

I. INTRODUÇÃO

A malária é a doença parasitária com mais impacto no mundo, estimando-se que ocorrem 247 milhões de casos clínicos anualmente, dos quais resultam aproximadamente 1 milhão de mortes, sendo a maioria destas verificadas em crianças com idade inferior a cinco anos (WHO, 2008). De acordo com Ayala *et al.*, (1998), o parasita da malária é um protozoário classificado como:

Reino Protista

Filo Apicomplexa

Classe Hematozoa

Ordem Haemosporida

Família Plasmodiidae

Género *Plasmodium*.

Existem algumas dezenas de plasmódios que afectam várias espécies de animais, mas apenas quatro provocam doença no humano, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale* (Gilles & Sinden, 2002).

Estas espécies diferem na duração do seu ciclo de vida, nas suas preferências por diferentes eritrócitos e nas suas potencialidades virulentas (Fortin *et al.*, 2002).

I. 1. *Plasmodium spp*

I.1.1. Ciclo de vida

O ciclo de transmissão das espécies de plasmódio que infectam humanos ocorre obrigatoriamente em duas fases: a fase sexual exógena (esporogónica) com a multiplicação do parasita nos mosquitos anofelinos (hospedeiro definitivo) e a fase assexual endógena (esquizogónica) com a multiplicação nos humanos (hospedeiro intermediário) (Knell, 1991). Esta última inclui a esquizogonia exoeritrocitária ou hepática, que ocorre nas células do fígado e a esquizogonia eritrocitária, que ocorre no sangue.

O ciclo inicia-se com a picada de um mosquito fêmea *Anopheles* infectado, através da qual há transmissão de parasitas na fase de esporozoíto (forma infectante para o homem) (Figura 1.A). Os parasitas localizados nas glândulas salivares passam para a circulação sanguínea dos humanos e através desta via atingem o fígado, onde invadem os hepatócitos (Figura 1.B), iniciando a esquizogonia exoeritrocitária ou hepática. Esta fase dura de 6 a 16 dias dependendo da espécie. Em *P. ovale* e *P. vivax*, alguns esporozoítos permanecem latentes nos hepatócitos, formando o hipnozoíto, que pode persistir durante períodos prolongados. Em determinado momento, estes desenvolvem-se e originam esquizontes pré-eritrocitários e posteriormente merozoítos que invadem os eritrócitos, originando os relapsos¹, característicos destas duas espécies. As espécies *P. falciparum* e o *P. malariae* não apresentam os relapsos, dado não se diferenciarem em hipnozoítos, sendo que os esporozoítos sofrem esquizogonia hepática imediata que, após maturação dos esquizontes hepáticos, resulta na libertação dos merozoítos para a corrente sanguínea, onde invadem eritrócitos (Figura 1.C).

Após a invasão dos eritrócitos pelos merozoítos, inicia-se a esquizogonia sanguínea ou intra-eritrocitária. Os merozoítos diferenciam-se até ao estadio de trofozoíto. Após um período de crescimento, os trofozoítos sofrem divisões mitóticas, ocorrendo a esquizogonia eritrocitária: o núcleo entra em divisão originando um esquizonte eritrocitário. Por segmentação do citoplasma formam-se novos merozoítos que se libertam com a ruptura do eritrócito, invadindo novos eritrócitos (Figura 1.D). Este ciclo ocorre de forma periódica, fazendo aumentar a parasitemia, sendo responsável pelos picos febris típicos da infecção de malária. Alguns merozoítos diferenciam-se nas formas sexuadas do parasita (infectante para o mosquito), denominadas gametócitos (Figura 1.E). Os gametócitos são ingeridos durante a refeição sanguínea de uma fêmea *Anopheles* (Figura 1.F) atingindo o seu estômago, local onde se diferenciam em micro e macrogâmetas. O gametócito feminino dá origem a um macrogâmeta enquanto o gametócito masculino dá origem a 4-8 microgâmetas, num processo denominado exflagelação. O produto da fecundação entre um gâmeta masculino e feminino, o zigoto, é a única forma diplóide do ciclo de vida e por meiose, que ocorre poucas horas após a sua fertilização formam-se formas haplóides. O zigoto

¹ Relapso: Nova manifestação da doença devido à sobrevivência de hipnozoítos no fígado.

formado inicialmente é globular e imóvel, transformando-se num oocineto móvel e invasivo que penetra as células epiteliais da parede do estômago do mosquito, fixando-se neste. Inicia-se aí o desenvolvimento do oocisto. O oocisto vai aumentando de tamanho, e divide-se por mitoses sucessivas originando inúmeros esporozoítos – formas alongadas (10-15 μ m) com um núcleo central. Quando o oocisto atinge um desenvolvimento completo, liberta os esporozoítos móveis que migram para as glândulas salivares, acumulando-se nos ductos salivares e tornando-se infectantes. Quando o mosquito infectado se alimenta novamente, os esporozoítos são inoculados na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado.

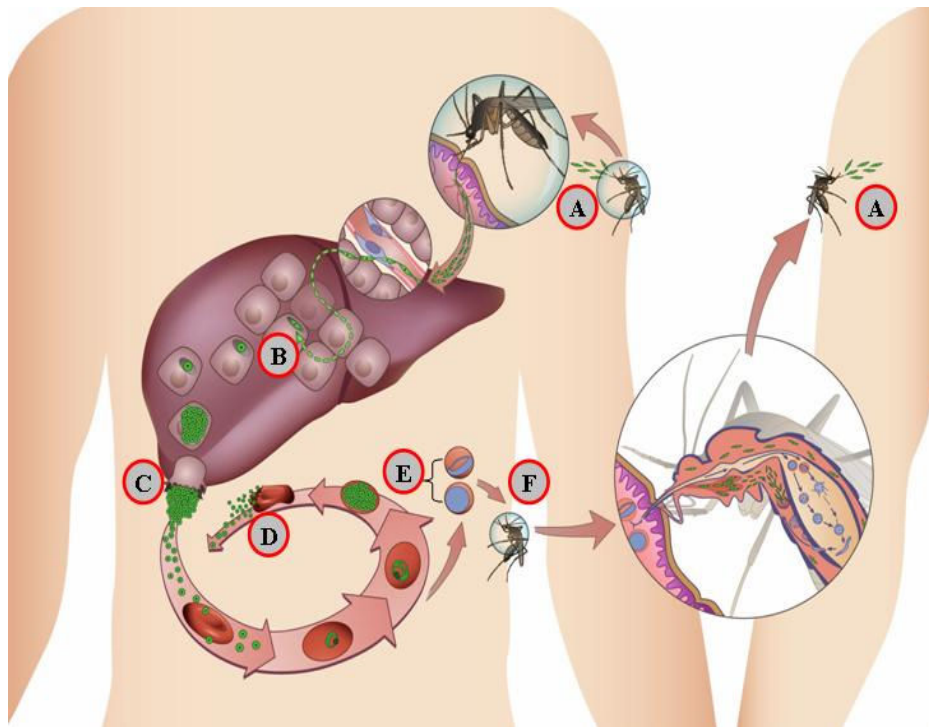


Figura 1. Ciclo de vida dos parasitas causadores da malária que infectam o homem (Adaptado de http://www.imm.ul.pt/html/Ciclo_Vida.bmp).

Em seguida, apresenta-se uma descrição das duas espécies estudadas no presente trabalho (*P. falciparum* e *P. vivax*), baseada em Gilles & Sinden (2002).

I.1.2. *Plasmodium falciparum*

O *P. falciparum* causa a “malária terçã maligna” e é a espécie mais patogénica, dado que a infecção ocorre muito rapidamente e pode existir a possibilidade de ocorrer complicações mortais sobretudo nos indivíduos não imunes, se não for tratada atempadamente e de forma adequada. Encontra-se geralmente nas regiões tropicais e subtropicais. O desenvolvimento assexuado do *P. falciparum* no fígado envolve apenas esquizogonia pré-eritrocitária, não ocorrendo hipnozoítos. Nos quatro dias de infecção, as primeiras formas visíveis no fígado são esquizontes com cerca de 30 µm de diâmetro. Os esquizontes maduros podem atingir 60 µm de diâmetro e originam cerca de 30 000 merozoítos. As várias fases assexuadas do ciclo eritrocitário (trofozoítos e esquizontes) não ocorrem no sangue periférico, excepto em casos muito graves. A forma de anel e os trofozoítos desenvolvidos desaparecem da circulação sanguínea periférica após 24 horas e são sequestrados nos capilares dos órgãos internos tais como: cérebro, coração, placenta, intestino ou baço, onde ocorre o seu desenvolvimento. Este sequestro deve-se ao fenómeno de citoaderência que implica interacções moleculares entre as células endoteliais e os eritrócitos infectados. Os eritrócitos infectados expressam *knobs*² à sua superfície, que vão favorecer a ligação ao endotélio capilar.

A densidade parasitária desta espécie atinge níveis mais elevados do que outras espécies, podendo exceder 30 000 parasitas por microlitro de sangue. A esquizogonia eritrocitária ocorre em 48 horas e o desenvolvimento de acessos febris é por vezes muito irregular.

O desenvolvimento de gametócitos ocorre nos órgãos internos, mas por vezes as formas jovens são visíveis no sangue periférico em casos graves com elevada parasitémia. Os gametócitos mais desenvolvidos normalmente aparecem 10 dias após a primeira invasão do sangue periférico. O número de gametócitos presentes na infecção varia entre 50 000 – 150 000 por microlitro de sangue. O mosquito ingere menos de 10 gametócitos por microlitro de sangue em cada indivíduo infectado (Gilles & Sinden, 2002).

² *Knobs*: Os eritrócitos parasitados com *P. falciparum* desenvolvem na sua superfície pequenas protuberâncias que são responsáveis pela aderência dos eritrócitos infectados ao endotélio dos capilares conhecidos como citoaderência.

O ciclo esporogónico nesta espécie será de 9-10 dias, para uma temperatura média de 28°C.

I.1.3. *Plasmodium vivax*

O *P. vivax* causa a “malária terça benigna”, pode ser encontrado em diversas zonas temperadas e em largas zonas das regiões tropicais, à excepção da região Africana, onde este parasita tem pouco representatividade.

Esta espécie, tal como *P. ovale* difere notavelmente da malária causada por outras espécies por apresentar hipnozoítos como foi referido anteriormente. A duração média da fase de esquizogonia pré-eritrócitária é de 8 dias e um esquizonte maduro pode originar cerca de 8 000 – 20 000 merozoítos.

Durante o desenvolvimento eritrócitário de *P. vivax*, todas as formas infectadas podem ser encontradas no sangue periférico e o glóbulo parasitado está nitidamente aumentado de volume à semelhança do que ocorre com *P. ovale*, ao contrário do que acontece na infecção pelas outras duas espécies de *Plasmodium* humano. A presença de granulações de Schuffner são bastante características e apenas surge na infecção desta espécie e *P. ovale*, sendo que neste último, o glóbulo parasitado mostra tendência a alongar-se, adquirindo uma forma oval e apresentando-se levemente franjado numa ou nas duas extremidades. Os trofozoítos jovens ou formas de anel desenvolvem-se rapidamente com tendência para mostrar formas amebóides. O esquizonte maduro contém uma média de 12-16 merozoítos. Cada merozoíto que invade os novos eritrócitos na fase assexuada do ciclo eritrocitário mede cerca de 1,5 µm de diâmetro. Este processo é repetido aproximadamente em 48 horas. A densidade parasitária desta espécie raramente excede 50 000 parasitas por microlitro de sangue.

