyruvate kinase deficiency and confers protection against *Plasmodium falciparum* in vitro. *Journal of Infectious Diseases*, 200:1289-1299.
- Balakrishnan, I., & Gillespie, S. H., 2001. Vector-borne parasitic diseases (pp. 91-121). *J. Zuckerman (Ed.)*. Chichester: Wiley.
- Benesch, R., & Benesch, R. E., 1967. The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochemical and biophysical research communications*, 26:162-167.
- Berglund, L., & Humble, E., 1979. Kinetic properties of pig pyruvate kinases type A from kidney and type M from muscle. *Archives of biochemistry and biophysics*, 195:347-361.
- Bienzle, U., Lucas, A., Ayeni, O., & Luzzatto, L., 1972. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and malaria: greater resistance of females heterozygous for enzyme deficiency and of males with non-deficient variant. *The Lancet*, 299:107-110.

- Bianchi, P., & Zanella, A., 2000. Hematologically important mutations: red cell pyruvate kinase (third update). *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 26:47-53.
- Brewer, G. J., Powell, R. D., & World Health Organization, 1965. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and *falciparum* malaria.
- Bruce-Chwatt, L. J., 1985. In: Essential malariology. William Heinemann Medical Books London.
- Bunn, H. F., 1997. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *New England Journal of Medicine*, 337:762-769.
- Carter, R., & Mendis, K. N., 2002. Evolutionary & historical aspects of the burden of malaria. *Clinical microbiology reviews*, 15: 564-594.
- Cappellini, M. D., & Fiorelli, G., 2008. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *The lancet*, 371:64-74.
- Clark, B. E., & Thein, S. L., 2004. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. *Clinical & Laboratory Haematology*, 26:159-176.
- Dephosphorylation of 2, 3-bisphosphoglycerate by MIPP expands the regulatory capacity of the Rapoport-Luebering glycolytic shunt. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105:5998-6003.
- Cowman, A. F., Berry, D., & Baum, J., 2012. The cellular & molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *The Journal of cell biology*, 198: 961-971.
- Currie, C., & Regional Office for Europe World Health Organization, 2000. Health & health behaviour among young people: health behaviour in school-aged children: a WHO cross-national study (HBSC), *international report*. WHO.
- Dooland, D. L., Beck, H. P., & Goog, M. F., 1994. Evidence for limited activation of distinct CD4+ T cell subsets in response to the Plasmodium *falciparum* circumsporozoite protein in Papua New Guinea. *Parasite immunology*, 16: 129-136.
- Dubey, M. L., Hegde, R., Ganguly, N. K., & Mahajan, R. C., 2003 Decreased level of 2,3-diphosphoglycerate & alteration of structural integrity in erythrocytes infected with plasmodium *falciparum* in vitro, *Mol Cell Biochem*, 246, 137-141.
- Durand, P. M., & Coetzer, T. L., 2008. Hereditary red cell disorders & malaria resistance. *haematologica*, 93: 961-963.
- Durand, P. M., & Coetzer, T. L., 2008. Pyruvate kinase deficiency protects against malaria in humans. *Haematologica*, 93:939-940.

- Enevold, A., Vestergaard, L. S., Lusingu, J., Drakeley, C. J., Lemnge, M. M., Theander, T. G., Bygbjerg, I. C., & Alifrangis, M., 2005. Rapid screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency & haemoglobin polymorphisms in Africa by a simple high-throughput SSOP-ELISA method. *Malaria journal*, 4:61.
- Farrar, J., Hotez, P., Junghanss, T., Kang, G., Lalloo, D., & White, N. J., 2013. Manson's tropical diseases. 23^a ed. *Elsevier Health Sciences*.
- Farrar, J., Hotez, P., Junghanss, T., Kang, G., Lalloo, D., & White, N. J., 2014. Manson's tropical diseases. 23^a ed. *Elsevier Health Sciences*.
- Ferrato II, C. P. I., 2011. Estudo Cinético Da Enzima 2-Trans-Enoil-ACP-Redutase (Doctoral dissertation, Universidade Federal de Rondônia).
- Fortin, A., Stevenson, M. M., & Gros, P., 2002. Susceptibility to malaria as a complex trait: big pressure from a tiny creature. *Human Molecular Genetics*, 11:2469-2478.