Os acessos febris do ciclo assexuado têm uma periodicidade tipicamente terça, desenvolvendo-se os gametócitos no sangue periférico. Estes podem ser detectados pela primeira vez no sangue dentro de 3 dias depois de aparecimento de parasitas assexuais.

O ciclo esporogónico pode levar 16 dias para uma temperatura de 20°C e 8-10 dias para uma temperatura de 28°C; uma temperatura inferior a 15°C cessa o ciclo esporogónico.

I.2. Vector da malária – *Anopheles sp*

Existem cerca de 430 espécies pertencentes ao género *Anopheles* em todo o mundo, e em condições naturais, apenas 70 são considerados importantes vectores da malária (Service *et al.*, 2002). De acordo com Richards & Davies (1977) os mosquitos do género *Anopheles* apresentam a seguinte posição sistemática:

Reino Animalia

Filo Arthropoda

Classe Insecta

Subclasse Pterigota

Ordem Díptera

Subordem Nematocera

Família Culicidae

Subfamília Anophelinae

Género *Anopheles*

I.3. Epidemiologia da malária

I.3.1. Distribuição geográfica

Em 2008, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimava que a malária é endémica em 109 países em todo o mundo, abrangendo um total de 3,3 biliões de pessoas (WHO, 2008). A sua distribuição geográfica (Figura 2), incide sobretudo nas regiões tropicais e subtropicais. De acordo com Gilles e Snow (2002), *P. vivax* é a espécie mais dispersa, distribuindo-se, na maioria das zonas temperadas, podendo também ocorrer nas regiões subtropicais e mesmo nas regiões tropicais. *Plasmodium falciparum* é a espécie mais comum nos trópicos e subtropicais. *Plasmodium malariae* tem uma distribuição semelhante a *P. falciparum*, mas ocorre com menor frequência. *Plasmodium ovale* encontra-se principalmente na África tropical, ocasionalmente nas regiões do Pacífico Ocidental. Esta distribuição está associada com a intensidade de

transmissão dos parasitas da malária, que varia geograficamente de acordo com as espécies vectores *Anopheles*. Nas regiões áridas e nas regiões situadas a elevada altitude (> 1500 m), o número de casos de malária é habitualmente inferior ao registado em baixas altitude (< 1000 m) (Bloland, 2001), embora possam ocorrer epidemias.

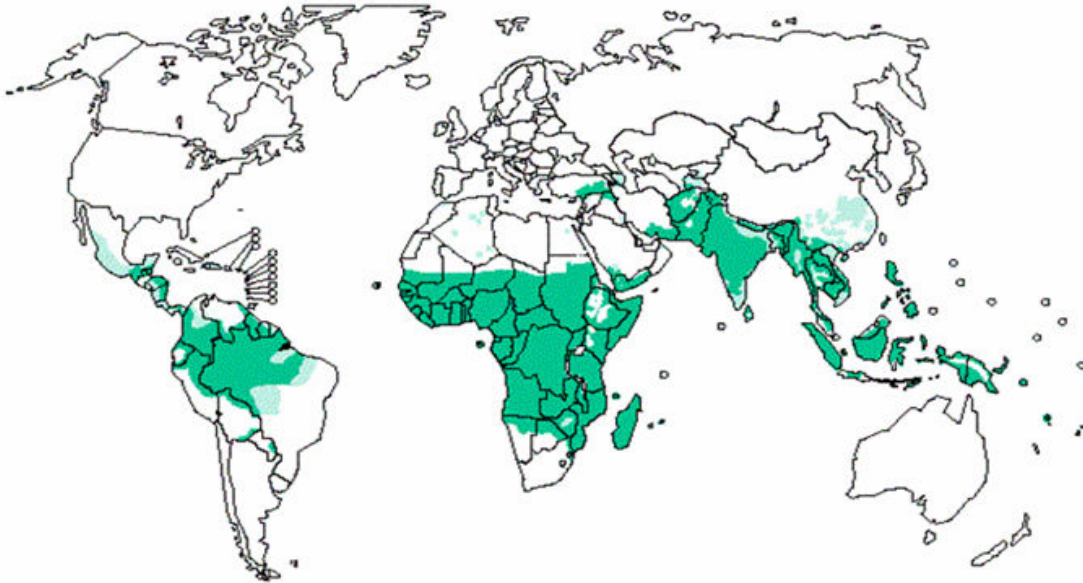


Figura 2. Mapa da distribuição geográfica da malária. ■: Áreas onde ocorre transmissão de malária; ■: Áreas com risco limitado; □: Áreas sem malária (adaptado de <http://www.nathnac.org/travel/factsheets/images/map.gif>)

I.3.2. Factores de transmissão

As características epidemiológicas da malária resultam de complexas interacções entre o homem, o mosquito e o ambiente. O homem tem o seu papel de hospedeiro vertebrado do parasita e de agente de infecção. O mosquito *Anopheles* é o hospedeiro invertebrado e o agente de transmissão. O desenvolvimento do parasita da malária no mosquito está muito dependente das condições ambientais, temperatura e humidade. As condições óptimas para a formação de esporozoítos são entre 25°C - 35°C com humidade superior a 60°C e cessa quando a temperatura é inferior a 16°C (Gilles & Snow, 2002). As chuvas facilitam a criação de mosquitos, uma vez que levam a formação de pequenas colecções de água utilizadas como locais de postura. As alterações ambientais provocadas pelo homem, como projectos agrícolas, sistema de irrigação, desflorestação, construção de estradas e outras infra-estruturas, facilitam a disseminação da infecção ao criar locais de postura ou possibilitar um maior contacto entre o homem e o mosquito (Gilles & Snow, 2002). As condições sociais e/ou económicas e migrações em massa de populações não imunes para áreas geográficas endémicas são também factores muito importantes para a epidemiologia da malária (Bloland, 2001).

I.3.3. Classificação da endemicidade

O termo endemicidade refere-se geralmente ao grau de prevalência, a gravidade e a intensidade de transmissão da malária numa dada região (Russell *et al.*, 1963; Gilles & Snow, 2002).

A transmissão de malária depende: a) da infecção no homem b) no mosquito vector e c) na biologia do parasita em ambos hospedeiros (Knell, 1991). O grau de endemicidade é geralmente estimado com base em métodos quantitativos, quer no mosquito vector quer nas populações humanas. O grau de transmissão no mosquito vector é estimado através da: 1) Taxa Entomológica de Inoculação (TEI) que exprime o número (médio) de picadas potencialmente infectantes de um dado vector, por pessoa e por dia. Trata-se, em princípio, de uma taxa diária mas pode ser expressa cumulativamente, em relação ao mês (mensal) ou ano (anual). No caso da malária, será

dada pelo produto da Taxa de Agressividade do vector para o homem e pelo seu Índice Esporozoítico, definindo-se este como a proporção das fêmeas de um vector que apresenta esporozoítos nas glândulas salivares 2) Capacidade Vectorial (CV), dá-nos o número de novas inoculações de esporozoítos (potencialmente infectantes) que a população local de uma dada espécie de anofelíneo é capaz de produzir a partir de um único doente e num só dia. O seu valor varia entre zero e cerca de duas centenas. Estima-se em função das seguintes variáveis: a) Índice de Antropofilia (IA) é a proporção das fêmeas com sangue fresco, em repouso, que se alimentaram no homem (valor varia entre zero e 0,99). b) Frequência Diária de Picada (f) é dada pelo inverso do número de dias do ciclo gonotrófico. Assim, a frequência diária de picada varia também entre os limites $0.25 \leq f \leq 0.5$. c) Agressividade para o homem (*man biting habit*) que é o número de picadas infligidas ao homem por cada fêmea do vector por dia, sendo igual ao produto das duas variáveis anteriores: $a = IA \times f$

Quanto ao grau de endemicidade na população humana de uma dada região, este tem sido quantificado com base na Taxa Parasitária no sangue periférico (proporção de indivíduos infectados com *Plasmodium* numa população) e no Índice Esplénico (proporção de indivíduos com baço hipertrofiado numa população - o aumento de tamanho de baço está associado a uma maior exposição à infecção). Com base nestes dois tipos de índices em crianças dos 2 aos 9 anos, Gilles e Snow (2002) estabeleceram um sistema de classificação do nível de endemicidade da malária de uma dada região (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação da endemicidade da malária com base no Índice Esplênico (aumento do baço) ou da Taxa Parasitária em crianças dos 2 aos 9 anos de idade. (Adaptado de Gilles & Snow, 2002).

| Tipo | Índice esplênico | Taxa parasitária | Descrição |
|---------------|--|--|--|
| Hipoendêmica | Não excede os 10% | Não excede os 10%, pode ser mais elevada numa parte anual. | Áreas onde existe pouca transmissão e os efeitos, num ano normal, sobre a generalidade da população são pouco importantes |
| Mesoendêmica | Entre 11 e 50% | Entre 11 e 50% | Típico das comunidades rurais em zonas subtropicais onde o risco de transmissão existe |
| Hiperendêmica | Constante > 50%, também elevado em adultos (> 25%) | Constante > 50%. | Áreas onde a transmissão é intensa mas sazonal onde a imunidade é insuficiente em todas as faixas etárias |
| Holoendêmica | Constante > 75%, mas baixo em adultos | Constante > 75% em crianças com 0-11 meses | Transmissão perene, intensa, resultando num considerável grau de imunidade com a exceção das crianças |

Existem também outros parâmetros que são utilizados para medir a ocorrência da doença: a prevalência (número de casos que existem numa determinada população, numa dada ocasião - expressa em percentagem) e a incidência (número de novos casos que ocorre numa população num determinado período de tempo - expressa em percentagem) (Knell, 1991).

A malária numa dada região pode ser classificada como epidémica quando ocorre um aumento súbito, ocasional ou por vezes periódico, da incidência de casos e por outro lado, é classificada como endémica quando existe uma incidência constante de casos por períodos de anos sucessivos.

De acordo com a transmissão, a malária diz-se estável quando o nível de transmissão é intenso e constante, com flutuações pouco acentuadas de ano para ano; a transmissão é contínua mesmo que realizada por poucos vectores. Os níveis de

imunidade são elevados devido a inoculações intensas e constantes. Por outro lado é instável, quando a transmissão não é constante, sofrendo variações de ano para ano. A aquisição da imunidade na população é mais baixa, podendo ocasionar epidemias.

A malária pode ser ainda designada por autóctone, quando é contraída localmente; importada, quando é adquirida fora da zona onde é diagnosticada; induzida, quando é contraída de forma acidental/deliberado através de sangue contaminado e ainda pode ser considerada como uma doença introduzida, quando resulta um caso secundário da transmissão local a partir duma fonte de infecção importada.

I.4. Controlo da Malária

A eficácia no controlo dos mosquitos após a descoberta do DDT em 1939 gerou o optimismo de que a malária poderia ser eliminada. Em 1955, a OMS (Organização Mundial de Saúde) lançou a campanha da erradicação através da implementação de extensos programas de pulverizações com DDT (*Dicloro Defenil Tricloroetano*) em áreas endémicas de malária por todo o mundo. Em algumas regiões a malária tinha sido erradicada com sucesso, mas o programa foi implantado apenas até 1969 por se ter reconhecido que a erradicação global não seria atingida (Wellems *et al.*, 2001). No entanto, esta doença que parecia até 2001 encontrar-se em expansão (Bloland, 2001), hoje, perante a situação da malária nas regiões tropicais e as suas consequências ao nível mundial, durante o período de 2001 à 2006, a OMS conduziu uma actualização em grande escala para os problemas do controlo a malária. A estratégia realça a importância do conhecimento e a especificidade epidemiológica da malária de cada país, região e mundial (WHO, 2008).

Em 2005, a Assembleia Mundial de Saúde (AMS), desenvolveu sucessivamente o combate a malária com o objectivo de atingir a cobertura de 80% da população em risco de malária através de quatro intervenções chaves, tais como: redes impregnadas com insecticidas, fármacos apropriados para pessoas com malária confirmada (associação terapêutica à base Artemisinina), pulverizações intra-domiciliárias e tratamento preventivo periódico para mulheres grávidas (WHO, 2008). A implementação do plano tem mostrado resultados interessantes. De facto, os estudos recentes realizados na Gambia (Ceesay *et al.*, 2008), no Quénia (Fegan *et al.*, 2008;

O'Meara *et al.*, 2008) e na Eritreia, Ruanda, São Tomé e Príncipe, Madagáscar, Zâmbia, Tanzânia; Ásia - Cambodja, Laos, Filipinas, Suriname, Tailândia e Vietname, mostram uma diminuição drástica no número de casos clínicos e mortes devidos à malária (WHO, 2008). No entanto, estes dados tem gerado algumas controvérsias no assunto dado que a maior parte das pessoas nas regiões endémicas não existem um verdadeiro conhecimento do impacto real que malária tem sobre a saúde pública. Alguns autores dizem que estes números resultam apenas sub-notificação, uma vez que, a maior parte das avaliações epidemiológicas são ainda retrospectivas, e os sistemas de informação são inoperantes.

A deterioração do controlo mundial da malária, pode ter sido devida fundamentalmente a dois factores: por um lado a falência do controlo dos vectores e por outro lado o aparecimento de estirpes de plasmódios resistentes aos antimaláricos (Garin *et al.*, 1991). A resistência do mosquito à alguns dos insecticidas usados está já documentada (Chandre *et al.*, 1999; Collins *et al.*, 2000). Por outro lado a rápida expansão geográfica de resistência do parasita aos antimaláricos, especialmente à cloroquina, tornou-se um problema crucial para a saúde pública, tendo sido o termo “erradicação” substituído pelo termo “controlo” (WHO, 1985). Em todos os países endémicos onde *P. falciparum* e *P. vivax* co-existem e são transmitidos pela mesma espécie de vector, o programa de controlo e sua implementação, inclui várias medidas de controlo baseadas no conhecimento da transmissão de *P. falciparum*. No entanto, estas medidas podem não ser eficazes para o controlo de *P. vivax* (Sattabongkot *et al.*, 2004). O controlo desta espécie tem-se agravado por várias razões tais como: falta dos fármacos disponíveis contra os hipnozoítos nos hospitais/clínicas/comunidades na maior parte das regiões endémicas, diferentes regimes terapêuticos, falta de vigilância/monitorização da eficácia dos fármacos no tratamento dos hipnozoítos e a prevalência dos casos assintomáticos entre as populações semi imunes.

O controlo da malária deveria assentar, idealmente, numa vacina antimalárica. Isto porém, poderá não ser facilmente alcançável, devido a diversas dificuldades do foro não só da biologia do próprio parasita mas também aos níveis financeiro e logístico, incluindo as dificuldades de implementação. A complexidade do ciclo de vida dos plasmódios, quer no homem, quer no vector, e dos fenómenos biológicos a ele associados, tornam extraordinariamente difícil obter uma vacina. Os estudos que

permitiram o desenvolvimento de vários tipos de vacina usando esporozóitos, merozóitos eritrocitários ou gametócitos, são notáveis, uma vez que cada um deles induz uma protecção eficaz, específica de estágio e temporária contra a espécie de parasita homóloga, em vários hospedeiros.

Contudo, nenhum destes métodos poderá servir como uma via prática de imunização contra a malária, pelo menos por enquanto.

Os factores sociais, como a localização de tipo de habitações e o uso de repelentes, mosquiteiros e actividades profissionais influenciam o risco de contrair malária. A sua identificação poderá contribuir para estabelecer medidas de controlo locais mais apropriadas (Greenwood, 1999). Outro factor importante para o controlo da malária é o diagnóstico precoce e uma terapêutica correcta e eficaz. Além disso, em várias áreas endémicas, o acesso à saúde pública é limitado e quando é acessível, por vezes o pessoal de saúde tem baixo nível de formação e existe falta de apoio/equipamento (Bloland, 2001).

I.5. Antimaláricos

Os antimaláricos podem ser classificados segundo dois critérios: (I) com base na susceptibilidade e local de acção do ciclo evolutivo do plasmódio; (II) com base na sua estrutura química e/ou no principal mecanismo de acção (Tabela 2).

I. Tipo de acção

Tendo em conta o estágio do ciclo de vida do parasita no qual actuam e a sua valorização terapêutica, os fármacos antimaláricos são classificados como:

1. Esquizonticidas tecidulares: fármacos que actuam sobre as formas assexuadas dos parasitas nos tecidos. Podem ser: 1) usados como agente profilático causal: actua sobre as formas teciduais primárias ou formas exoeritrocitárias primárias, prevenindo a invasão de novos eritrócitos e 2) usado como fármaco anti relapso: actua sobre formas exoeritrocitárias ou formas teciduais de *P. vivax* e *P. ovale*, sendo capazes de levar à cura radical.

2. Esquizonticidas sanguíneos: fármacos que actuam por inibição do desenvolvimento e destruição das formas assexuadas dos parasitas na corrente sanguínea (fase eritrocitária) sendo, de um modo geral, utilizados com fins curativos.
3. Gametocitocida: fármaco que destrói todas as formas sexuadas do parasita, também actua na fase de desenvolvimento do parasita nos mosquitos (Bruce-Chwatt *et al.*, 1981).
4. Esporontocida: Fármaco que actua indirectamente sobre as formas esporogónicas no mosquito através de transformações nos gametócitos (prevenindo ou inibindo a formação de oocistos and esporozoítos) (Bruce-Chwatt *et al.*, 1981).

II. Estrutura Química

Segundo a sua classificação (estrutura química), os antimaláricos podem ser divididos em três grupos: um referente ao grupo dos compostos antifolatos, outro referente aos compostos quinoleínicos e por último, o grupo da artemisinina e seus derivados (Olliaro, 1999; revisto por Delfino *et al.*, 2002), sendo os mais utilizados os compostos quinoleínas e antifolatos, devido ao facto de se apresentarem como relativamente acessíveis, fáceis de distribuir e eficazes.

Tabela 2. Actuação dos fármacos de acordo com classes de antimaláricos em diferentes estágios do ciclo de vida de *P. falciparum* (adaptado de Bruce-Chwatt *et al.*, 1981).

| Classe | Nome | Estrutura Química | Eficácia |
|--------------|--------------|--|--|
| Quinoleínas | QUIN | quinoleinometanóis | Esquizonticida sanguínea, Gametocitocida ^a |
| | AQ | 4-aminoquinolinas | Esquizonticida sanguínea |
| | CQ | 4-aminoquinolinas | Esquizonticida sanguínea |
| | HAL | 4-quinoleinometanóis | Esquizonticida sanguínea |
| | MEF | 4-quinoleinometanóis | Esquizonticida sanguínea |
| | PRIM | 8-aminoquinoleínas | Esquizonticida tecidual ^b , Gametocitocida, Esporontocida |
| Antifolatos | PYR | 2,4-diaminopirimidina | Esquizonticida sanguínea, Esporontocida. |
| | PG | derivados de biguanida | Esquizonticida sanguínea, Esporontocida |
| | SDX | Sulfonamida | Esquizonticida sanguínea |
| Artemisinina | Artemisinina | Lactona sesquiterpénica | Esquizonticida sanguínea |
| e Derivados | Artesunato | Sal sódico do semi-éster de ácido succínico da desidroartemisinina | Gametocitocida |
| | | Artemeter | Metil-éter da dihidroartemisinina |

QUIN, Quinino; AQ, Amodiaquina; CQ, Cloroquina; HAL, Halofantrina; MEF, Mefloquina; PRIM, Primaquina; Pyr, Pirimetamina; PG, Proguanil; SDX, Sulfadoxina. ^a Eficaz como gametocitocida de *P. vivax*, *P. malarie* e *P. ovale*; ^b Eficaz como esquizonticida tecidual de *P. vivax* e *P. ovale*.

I.5.1. A Resistência aos Antimaláricos

Com a falta de uma vacina eficaz, o controlo da malária tem sido baseado principalmente no controlo do mosquito vector através do uso de redes mosquiteiras impregnadas com insecticidas ou por pulverização intra-domiciliária (prevenção de contactos entre humanos e mosquitos) e o recurso de diversos fármacos antimaláricos tanto para cura como para profilaxia. No entanto, o surgimento e propagação de parasitas resistentes nas últimas décadas, tornou-se um dos maiores obstáculos para o eficaz controlo da malária (WHO, 2001a). A resistência é definida pela OMS como “a capacidade que uma estirpe parasitária tem de sobreviver e/ou multiplicar-se apesar de administração e absorção de um dado fármaco, em doses iguais ou maiores às habitualmente recomendadas, mas dentro dos limites de tolerância do indivíduo” (Bloland, 2001).

A quimio-resistência em malária pode depender de vários factores, incluindo as características do próprio fármaco, do hospedeiro humano, do parasita e, ainda do vector e factores ambientais (Wongsrichanalai *et al.*, 2002).

Nas características associadas ao agente antimalárico, podemos referir: 1) o número e tipo limitado de fármacos, conduzindo a monoterapia e a administração indevida e/ou inadequada de fármacos o que permite o aumento da selecção de parasitas resistentes com a pressão de fármacos, (Onori, 1986; Payne, 1988), 2) a resistência cruzada entre fármacos da mesma classe (quimicamente semelhantes), permite que a resistência a um deles facilite o desenvolvimento de resistência ao outro antimalárico (Hall *et al.*, 1975; Basco *et al.*, 1991) e 3) as combinações de fármacos com tempos de semi-vida diferentes também pode seleccionar parasitas resistentes, durante o período em que um dos fármacos já foi completamente eliminado (Watkins *et al.*, 1993; Wongsrichanalai *et al.*, 2002).