- Fothergill-Gilmore, L. A., & Michels, P. A. (1993). Evolution of glycolysis. *Progress in biophysics and molecular biology*, 59(2), 105-235.
- Fucharoen, S., 2007. Genetic polymorphisms and implications for human diseases. *J Med Assoc Thai*, 90:394-8.
- Fucharoen, S., Fucharoen, G., Sae-ung, N., & Sanchaisuriya, K., 2007. Thalassemia intermedia associated with the Hb Constant Spring EE Bart's disease in pregnancy: a molecular and hematological analysis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 39:195-198.
- Gomes, A. P., Vitorino, R. R., Costa, A. D. P., Mendonça, E. G. D., Oliveira, M. G. D. A., & Siqueira-Batista, R., 2011. Severe Plasmodium *falciparum* malaria. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, 23:358-369.
- Greenwood, B., Marsh, K., & Snow, R., 1991. Why do some African children develop severe malaria?. *Parasitology today*, 7: 277-281.
- Gupta, R. K., Oesterling, R. M., & Mildvan, A. S., 1976. Dual divalent cation requirement for activation of pyruvate kinase: essential roles of both enzyme- and nucleotide-bound metal ions. *Biochemistry*, 15:2881-2887.
- Haldar, K., & Mohandas, N., 2009. Malaria, erythrocytic infection, and anemia. *ASH Education Program Book*, 2009:87-93.
- Hall, E. R., & Cottam, G. L., 1978. Isozymes of pyruvate kinase in vertebrates: their physical, chemical, kinetic and immunological properties. *International Journal of Biochemistry*, 9:785-794.
- Harteveld, C. L., Voskamp, A., Phylipsen, M., Akkermans, N., den Dunnen, J. T., White, S. J., & Giordano, P. C., 2005. Nine unknown rearrangements in 16p13. 3 and

- 11p15. 4 causing α - and β -thalassaemia characterised by high resolution multiplex ligation-dependent probe amplification. *Journal of medical genetics*, 42:922-931.
- Harteveld, C. L., Versteegh, F. G., Kok, P. J., van Rooijen-Nijdam, I. H., van Delft, P., & Giordano, P. C. (2006). Hb Bleuland [α 108 (G15) Thr \rightarrow Asn, ACC \rightarrow AAC (α 2)]: a new abnormal hemoglobin associated with a mild α -thalassaemia phenotype. *Hemoglobin*, 30:349-354.
- Harteveld, C. L., Kriek, M., Bijlsma, E. K., Erjavec, Z., Balak, D., Phylipsen, M., Voskamp, A., di Capua, E., White, S. J., & Giordano, P. C., 2007. Refinement of the genetic cause of ATR-16. *Human genetics*, 122:283-292.
- Harteveld, C. L., Versteegh, F. G., van Leer, E. H., Starreveld, J. S., Kok, P. J., van Rooijen-Nijdam, I., Delft, P. V., Zanella-Cleon, I., Becchi, M., Wajcman, H. & Giordano, P. C., 2007. Hb St. Jozef, A Val \rightarrow Leu N-Terminal Mutation Leading to Retention of the Methionine, and Partial Acetylation Found in the Globin Gene in Cis with a- α 3. 7 Thalassaemia Deletion. *Hemoglobin*, 31:313-323.
- Hayward, R. E., DeRisi, J. L., Alfadhli, S., Kaslow, D. C., Brown, P. O., & Rathod, P. K., 2000. Shotgun DNA microarrays & stage-specific gene expression in *Plasmodium falciparum* malaria. *Molecular microbiology*, 35: 6-14.
- Hay, S. I., Guerra, C. A., Tatem, A. J., Noor, A. M., & Snow, R. W., 2004. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *The Lancet infectious diseases*, 4:327-336.
- Hedrick, P. W., 2011. Genetics of populations. *Jones & Bartlett Learning*.
- Hoeppli, R., 1959. Parasites & parasitic infections in early medicine & science. *Parasites & Parasitic Infections in Early Medicine & Science*.
- Izumiyama, S., Omura, M., Takasaki, T., Ohmae, H., & Asahi, H., 2009. *Plasmodium falciparum*: development and validation of a measure of intraerythrocytic growth using SYBR Green I in a flow cytometer. *Experimental parasitology*, 121:144-150.