Na população hospedeira, a quimio-resistência depende do estado imunitário e má nutrição (Cravo *et al.*, 2001, 2002). O sistema imunitário tem o seu papel na eliminação da parasitémia residual após o tratamento. A má nutrição e outras infecções concomitantes favorecem a imunodepressão, aumentando a probabilidade de sobrevivência dos parasitas não eliminados pelo fármaco (Djimde *et al.*, 2003; White, 1997). Além disso, a resistência tem mais probabilidade de aparecer, alastrando-se

também mais facilmente, em populações com uma imunidade reduzida, especialmente em áreas onde não estejam a ser implementadas medidas de controlo vectorial adequadas.

A nível do parasita, a resistência surge quando um ou mais indivíduos constituintes de uma população parasitária possuem uma ou mais mutações que lhe proporcionam uma vantagem selectiva na presença de concentrações de fármaco que em condições normais inibiriam a proliferação da fracção sensível da população parasitária (Peters, 1990; Hasting & D'Alessandro, 2000).

Por último, também se apontam o vector e os factores ambientais pois podem influenciar a proliferação dos parasitas resistentes. Por exemplo, os parasitas resistentes podem ter uma vantagem adaptativa para a reprodução em certos mosquitos *Anopheles* em relação a parasitas portadores do alelo selvagem (Wernsdorfer, 1994).

1.5.2. Epidemiologia e Distribuição da resistência

Nesta secção, serão abordados a epidemiologia e a distribuição de resistência dos antimaláricos a nível mundial representada na Figura 3, descrevendo sobretudo a situação em *P. falciparum* e *P. vivax* de acordo o estudo deste trabalho.

A resistência de *P. falciparum* à cloroquina tem sido relatada em todas as regiões do Sudeste Asiático onde a malária é endémica (Wernsdorfer & Payne, 1991; WHO, 2001a,b). As primeiras observações surgiram no final dos anos 50 na região fronteiriça da Tailândia com o Camboja e, simultaneamente, na Colômbia, mais tarde, na África em 1978 (Harinasuta *et al.*, 1962, 1965; Wongsrichanalai *et al.*, 2002). A larga utilização deste fármaco no combate a malária, contribuiu para a ampla distribuição da resistência em diversas áreas geográficas (Peters, 1987). Actualmente, todas as regiões onde a malária é endémica apresentam parasitas resistentes à cloroquina (Su *et al.*, 1997; Satyanarayana *et al.*, 1991). Sendo assim, este fármaco é ainda utilizado mas apenas para o tratamento de infecção por *P. vivax* (Congpoung *et al.*, 2002; Tasnor *et al.*, 2006).

No caso da resistência à amodiaquina, tem-se verificado que em algumas regiões onde existem elevados níveis de resistência à cloroquina, a eficácia terapêutica da amodiaquina pode ser reduzida (Ochong *et al.*, 2003).

O quinino é o fármaco mais antigo, foi introduzido como fármaco eficaz no tratamento da malária no início do século XVII (Na-Bangchang *et al.*, 2007), mas até à data a resistência a este composto parece não ter sofrido grande propagação. Os primeiros registos de suposta resistência de *P. falciparum* ao quinino surgiram em 1910 (Bjorkman *et al.*, 1990). Nos últimos anos, a sua eficácia tem vindo a reduzir-se e ocorrem alguns casos pontuais de resistência em várias regiões do Sudeste Asiático e Brasil, não sendo no entanto ainda considerado um problema mundial (Bunnang, 1980; Mesnick, 1997; Na-Bangchang *et al.*, 2007)

A mefloquina foi produzida durante os anos 70, como alternativa aos antimaláricos existentes. No entanto, no início dos anos 80 (Bjorkman *et al.*, 1990), surgiram pela primeira vez alguns casos de resistência a este fármaco na Tailândia (Boudreau *et al.*, 1982; Harinasuta *et al.*, 1983). Actualmente é já bastante frequente no Sudeste Asiático, sendo este facto não apenas pela pressão selectiva do próprio fármaco mas também pela influência do uso de outros fármacos quimicamente relacionados nomeadamente o quinino, muito utilizado antes da introdução de mefloquina (Wernsdorfer, 1994). Em África, a resistência a este fármaco surge ainda de forma esporádica (Mockenhaupt, 1995).

A combinação sulfadoxina – pirimetamina (SP) foi a primeira associação de fármacos com características antimaláricas, considerada como opção de primeira linha, tendo sido introduzida para o tratamento de *P. falciparum* durante os anos 60. Rapidamente, no entanto, surgiram relatos de resistência na região fronteiriça da Tailândia com o Camboja (Malikul, 1988; Bjorkman *et al.*, 1990; Wernsdorfer, 1994). Actualmente existem já elevados níveis de resistência em toda a região do Sudeste Asiático e na Amazónia (Guarda *et al.*, 1999; Wongsrichanalai *et al.*, 2002). Em África, a incidência da resistência à sulfadoxina – pirimetamina (SP) está em expansão, com o aumento da utilização dos mesmos. No entanto, em 1994, foram já registados elevadas níveis de resistência à SP, em crianças na Tanzânia (Ronn *et al.*, 1996).

No caso do *P. vivax*, os primeiros relatos de resistência à cloroquina surgiram por volta de 1989 na Papua Nova Guiné e muito recentemente na América Central e Sul, incluindo Guyana (Schuurkamp *et al.*, 1989; Djapa *et al.*, 2007), na Indonésia (Baird *et al.*, 1991; Schwartz *et al.*, 1991), Tailândia e Birmânia (Myat *et al.*, 1993; Tan-ariya *et al.*, 1995), subcontinente Indiana (Dua *et al.*, 1996; Garg *et al.*, 1995).

Actualmente, a região do globo mais afectada pela resistência do *P. vivax* à cloroquina é o Sudeste Asiático (Rieckman, 1989; Baird *et al.*, 1991; Malar-Than *et al.*, 1995), com relatos de casos esporádicos em algumas das regiões da Ásia e América do Sul (Na-Bangchang *et al.*, 2007).

O *P. vivax* desenvolveu também resistência à sulfadoxina-pirimetamina em muitos dos países endêmicos onde foram adaptados como antimaláricos de primeira linha de tratamento. Actualmente, foram registados várias falhas terapêuticas em pacientes infectados com *P. vivax* no Sudeste Asiático e na América do Sul, onde a malária desta espécie é endêmica (Imwong *et al.*, 2001; Plowe *et al.*, 2007; Tjitra *et al.*, 2002; Picot *et al.*, 2005).

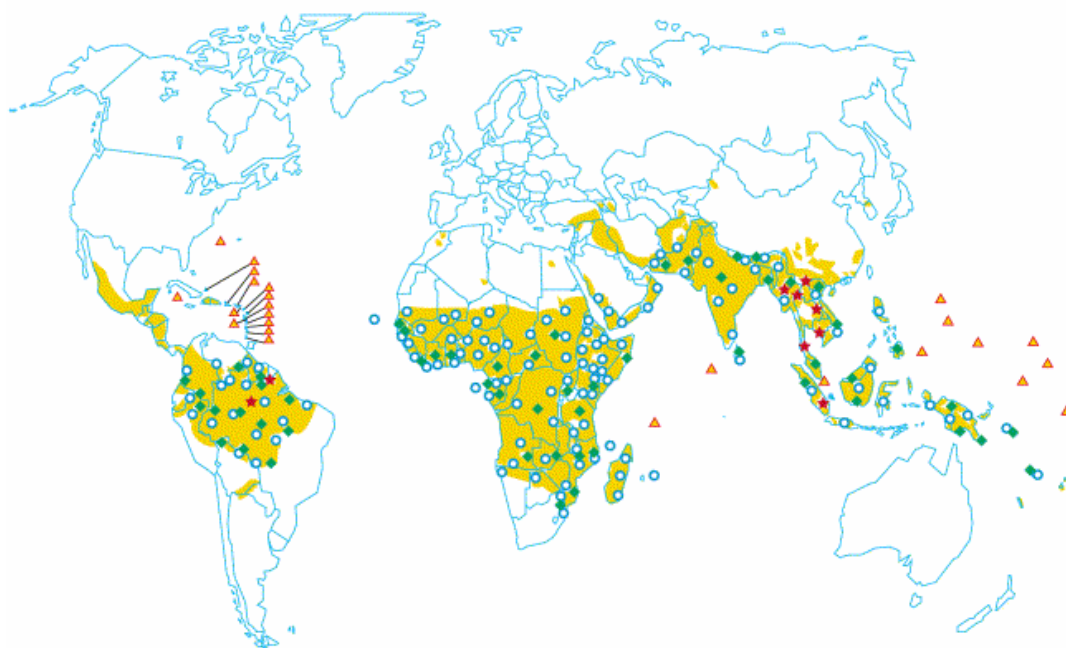


Figura 3. Mapa da distribuição geográfica da resistência de *P. falciparum* aos antimaláricos (adaptado de Wongsrichanalai *et al.*, 2002). ○: Resistência à cloroquina; ■: Resistência à sulfadoxina-pirimetamina; ★: Multiresistência; ▲: Áreas sem malária; ■: Áreas em risco da malária.

I.5.3. Multiresistência

A multiresistência de *P. falciparum* é definida como fenótipo de resistência a dois ou mais fármacos de classes quimicamente diferentes (Wernsdorfer, 1994; Wongsrichanalai *et al.*, 2002). A resistência a vários antimaláricos em simultâneo resulta da utilização frequente e simultânea dos mesmos, provocando uma pressão selectiva que culmina no aparecimento deste fenómeno de multi-resistência. A resistência cruzada entre antimaláricos está relacionada com os aspectos comuns dos seus mecanismos de acção, bem como dos mecanismos de resistência que lhes estão associados (Le Bras & Durand, 2003). Actualmente, a região mais afectada é o Sudeste Asiático, principalmente na Tailândia, Myanmar e Camboja, a multiresistência de *P. falciparum* aos fármacos refere-se a quase todas as drogas disponíveis inclusive a resistência à cloroquina, à sulfadoxina – pirimetamina e à mefloquina; a eficácia do quinino tem-se reduzido também progressivamente (Na-Bangchang *et al.*, 2007).

De forma a combater o fenómeno de resistência e obter melhores resultados no tratamento, a OMS recomendou o uso da associação terapêutica à base de artemisinina (ATC) e seus derivados, apesar de serem em média dez vezes mais dispendiosas do que os fármacos tradicionais (WHO, 2001b). As vantagens das combinações terapêuticas com base dos derivados da artemisinina estão relacionadas com o modo de acção e propriedade única desta classe, tais como: rápida e redução significativa da parasitémia, rápido desaparecimento dos sintomas clínicos, eficácia contra estirpes de *P. falciparum* multi-resistentes, redução o transporte de gametócitos (o que reduz a transmissão) (WHO, 2001b).

Curiosamente, muito recentemente publicaram os primeiros relatos de resistência à artinsiminina no Camboja (Enserink, 2008). Este fenómeno constitui um desastre global, com graves repercussões no controlo da malária, uma vez que actualmente a associação terapêutica à base artemisinina considerada como alternativa no tratamento aos parasitas resistentes.

I.5.4. Marcadores moleculares de resistência em *P. falciparum* e *P. vivax*

A monitorização da prevalência de parasitas resistentes a um determinado composto ou fármaco, a nível regional e individual é um factor determinante no controlo da malária. Os métodos tradicionais de avaliação da sensibilidade do parasita a antimaláricos baseiam-se sobretudo em testes *in vivo* e/ou *in vitro*. Nas últimas décadas os marcadores moleculares de resistência têm sido utilizados como uma prioridade de investigação científica em malária sobretudo na vigilância dos fármacos.

Os marcadores moleculares para a quimio-resistência da malária baseiam-se nas mutações em determinados genes que conferem a resistência do parasita ao fármaco utilizado no tratamento. Assim, a informação dos marcadores moleculares de resistência poderá ser aplicado como ferramenta na monitorização do aparecimento e a propagação da quimio-resistência em populações naturais e permitindo assim a possibilidade de modificar os esquemas terapêuticos e/ou profiláticos em uso numa determinada região. O resultado de um estudo, efectuado no Mali (Djimde *et al.*, 2001), serviu inclusivamente para que a politica terapêutica da malária fosse reajustada naquele país, realçando assim a importância prática da utilização da informação molecular no controlo da malária.

De seguida, apresenta-se informação sobre os marcadores genéticos de resistência associados aos compostos mais utilizados no combate ao *P. falciparum* e *P. vivax* (resumido na Tabela 3).

Tabela 3. Marcadores moleculares de resistência em *P. falciparum* e *P. vivax* e sua associação com resistência clínica (*in vivo*).

| Espécies | Fármaco Resistente | Marcador |
|----------------------|--|--|
| <i>P. falciparum</i> | CQ | <i>crt</i> K76T^a |
| | AQ, MEF [*] , QUIN [*] e HAL [*] | <i>mdr1</i> N86Y ^b ; Y184F ^b , S1034C ^b , N1042D ^b , D1246Y ^b <i>mdr1</i> * (Números de copia>1) |
| | PYR | <i>dhfr</i> S108N/T^c , N51I e C59R |
| | SDX | <i>dhps</i> S436A/F, A437G^c , K540E, A581G, A613S/T |
| <i>P. vivax</i> | PYR | <i>dhfr</i> I13L, P33L, F57L, S58R, S117N/T^d , I173F/L |
| | SDX | <i>dhps</i> A383G^d , A553G |
| | CQ | Não identificado |

^a Bastante elevada; ^b Ocasional; ^c Elevada (108N/T e 437G, essencial para a resistência à pirimetamina e sulfadoxina, respectivamente. Outras mutações aumentam resistência); ^d Elevada (117N/T e 383G, essencial para a resistência à pirimetamina e sulfadoxina, respectivamente. Outras mutações aumentam resistência).

I.6. Modo de acção e mecanismo de resistência aos antimaláricos

Tendo por base o objecto do estudo deste trabalho, serão seguidamente abordados os modos de acção e mecanismos de resistência aos antimaláricos, destacando nomeadamente o grupo das quinoleínas e dos antifolatos, devido à frequência do seu uso em Timor Leste.

I.6.1. Cloroquina

A cloroquina foi descoberta nos anos 30s e sintetizada na Alemanha durante a segunda guerra Mundial. Foi introduzida em todas as regiões endémicas e tornou-se como o principal fármaco mais utilizado com sucesso. Este sucesso baseia-se na sua eficácia contra as formas eritrocitárias de *P. falciparum*, uso fácil, baixa custo e com

poucos efeitos secundários (Bickii *et al.*, 1988; Ginsburg *et al.*, 1999a; Cravo *et al.*, 2002; Hasting *et al.*, 2002).

O modo de acção da cloroquina baseia-se na interferência com a destoxificação do grupo hemo que é produzida durante a digestão da hemoglobina, levando à sua acumulação na forma livre, em concentrações elevadas, o que provoca a morte do parasita (Ginsburg *et al.*, 1999b). Esta acumulação deve-se ao facto de, como base fraca e diprotonada que é, a cloroquina difundir-se nas vesículas ácidas dentro do vacúolo digestivo do parasita em condições fisiológicas normais (Yayon *et al.*, 1984).

Têm sido propostas várias teorias, no sentido de explicar os mecanismos de acção da cloroquina incluindo a inibição de síntese das proteínas (Surolia & Padmanaban, 1991) e inibição de síntese da DNA e RNA (Cohen & Yielding, 1965; Meshick, 1990), embora estas explicações parecem improváveis desde que as concentrações de droga requerida para o efeito letal no parasita podem ser muito elevadas relativamente aos observados “*in vivo*” (Cravo *et al.*, 2006). No entanto, admite-se que o mecanismo de actuação da cloroquina envolva 1) a inibição da detoxificação do grupo hemo no vacúolo digestivo, evitando a formação de hemozoína por se ligar ao grupo hemo, permitindo que este fique livre e tóxico para o parasita e, 2) o grupo hemo não polimerizado, ou seja livre, sai do vacúolo digestivo para o citoplasma onde a cloroquina inibe a sua degradação via GSH, por inibição competitiva, permitindo que o grupo hemo se acumule nas membranas permeabilizando-as a catiões ou se ligue a proteínas conduzindo à morte do parasita (Ginsburg *et al.*, 1999b). Os estudos efectuados por outros autores (Figura 4) mostram que a cloroquina actua pela formação de complexos com o hemo (FP-IX), bloqueando a formação de hemozoína e/ou a degradação do hemo pelo glutatião (GSH), provocando o stress oxidativo (Loria *et al.*, 1999) que pode conduzir o peróxido da membrana lipídica do parasita, degradação do DNA, oxidação proteica e originando a morte do parasita (Kumar *et al.*, 2007). Desta forma, pensa-se que a cloroquina actua por inibição funcional de uma ou mais das enzimas envolvidas neste processo, impedindo assim a destoxificação da FP-IX e originando a morte do parasita (Ginsburg *et al.*, 1999b).

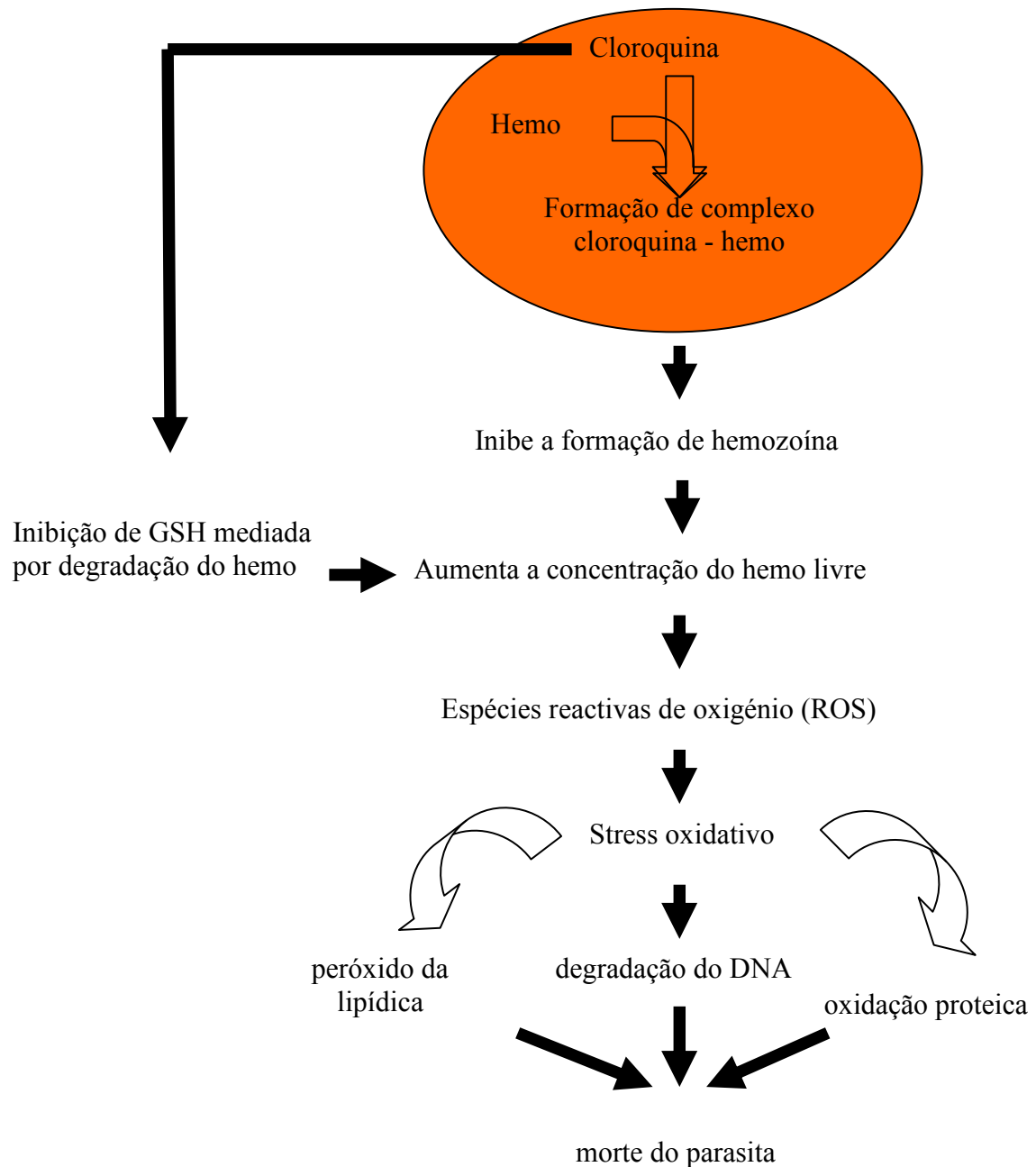


Figura 4. Esquema representativo do mecanismo de acção da cloroquina (Adaptado de Kumar *et al.*, 2007).

Em relação ao mecanismo de resistência, sabe-se que a cloroquina actua pela formação de complexos com o hemo inibindo a degradação do grupo hemo via redução da glutatião (GSH). Sendo assim, quanto maior a concentração de GSH no parasita, maior concentração de cloroquina será necessária para inibir a degradação do grupo

hemo. Desta forma, o aumento dos níveis de parasitários de GSH podem ajudar o parasita para proteger os efeitos tóxicos da cloroquina, aumentando e/ou contribuindo para a resistência (Cravo *et al.*, 2006) e, a resistência poderá surgir por modificação na expressão ou alteração funcional desta enzima: γ glutamil-cisteinil sintetase (γ -GCS).