- Jepson, A., Banya, W., Sisay-Joof, F., Hassan-King, M., Nunes, C., Bennett, S., & Whittle, H., 1997. Quantification of the relative contribution of major histocompatibility complex (MHC) & non-MHC genes to human immune responses to foreign antigens. *Infection & immunity*, 65: 872-876.
- Kaneko, A., Taleo, G., Kalkoa, M., Yaviong, J., Reeve, P. A., Ganczakowski, M., Shirakawa, C., Palmer, K., Kobayakawa, T. & Björkman, A., 1998. Malaria epidemiology, glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency and human settlement in the Vanuatu Archipelago. *Acta tropica*, 70:285-302.

- Keitt, A. S., 1966. Pyruvate kinase deficiency and related disorders of red cell glycolysis. *The American journal of medicine*, 41:762-785.
- Kwiatkowski, D. P., 2005. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *The American Journal of Human Genetics*, 77:171-192.
- Lambros, C., & Vanderberg, J. P., 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *The Journal of parasitology*, 418-420.
- Lenzner, C., Nurnberg, P., Thiele, B. J., Reis, A., Brabec, V., Sakalova, A., & Jacobasch, G., 1994. Mutations in the pyruvate kinase L gene in patients with hereditary hemolytic anemia. *Blood*, 83:2817-2822.
- Lyke, K. E., Burges, R., Cissoko, Y., Sangare, L., Dao, M., Diarra, I., ... & Sztein, M. B., 2004. Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 β), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, & IL-12 (p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria & matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infection & immunity*, 72: 5630-5637.
- Loria, P., Miller, S., Foley, M., & Tilley, L., 1999. Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine & other quinoline antimalarials. *Biochemical Journal*, 339: 363-370.
- Lubell, A., Chandarana, H., & Rana, R. S., 1999. Glycolytic metabolites and intracellular signaling in the pancreatic beta cell. *Archives of biochemistry and biophysics*, 364:178-184.
- Machado, P., Pereira, R., Rocha, A. M., Manco, L., Fernandes, N., Miranda, J., ... & Arez, A. P., 2010. Malaria: looking for selection signatures in the human PKLR gene region. *British journal of haematology*, 149:775-784.
- Mackinnon, M. J., Gunawardena, D. M., Rajakaruna, J., Weerasingha, S., Mendis, K. N., & Carter, R., 2000. Quantifying genetic & nongenetic contributions to malarial infection in a Sri Lankan population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 12661-12666.
- Mackinnon, M. J., Mwangi, T. W., Snow, R. W., Marsh, K., & Williams, T. N., 2005. Heritability of malaria in Africa. *PLoS Med*, 2: e340.
- Marangi, M., Di Tullio, R., Mens, P. F., Martinelli, D., Fazio, V., Angarano, G., ... & Scotto, G., 2010. [Prevalence of *Plasmodium* spp. in asymptomatic African immigrants assessed by nucleic acid sequence based amplification]. *Le infezioni in medicina: rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive*, 18: 12-19.

- Martin, S. K., Miller, L. H., Alling, D., Okoye, V. C., Esan, G. J. F., Osunkoya, B. O., & Deane, M., 1979. Severe malaria and glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency: a reappraisal of the malaria/G-6-PD hypothesis. *The Lancet*, 313:524-526.
- Mendis, K., Rietveld, A., Warsame, M., Bosman, A., Greenwood, B., & Wernsdorfer, W. H., 2009. From malaria control to eradication: The WHO perspective. *Tropical Medicine & International Health*, 14: 802-809.
- Mehta, A., Mason, P. J., & Vulliamy, T. J., 2000. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 13:21-38.
- Mehta, M., Sonawat, H. M., & Sharma, S., 2005. Malaria parasite-infected erythrocytes inhibit glucose utilization in uninfected red cells. *FEBS letters*, 579:6151-6158.
- Meuwissen, J. H., & Ponnudurai, T., 1988. Biology & biochemistry of sexual & sporogonic stages of *Plasmodium falciparum*: a review. *Biology of the Cell*, 64: 245-249.
- Min-Oo, G., & Gros, P., 2005. Erythrocyte variants & the nature of their malaria protective effect. *Cellular microbiology*, 7: 753-763.
- Min-Oo, G., Fortin, A., Tam, M. F., Nantel, A., Stevenson, M. M., & Gros, P., 2003. Pyruvate kinase deficiency in mice protects against malaria. *Nature genetics*, 35:357-362.