Contudo, o mecanismo de resistência do *P. falciparum* à cloroquina parece estar associada com a alteração de acumulação ou efluxo do fármaco dentro dos parasitas (Foote & Cowman, 1994; Ward *et al.*, 1995; White, 1999; Olliaro, 2001). Os parasitas resistentes à cloroquina acumulam no vacúolo digestivo níveis de fármacos bastante inferiores aos acumulados por parasitas sensíveis (Fitch, 1969; Krogstar *et al.*, 1988; Foley & Tilley, 1998; Cowman, 2001). Estudos prévios demonstraram que 1) a redução da quantidade de fármaco nos parasitas resistentes também envolve alterações de pH no vacúolo digestivo ou efluxo do fármaco através do citoplasma do parasita ou membrana do vacúolo digestivo (Wellems & Plowe, 2001; Bras *et al.*, 2003), 2) a menor acumulação se deve ao aumento do efluxo e não a diminuição da acumulação (Krogstad *et al.*, 1987; Sanchez *et al.*, 2003) e ainda que 3) os parasitas resistentes incorporam maior quantidade na presença de verapamil³ (Bickii *et al.*, 1988). A demonstração de que o fenótipo de resistência à cloroquina, pode ser modulado pelo verapamil (Bras *et al.*, 2003), sugeriu semelhanças com o fenótipo de multiresistência (*multi-drug resistance* MDR) observado em células tumorais. Deste modo, foi identificada uma proteína denominada Pgh1 (produto do gene *Pfmdr1*) na membrana do vacúolo digestivo do *P. falciparum* (Bras *et al.*, 2003), a qual parece estar relacionada com o mecanismo de resistência à cloroquina (Foote *et al.*, 1989, 1990a). Está demonstrado por Van Es *et al.*, (1994) que as alterações de aminoácidos nesta proteína podem conduzir a alterações na acumulação de cloroquina.

Dois genes têm sido envolvidos na resistência do plasmódio às quinoleínas: os genes *Pfmdr1* (*P. falciparum multi-drug resistance 1*) e o gene *Pfcrt* (*P. falciparum chloroquine resistance transporter*) (Lopes *et al.*, 2002b; Cravo & Rosário, 2002), cujos produtos se encontram localizados no vacúolo digestivo.

O *Pfmdr1* é um gene polimórfico localizado no cromossoma 5 que codifica uma glicoproteína homóloga (Pgh1) da família transportadora ABC, com 162 kDa. Esta proteína (Pgh1), está envolvida directa ou indirectamente na concentração da cloroquina

³ Verapamil: compete com os fármacos pelos receptores do transportador

dentro do vacúolo digestivo do parasita *P. falciparum* (Cowman *et al.*, 1994; Reed *et al.*, 2000; Hyde, 2007).

Estudos *in vitro* (Reed *et al.*, 2000; Duraisingh *et al.*, 2000a; Price *et al.*, 1999; 2004) e transfecção génica (Dorsey *et al.*, 2001; Wongsrichanalai *et al.*, 2002; Wernsdorfer & Noedl, 2003) demonstraram que as mutações pontuais no gene *Pfmdr1* têm a capacidade de modular as respostas do parasita não só à cloroquina, mas também a outras quinoleínas, tais como mefloquina e quinino (Dorsey *et al.*, 2001; Wongsrichanalai *et al.*, 2002; Wernsdorfer & Noedl, 2003). Reed e colaboradores (2000) associaram positivamente mutações no gene *Pfmdr1*, codificando alterações nos aminoácidos Ser1034, Asn1042 e Asp1246 com a modulação da sensibilidade à cloroquina, mefloquina, quinino e halofantrina. Foram também identificadas mutações pontuais na sequência do mesmo gene, responsáveis por alterações nos aminoácidos 86, 184, 1034, 1042 e 1246, que podem estar relacionados com variações da especificidade na ligação ao substrato (Foote *et al.*, 1990). No entanto, foi verificada uma segregação independente de mutações no gene *Pfmdr1* e a resistência à cloroquina, a partir da análise de um cruzamento genético entre um parasita sensível, *P. falciparum* HB3 e outro resistente Dd2 (Wellems *et al.*, 1990). De facto, parece não existir uma associação evidente entre o gene *Pfmdr1* e as respostas à cloroquina em populações parasitárias naturais (Bhattacharya *et al.*, 1997; Lopes *et al.*, 2002a,b). Sendo assim, estudos prévios em várias regiões geográficas, baseados em epidemiologia molecular, demonstraram que mutações no gene *Pfmdr1* parecem estar associadas com a resistência à cloroquina na África Ocidental e Indonésia (Adagu *et al.*, 1996; Grobusch *et al.*, 1998, Huaman *et al.*, 2004a), embora nem sempre exista uma correlação total entre as mutações pontuais no gene *Pfmdr1* e a resistência à cloroquina como comprovam alguns estudos efectuados com amostras colhidas noutras áreas (Awad-El-Karim *et al.*, 1992; Babiker *et al.*, 2001; Happi *et al.*, 2003), o que sugere fortemente que outros genes possam estar envolvidos no fenótipo de resistência.

A análise de "linkage" e mapeamento cromossómico de clones originários do cruzamento HB3 x Dd2, permitiu localizar o cromossoma 7 como determinante de resistência à cloroquina (Wellems *et al.*, 1991), que inicialmente originou a identificação do gene *Pfcd2* como sendo determinante de resistência à cloroquina (Le Brás *et al.*, 1996; Su *et al.*, 1997). Posteriormente foi identificado outro gene, *Pfprt*, no

qual uma mutação no aminoácido 76 (*Pfcr*t K76T), apresenta uma correlação completa com a resistência à cloroquina em isolados de *P. falciparum* recolhidos em regiões endêmicas (Fidock *et al.*, 2000; Babiker *et al.*, 2001; Lopes *et al.*, 2002a,b; Sidhu *et al.*, 2002). Em concordância, o papel importante da mutação *Pfcr*t K76T na indução de resistência ao fármaco foi posteriormente confirmado através de experiências de transfecção genética (Fidock *et al.*, 2000; Sidhu *et al.*, 2002). A resistência à cloroquina é conferida por mutações no gene *Pfcr*t que codifica uma proteína transportadora com 48 kDa, localizada no vacúolo digestivo do parasita, local de acção da cloroquina (Fidock *et al.*, 2000; Sidhu *et al.*, 2002; Kublin *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 2005). Estão descritos 15 polimorfismos de aminoácidos no gene *Pfcr*t associados com a resistência a cloroquina nos isolados de campo (Cooper *et al.*, 2005), onde se inclui o *Pfcr*t76, que de todas estas mutações é a mais indicativa de existência da resistência ao fármaco cloroquina (Wellems *et al.*, 2001).

I.6.2. Amodiaquina

A amodiaquina foi apresentada pela primeira vez no encontro da Sociedade de Química Americana em 1946 e desde então tem sido utilizado em larga escala como um dos fármacos antimaláricos (Thomas *et al.*, 2004). A amodiaquina é uma 4-aminoquinoleína com uma estrutura química muito semelhante à cloroquina, sendo mais eficaz no tratamento de malária como esquizotocida.

Actualmente é utilizada como primeira linha do tratamento da malária nos Camarões ou em combinação com outros fármacos como na Ruanda, Burundi, Zanzibar e Tanzânia (Thomas *et al.*, 2004).

Tal como a cloroquina, a amodiaquina é acumulada dentro do vacúolo digestivo do parasita inibindo a polimerização (cristalização) do heme (Fitch *et al.*, 1974, Ginsburg, 1999; Ginsburg *et al.*, 1998). O mecanismo de resistência à amodiaquina não está completamente esclarecido, no entanto, pela similaridade da estrutura química apresentada entre a amodiaquina e a cloroquina, pensa-se que os mecanismos de resistência do parasita a ambos fármacos sejam comuns (Basco & Le Brás, 1992). Um estudo *in vivo* efectuado por Holmgren *et al.* (2006a), no Quênia, demonstrou uma forte associação entre os dois polimorfismos do gene *Pfcr*t e fenótipos de resistência à

amodiaquina, tendo sido esta semelhança também encontrada noutro estudo no Sudão por Ochong *et al.* (2003). Num outro estudo mais recente realizado por Holmgren *et al.* (2006b) não foi identificada nenhuma associação do gene *Pfmdr1* à amodiaquina.

I.6.3. Quinino e Mefloquina

O quinino e a mefloquina serão abordados na mesma secção, devido à semelhança na sua estrutura química. O facto de existirem indícios de resistência cruzada entre os dois compostos sugere que exercem a sua acção por um mecanismo similar (Cravo *et al.*, 2006).

O primeiro avanço no tratamento da malária dá-se no início do século XVII quando Juan Perez, um missionário jesuíta, descreve a utilização, por índios peruanos, da casca de uma árvore para o tratamento da febre. A árvore foi denominada Chinchona por Linnaeus na Suécia, em 1747. O princípio activo da sua casca, o quinino, foi isolado em França, em 1820, pelos químicos Pelletier e Caventou (Gilles & Snow, 2002).

Este composto é um alcalóide, tem um efeito tóxico a nível intra-eritrocitário de *P. falciparum*. A sua utilização tem sido limitada devido à sua elevada toxicidade e efeitos secundários adversos. Assim, actualmente, é utilizado apenas como fármaco de segunda ou terceira linha de tratamento para a malária não complicada e malária grave (WHO, 2005).

A mefloquina foi desenvolvida inicialmente com o objectivo principal de tratamento quando os parasitas fossem resistentes à cloroquina. Rapidamente surgiram casos de parasitas resistentes à mefloquina após a sua introdução, tendo mesmo sido registados casos de resistência em áreas onde a mefloquina nunca havia sido utilizada (White, 1994). Actualmente, é bastante utilizado como agente profilático nomeadamente para os viajantes. A sua longa eliminação - vida média de 20 dias nos adultos - é uma vantagem para tratamento de dose única, mas uma desvantagem em zonas de transmissão intensa da malária onde o nível residual do fármaco durante um longo período tem probabilidades de exercer uma pressão altamente selectiva sobre a população de parasitas (Geyer, 2001).

O modo de acção e o seu mecanismo de resistência do quinino e mefloquina ainda não está completamente esclarecido. No entanto, tem sido assumido que todos os

fármacos do grupo das quinoleínas interferem com mecanismos de digestão da hemoglobina no vacúolo digestivo dos parasitas (Schmidt *et al.*, 1978a,b; Geary *et al.*, 1986) e que a passagem do fármaco para o interior do vacúolo é facilitada pela acção de um transportador activo (Vanderkooi *et al.*, 1988; Garin *et al.*, 1991). O quinino e a mefloquina têm uma estrutura química semelhante, com uma base monoprotónica e bastante lipofílico. Talvez por este motivo não se encontrem elevadas concentrações destes fármacos no vacúolo digestivo dos parasitas, ao contrário da cloroquina que com uma base fraca diprotónica é rapidamente e quase completamente absorvida no vacúolo digestivo, sugerindo a possibilidade de que os quinoleinometanóis (quinino, mefloquina) possuam um local de acção distinto da cloroquina (Folley & Tilley, 1998; Cravo *et al.*, 2006). Um estudo no modelo de malária roedor *Plasmodium berghei* tratado com diferentes fármacos, permitiu concluir que a cloroquina interfere com a polimerização do hemo o que resulta de uma diminuição da produção de hemozoína, mas que no quinino e na mefloquina não se verificou nenhum efeito (Chou & Fitch, 1993). Estudos subsequentes do mesmo tipo, sugeriram que a mefloquina é capaz de inibir a formação de hemozoína, resultando na acumulação do hemo livre que é tóxico para o parasita (Sullivan *et al.*, 1998). Outros estudos observaram também que a mefloquina é capaz de se ligar a proteínas do parasita, sugerindo que estas proteínas poderão ser envolvidas no mecanismo de acção da mefloquina ou seja estão relacionadas directamente como alvo de acção da mefloquina nos parasitas da malária (Desneves *et al.*, 1996). Um trabalho mais recente demonstrou que a mefloquina inibe a endocitose de nutrientes macromoleculares essenciais dentro do vacúolo digestivo do parasita (Hoppe *et al.*, 2004, revisto por Cravo *et al.*, 2006).

Relativamente ao mecanismo de resistência, os genes que determinam a resistência ao quinino e à mefloquina não estão ainda identificados mas os estudos moleculares relacionados com parasitas resistentes a ambos os fármacos têm focado principalmente dois genes transportadores de membrana *Pfcr1* e *Pfmdr1*. Mutações no gene *Pfcr1* estão associadas à resistência ao quinino (Mu *et al.*, 2003). Vários estudos *in vitro* demonstraram que a resistência à mefloquina, quinino e halofantrina pode também ser modulada por mutações pontuais no gene *Pfmdr1* (Duraisingh *et al.*, 2000b; Reed *et al.*, 2000). O gene *Pfmdr1* encontra-se localizado no cromossoma 5, codificante para uma proteína (Pgh-1) da família dos transportadores ABC, presente no vacúolo

digestivo do parasita, local de acção da cloroquina e possivelmente de outros fármacos do grupo das quinoleínas, incluindo o quinino (Cowman *et al.*, 1991). Mutações pontuais no gene *Pfmdr1* têm sido associadas a resistência ao Quinino, Mefloquina e a derivados de Artemisinina, sendo os marcadores moleculares associados, limitados (Uhlemann & Krishna, 2005).

Estudos *in vivo* recentes realizados no Peru e Gabão não demonstraram nenhuma evidência de que existe associação entre as mutações do gene *Pfmdr1* e a resistência à mefloquina (Mawili-Mbouma *et al.*, 2002). Curiosamente, foi observado que a presença dos alelos selvagens do gene *Pfmdr1* 86N estavam associados com a resistência *in vitro* à mefloquina (Price *et al.*, 1999; Duraisingh *et al.*, 2000a) e a resistência *in vivo* à lumefantrina (Siswath *et al.*, 2005). Encontraram-se ainda algumas evidências de que alteração do número de cópias e do nível de expressão do gene *Pfmdr1*, podem influenciar a diminuição da susceptibilidade ao quinino, mefloquina e halofantrina (Cowman *et al.*, 1994; Peel *et al.*, 1994; Ferdig *et al.*, 2004). Vários estudos do gene *Pfmdr1* com isolados de campo têm confirmado em alguns, mas não em todos, a associação entre o número de cópias e a susceptibilidade do parasita ao quinino, mefloquina e halofantrina (Wilson *et al.*, 1993; Price *et al.*, 1999; Nelson *et al.*, 2005). A amplificação do gene *Pfmdr1* não parece estar associado ao aumento de resistência à mefloquina (Lim *et al.*, 1996; Chaiyaroj *et al.*, 1999), mas podem ser predictivos de falência terapêutica à mefloquina, indicando também o aumento do risco de falência terapêutica à combinação de mefloquina-artesunato, como foi demonstrado na Tailândia (Price *et al.*, 2004). Para além da amplificação genética, um estudo recente de transfecção genética (Sidhu *et al.*, 2006), demonstrou algumas evidências de que as alterações do gene *Pfmdr1* estão implicadas na resistência ao quinino, mefloquina e halofantrina.

A discrepância entre os resultados dos vários estudos publicados, como foi referido anteriormente, reforça a hipótese de que a resistência fenotípica ao quinino e à mefloquina consista no envolvimento e a interacção de vários genes (Bray *et al.*, 2005; Duraisingh & Cowman, 2005).

I.6.4. Sulfadoxina-Pirimetamina

A combinação de Sulfadoxina-Pirimetamina apresenta uma acção sinérgica, sendo utilizada na profilaxia e no tratamento dos parasitas resistentes à cloroquina (Olliaro, 2001; Nzila, 2006). Até recentemente, a sulfadoxina-pirimetamina (SP) era considerada como sucessora evidente da cloroquina. Contudo, surgiram relatos de casos de resistência à SP no mesmo ano em que foi introduzida, durante os anos 60. A ocorrência de resistência aos fármacos do grupo dos antifolatos é esporádico, multifocal e associada à pressão farmacológica numa dada área geográfica (Foote *et al.*, 1990b).

1.6.4.1. Modo de acção da Sulfadoxina-Pirimetamina em *P. falciparum* e *P. vivax*

O modo de acção da Sulfadoxina-Pirimetamina no *P. falciparum* e *P. vivax* serão abordados na mesma secção, dado que os genes relacionados com a resistência são comuns e têm sido descritos por vários estudos, *dhfr* com a pirimetamina (Leartsakulpanich *et al.*, 2002; Hasting & Sibley, 2002; Hawkins *et al.*, 2007) e *dhps* com a sulfadoxina (Korsinczky *et al.*, 2004; Imwong *et al.*, 2005; Menegon *et al.*, 2006; Rungsihirunrat *et al.*, 2007), envolvendo várias vias metabólicas catalisadas por diversas enzimas (Figura 5). A Sulfadoxina-Pirimetamina é constituída por dois inibidores dos grupos de antifolatos: um inibidor da enzima dehidrofolato reductase-DHFR (Pirimetamina) e outro que actua ao nível da enzima dehidropteroato sintetase-DHPS (Sulfadoxina) (Cowman, 2001). Estas duas enzimas estão envolvidas na síntese do folato (Warhurst, 2002; Wongsrichanalai *et al.*, 2002), quer no *P. falciparum* quer no *P. vivax* (Hawkins *et al.*, 2007).

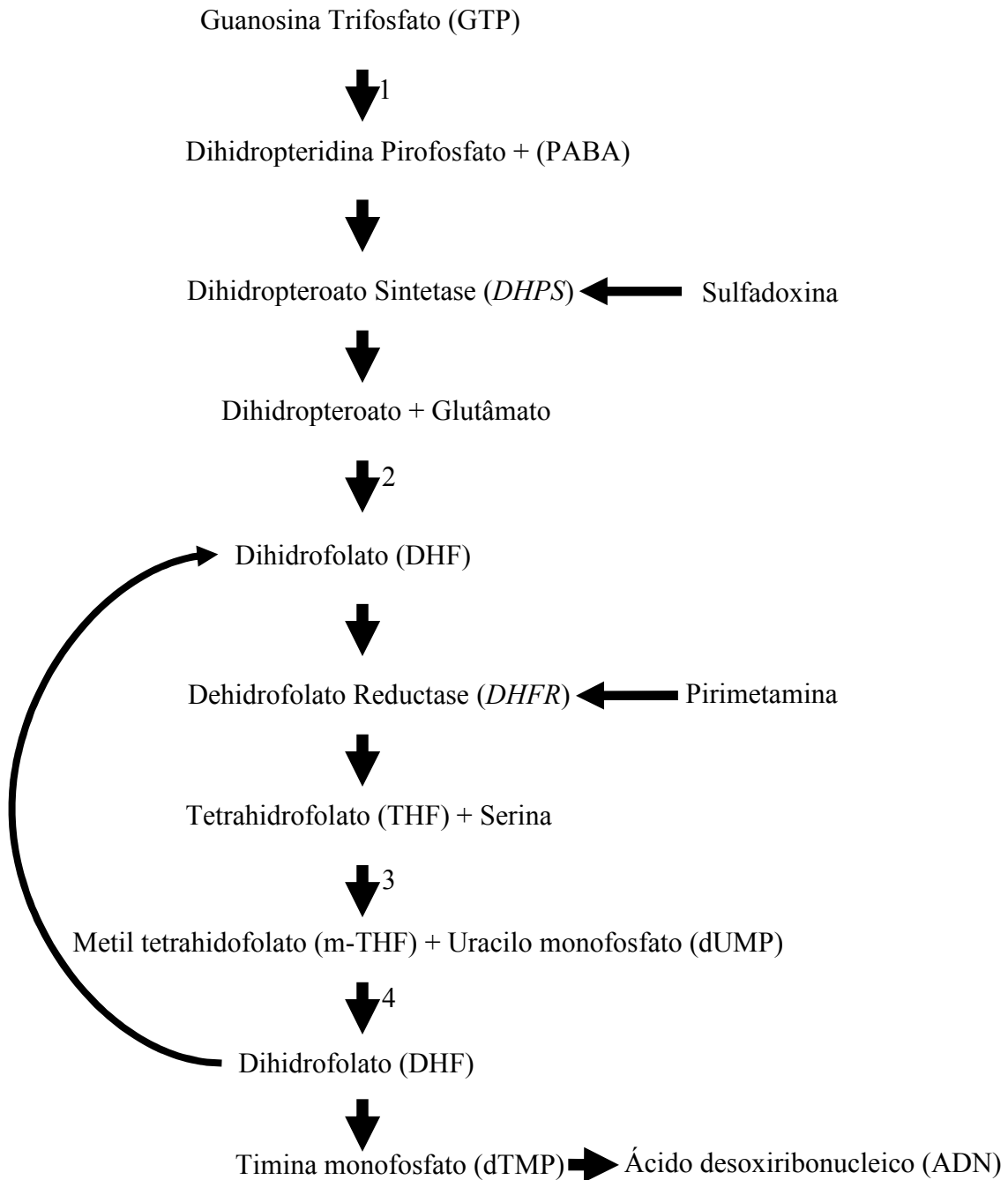


Figura 5. Esquema representativo da via metabólica afectada pela acção da Sulfadoxina-Pirimetamina (1, 2, 3, 4): Enzimas envolvidas no processo metabólico: 1. hidroximetil dihydropteridina aldolase; 2. dihidrofolato sintetase; 3. SHMT: serina hidroximetiltransferase; 4. TS: timidilato sintetase (Adaptado de Warhurst, 2002).

Os parasitas realizam síntese *de novo* de cofactores de folato a partir de guanosina trifosfato (GTP), ácido para-aminobenzóico (pABA) e glutâmico (Warhurst, 2002). Para o realizarem, requerem um suplemento de dihidrofolato (DHF) e tetraidrofolato (THF) que é produzida através da via da biossíntese do folato, pois o DHF e THF são essenciais para as reacções onde os cofactores do folato são sintetizados e utilizados.

A sulfadoxina é uma estrutura análoga do ácido para-aminobenzóico (pABA), onde se requer biossíntese *de novo* cofactores do folato a partir da guanosina trifosfato (GTP) (Woods, 1940; Miller, 1944; revisto por Cowman, 2001).

A enzima DHPS catalisa a reacção entre o grupo pirofosfato e o grupo pABA produzindo dihidropterato (DHF) (Figura 5). O produto da seguinte reacção dihidrofolato (DHF), é reduzida a tetraidrofolato (THF) pela DHFR. O THF por sua vez adquire um grupo metilo (m-THF) pela acção da enzima SHMT, sendo o produto utilizado pela enzima TS na metilação do monofosfato de deoxiuridina (dUMP) para formar o monofosfato de desoxitimina (dTMP) que é incorporado no ADN durante a sua síntese (Delfino *et al.*, 2002; Warhurst, 2002), regenerando o dihidrofolato (DHF).