- Modiano, D., Petrarca, V., Sirima, B. S., Nebie, I., Diallo, D., Esposito, F., & Coluzzi, M., 1996. Different response to *Plasmodium falciparum* malaria in west African sympatric ethnic groups. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93:13206-13211.
- Mohrenweiser, H. W., 1987. Functional hemizygoty in the human genome: direct estimate from twelve erythrocyte enzyme loci. *Human genetics*, 77:241-245.
- Molecular Probes, inc. SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain. Oregon, E.U.A., 2006. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp07567.pdf> (Acedido em 6 de Outubro 2016).
- Morrison, D. B., & Jeskey, H. A., 1948. Alterations in some constituents of the monkey erythrocyte infected with *Plasmodium knowlesi* as related to pigment formation. *Journal of the National Malaria Society*, 7:259-64.
- Naoum, P. C., & Domingos, C. R. B., 1997. Doença falciforme no Brasil. Origem, genótipo, haplótipos e distribuição geográfica. *Jornal brasileiro de patologia*, 33:145-53.
- Neves, D.P. *et al.* 2005. *Parasitologia humana. (S.I.) 11ª ed. São Paulo: Athene.*

- Ng, O. T., Ooi, E. E., Lee, C. C., Lee, P. J., Ng, L. C., Pei, S. W., Tu, T. M, Loh, J.P & Leo, Y. S., 2008. Naturally acquired human *Plasmodium knowlesi* infection, Singapore. *Emerging infectious diseases*, 14:814.
- Ohashi, J., Naka, I., Patarapotikul, J., Hananantachai, H., Brittenham, G., Looareesuwan, S., ... & Tokunaga, K., 2004. Extended linkage disequilibrium surrounding the hemoglobin E variant due to malarial selection. *The American Journal of Human Genetics*, 74:1198-1208.
- Riley, E. M., Ong, C. S., Olerup, O., Eida, S., Allen, S. J., Bennett, S., ... & Targett, G. A., 1990). Cellular & humoral immune responses to *Plasmodium falciparum* gametocyte antigens in malaria-immune individuals. Limited response to the 48/45-kilodalton surface antigen does not appear to be due to MHC restriction. *The Journal of Immunology*, 144: 4810-4816.
- Roth, E, Jr., 1990 *Plasmodium falciparum* carbohydrate metabolism: A connection between host cell and parasite, *Blood Cells*, 16:453-460.
- Rowe, A. K., Rowe, S. Y., Snow, R. W., Korenromp, E. L., Schellenberg, J. R. A., Stein, C., Nahlen, B. L., Bryce, J., Black, R. E., & Steketee, R. W., 2006. The burden of malaria mortality among African children in the year 2000. *International journal of epidemiology*, 35: 691-704.
- Ruwende, C., Khoo, S. C., Snow, R. W., Yates, S. N. R., Kwiatkowski, D., Gupta, S., Warn, P., Allsopp, C. E. M., Gilbert, S. C., Peschu, N., Newbold, C. I., Greenwood, B. M., Marsh, K., Hill, A. V. S., 1995. Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature*, 376:246-249.
- Ruwende, C. Y. R. I. L., & Hill, A., 1998. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria. *Journal of Molecular Medicine*, 76:581-588.
- Santos, R. C. S., & dos Santos, E. D. C., 2011. Malária: cobaias humanas no Amapá. *Estação Científica (UNIFAP)*, 1:143-150.
- Sasaki, R., Ikura, K., Sugimoto, E., & Chiba, H., 1975. Purification of Bisphosphoglyceromutase, 2, 3-Bisphosphoglycerate Phosphatase and Phosphoglyceromutase from Human Erythrocytes. *European Journal of Biochemistry*, 50:581-593.
- Saunders, M. A., Slatkin, M., Garner, C., Hammer, M. F., & Nachman, M. W., 2005. The extent of linkage disequilibrium caused by selection on G6PD in humans. *Genetics*, 171:1219-1229.
- Sheetz, M. P., & Casaly, J., 1980. 2, 3-Diphosphoglycerate and ATP dissociate erythrocyte membrane skeletons. *Journal of Biological Chemistry*, 255:9955-9960.

- Soares, I. D. S., & Rodrigues, M. M., 1998. Malaria vaccine: roadblocks & possible solutions. *Brazilian journal of medical & biological research*, 31: 317-332.
- Snow, R. W., Guerra, C. A., Noor, A. M., Myint, H. Y., & Hay, S. I., 2005. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 434: 214-217.
- Sonati, M. D. F., & Costa, F. F., 2008. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. *Jornal de Pediatria*, 84:S40-S51.
- Stuart, M. J., & Nagel, R. L., 2004. Sickle-cell disease. *The Lancet*, 364:1343-1360.
- Trager, W., & Jensen, J. B., 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193:673-675.
- Van Wijk, R., & van Solinge, W. W., 2005. The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. *Blood*, 106: 4034-4042.
- Valentini, G., Chiarelli, L. R., Fortin, R., Dolzan, M., Galizzi, A., Abraham, D. J., Wang, C., Bianchi, P., Zanella, A. & Mattevi, A., 2002. Structure and Function of Human Erythrocyte Pyruvate Kinase Molecular Basis of Nonspherocytic Hemolytic Anemia. *Journal of Biological Chemistry*, 277:23807-23814.
- Vythilingam, I., NoorAzian, Y. M., Huat, T. C., Jiram, A. I., Yusri, Y. M., Azahari, A. H., NorParina, I., NoorRain, A. & LokmanHakim, S., 2008. Plasmodium knowlesi in humans, macaques and mosquitoes in peninsular Malaysia. *Parasites & Vectors*, 1:1.
- Wang, C., Chiarelli, L. R., Bianchi, P., Abraham, D. J., Galizzi, A., Mattevi, A., Zanella, A., & Valentini, G., 2001. Human erythrocyte pyruvate kinase: characterization of the recombinant enzyme and a mutant form (R510Q) causing nonspherocytic hemolytic anemia. *Blood*, 98(10), 3113-3120.
- Warburg, O., & Christian, W., 1941. Isolierung und kristallisation des garungsferments enolase. *Naturwissenschaften*, 29:589-590.
- Weatherall, D. J., & Clegg, J. B., 2001. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organization*, 79:704-712.
- Weatherall, D. J., & Clegg, J. B., 2002. Genetic variability in response to infection: malaria and after. *Genes and immunity*, 3:331-337.
- Wellems, T. E., Hayton, K., & Fairhurst, R. M., 2009. The impact of malaria parasitism: from corpuscles to communities. *The Journal of clinical investigation*, 119: 2496-2505.
- WHO, G., 2009. WHO/MPS/09.10. *World Health*, 10: 12.

- Williams, T. N., 2006. Red blood cell defects & malaria. *Molecular & biochemical parasitology*, 149: 121-127.
- Williams, T. N., Maitland, K., Bennett, S., Ganczakowski, M., Peto, T. E. A., Newbold, C. I., Bowden, D. K., Weatherall, D. J. & Clegg, J. B., 1996. High incidence of malaria in α -thalassaemic children.
- World Health Organization, 2000. The world health report 2000: health systems: improving performance. *World Health Organization*.
- World Health Organization., 2007. *Cancer control: knowledge into action: WHO guide for effective programmes* (Vol. 2). World Health Organization.
- World Health Organization, 2008. World malaria report 2008. World Health Organization.
- World Health Organization 2010. Global tuberculosis control: WHO report 2010. *World Health Organization*.
- World Health Organization. World Malaria Report: 2011. WHO Press, Geneva, Switzerland, 2011.
http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/9789241564403_eng.pdf (acedido em 17 Julho 2012)
- World Malaria Report 2015. Geneva, *World Health Organization*.
- World Health Organization 2015.
- Zanella, A., & Bianchi, P., 2000. Red cell pyruvate kinase deficiency: from genetics to clinical manifestations. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 13:57-81.
- Zanella, A., Bianchi, P., Baronciani, L., Zappa, M., Bredi, E., Vercellati, C., ... & Sirchia, G., 1997. Molecular characterization of PK-LR gene in pyruvate kinase-deficient Italian patients. *Blood*, 89:3847-3852.
- Zanella, A., Fermo, E., Bianchi, P., & Valentini, G., 2005. Red cell pyruvate kinase deficiency: molecular and clinical aspects. *British journal of haematology*, 130: 11-25.
- Zanella, A., Fermo, E., Bianchi, P., Chiarelli, L. R., & Valentini, G., 2007. Pyruvate kinase deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood reviews*, 21:217-231.