A inibição do funcionamento de DHFR, ou uma das enzimas durante o ciclo pode prevenir a formação das novas moléculas de dTMP, que vai impedir a síntese do ADN, resultando na morte dos parasitas (Delfino *et al.*, 2002). Os antifolatos inibem principalmente a cadeia metabólica da síntese tetraidrofolato (THF), que conduz a acção do grupo metil para a reacção da síntese timidilato na síntese de ADN (Warhurst, 2002). O timidilato requerido na síntese de ADN é sintetizado *de novo*, presumivelmente pela timidilato sintase (TS) (Ferone, 1977).

I.6.4.1.1. Resistência do *P. falciparum* à Sulfadoxina-Pirimetamina

O mecanismo de resistência do *P. falciparum* à sulfadoxina-pirimetamina, surge pela presença de mutações pontuais nas regiões codificantes do centro activo da bifuncional dihidropterato sintase (DHPS) e dihidrofolato reductase-timidilato sintetase (DHFR-TS) respectivamente (Peterson *et al.*, 1988; Brooks, *et al.*, 1994), e o mesmo foi observado em *P. vivax* (de Pecoulas *et al.*, 1998a,b; Auliff *et al.*, 2006; Djapa *et al.*, 2007; Hawkins *et al.*, 2007).

Estudos *in vitro* em *P. falciparum* demonstraram a existência de uma associação entre a resistência à SP e mutações pontuais no gene dihidrofolato reductase (DHFR) e dihidropterato sintase (DHPS) (Peterson *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 1997). A resistência do *P. falciparum* à pirimetamina estava associada a várias mutações pontuais na região da dehidrofolato-reductase (DHFR) no gene dihidrofolato-timidilato sintase (DHFR-TS). Uma única mutação pontual no codão 108, onde uma serina (Ser) é substituída por uma asparagina (Asn), parece ser suficiente para conferir resistência à pirimetamina, sendo esta consideravelmente aumentada nos parasitas portadores de três mutações diferentes no mesmo gene (108Asn e 51Ile e/ou 59Arg) (Plowe, 2003). Pelo facto da mutação no codão 108 (Ser108Asn) se encontrar sempre presente em amostras de campo quando surgem outras mutações em diferentes codões (51I e 59Arg), pensa-se que ele poderá ser uma mutação precursora para o surgimento de linhagens resistentes à pirimetamina (Wang *et al.*, 1997; Warhurst, 2002). Alguns autores evidenciaram também o aparecimento da mutação 164Leu associada a mutação 108Asn em clones e amostras de parasitas resistentes quer à pirimetamina quer ao cicloquanil (Peterson *et al.*, 1990). Elevados níveis de resistência estão associadas com a selecção de mutações no codão 164 do gene *dhfr*. Curiosamente, esta mutação não é tão comum em África como é na Ásia. No entanto, um estudo recente mostrou a presença da mutação no codão 164 em isolados do Malawi, utilizando a técnica de Real Time PCR, uma indicação de que a mutação está também sendo seleccionada em África (Nzila, 2006), em concordância com prévias observações em isolados de *P. falciparum* na Tanzânia (Hasting *et al.*, 2002b).

A resistência à sulfadoxina tem sido associada com mutações pontuais no gene *dhps*, tais como A613T/S, S436A, A437G, K540E e A581G (Triglia *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997; Diourté *et al.*, 1999). Estudos recentes identificaram uma mutação adicional na posição 540 (K540E), onde ocorre apenas em associação com A437G (Triglia *et al.*, 1997). Tal como no caso do gene *dhfr*, o aumento do grau de resistência à sulfadoxina estava associado com o aumento do número das mutações. Uma única mutação na posição 437 (A437G) parece ser suficiente para conferir resistência à sulfadoxina, enquanto o aumento do nível de resistência está associado às mutações S436A/A437G/A613T/S ou S436A/A437G/ K540E (Triglia *et al.*, 1997). Recentemente, estudos clínicos demonstraram uma forte associação entre a presença de

quíntuplas mutações distribuídas pelos genes *dhfr* e *dhps* (*dhfr* 108Asn, 51Ile, 59Arg; *dhps* 437Gly e 540Glu/581Gly) (Sibley *et al.*, 2001; Staedke *et al.*, 2004; Greson & Plowe, 2005), sendo considerado como marcador molecular para a falha terapêutica, observado no tratamento de *P. falciparum* com a combinação Sulfadoxina-Pirimetamina (Plowe *et al.*, 1997; Sibley *et al.*, 2001).

I.6.4.1.2. Resistência do *P. vivax* à Sulfadoxina-Pirimetamina

A malária causada por *P. vivax* é responsável por mais de 70-80 milhões de casos anualmente em todo o mundo e mais de 50% de todos os casos encontra-se predominantemente nalgumas regiões da Ásia e América do Sul (Mendis *et al.*, 2001; Sá *et al.*, 2005; Tansor *et al.*, 2006). A mortalidade causada por *P. vivax* é reduzida em comparação com *P. falciparum*, no entanto, é responsável por elevada morbidade e perda económica dos indivíduos em países endémicos (Auliff *et al.*, 2006). O ressurgimento desta doença é atribuído principalmente ao aparecimento dos parasitas resistentes aos fármacos disponíveis para o tratamento (Baird, 2004; Sattabongkot *et al.*, 2004). Em várias regiões endémicas do globo onde a co-infecção de *P. falciparum* e *P. vivax* é comum e a resistência de *P. falciparum* à cloroquina se verifica, o uso de antimaláricos do grupo dos antifolatos nomeadamente a Sulfadoxina-Pirimetamina tem tendência a aumentar. Em muitos destes países endémicos, a combinação SP foi adoptada como antimalárico de primeira linha de tratamento quer para *P. falciparum*, quer para *P. vivax*, uma vez que o uso de outro tipo de fármacos de eficácia comprovada permanece muito dispendioso. Pouco tempo após a introdução da SP, foram registadas várias falhas terapêuticas em pacientes infectados com *P. vivax* no Sudeste Asiático e na América do Sul (Tjitra *et al.*, 2002; Picot *et al.*, 2005).

Segundo Bruce-Chwatt (1985), a falha terapêutica em *P. vivax* estava relacionada com relapsos, que dependem da acção da primaquina nos hipnozoítos. Em estudos “*in vivo*”, a avaliação da taxa de eficácia do fármaco no tratamento é complicada, devido à dificuldade em distinguir entre a recrudescência (nova manifestação da doença devido à sobrevivência de formas eritrocitárias), o relapso (nova manifestação da doença devido à sobrevivência de hipnozoítos no fígado) e aquisição de nova infecção. Além disso, a comparação dos dados tem sido agravado por

falta de estudos seguindo um protocolo padronizado para se classificar resistência, levando à dúvida entre resistência e recrudescência. Por outro lado, estudos “*in vitro*” relacionados com a resistência por *P. vivax* também têm sido muito limitados devido à impossibilidade de obter elevadas parasitêmias em cultivo contínuo (Rungsihirunrat *et al.*, 2007). No entanto, segundo Plowe (2003) e WHO (2006), os marcadores moleculares de resistência de *P. falciparum* podem ser utilizados como ferramentas complementares na monitorização de resistência ao *P. vivax*. Vários genes relacionados com a resistência aos fármacos são comuns e têm sido descritos em *P. falciparum*. Os genes homólogos de *Pfdhfr*, *Pfdhps*, *Pfcr1* e *Pfmdr1* têm sido estudados em *P. vivax*, *Pvdhfr* (de Pécoulas *et al.*, 1998a), *Pvdhps* (Korsinczky *et al.*, 2004), *Pvcg10* (Nomura *et al.*, 2001) e *Pvmdr1* (Brega *et al.*, 2005), respectivamente. No entanto, não foi encontrada nenhuma associação entre as mutações pontuais nos genes *Pvcg10* e *Pvmdr1*, e a resistência à cloroquina em *P. vivax* em isolados de campo (Nomura *et al.*, 2001; White, 2004; Sa *et al.*, 2005). Quanto ao gene *Pvdhfr*, foi claramente demonstrado através de vários estudos laboratoriais que a resistência à pirimetamina estava associada com a acumulação de SNP em *P. vivax*, que conduzia à diminuição da afinidade do fármaco e correspondia à diminuição da sensibilidade à pirimetamina *in vitro* (de Pécoulas *et al.*, 1998b; Tahar *et al.*, 2001; Hasting & Sibley, 2002b; Leartsakulpanich *et al.*, 2002; Imwong *et al.*, 2003; Hastings *et al.*, 2005). Além disso, esta associação pôde ser confirmada através de estudos epidemiológicos, investigando a relação da amplificação genética do gene *Pvdhfr* e a resposta *in vivo* para os antifolatos (Imwong, *et al.*, 2001; Tjitra *et al.*, 2002; Hastings *et al.*, 2004). Da mesma forma, foi encontrada uma diminuição da sensibilidade *in vitro* para sulfadoxina (Korsinczky *et al.*, 2004; Imwong *et al.*, 2005).

Estudos laboratoriais recentes em ambas as espécies (*P. falciparum* e *P. vivax*) verificaram existir uma associação entre a resistência à sulfadoxina-pirimetamina e mutações pontuais no gene dihidrofolato reductase (DHFR) e dihidropterato sintase (DHPS) (Hasting & Sibley, 2002b; Leartsakulpanich *et al.*, 2002; Imwong *et al.*, 2003; Bunyarataphan *et al.*, 2006; Alam *et al.*, 2007; Hawkins *et al.*, 2007; Rungsihirunrat *et al.*, 2007).

O gene que codifica as mutações pontuais no dihidrofolato-timidilato sintase (DHFR-TS) de *P. vivax* foi clonado e sequenciado, inicialmente por de Pécoulas *et al.*,

(1998b) e posteriormente por Imwong *et al.* (2001). Foi demonstrado que os isolados resistentes de *P. vivax* aos antifolatos tinham mutações homólogas às de *P. falciparum*. A comparação de sequências demonstrou que os aminoácidos no codão 59, 108 e 164 do gene *pfdhfr* correspondem, respectivamente, ao codão 58, 117 e 173 do gene *pvdhfr* (Hasting & Sibley, 2002b; Leartsakulpanich *et al.*, 2002; Hawkins *et al.*, 2007). A presença das mutações no gene *dhfr* de *P. vivax* na posição 15, 50, 58, 117 e 173 correspondem ao codão 16, 51, 59, 108 e 164 respectivamente, que em *P. falciparum* estavam associadas a resistência à pirimetamina (Imwong *et al.*, 2001). Estudos prévios em várias regiões mostram que o polimorfismo nos aminoácidos 57, 58 e 117 era muito comum nos isolados de Tailândia, onde a Sulfadoxina-Pirimetamina tem sido utilizado intensivamente, enquanto nos isolados de Índia e Madagascar a prevalência das mutações foi baixa devido à raridade do uso dos antifolatos na região (Imwong *et al.*, 2001).

A detecção da resistência de *P. vivax* à sulfadoxina com base molecular não tem sido bem documentada. No entanto, através de clonagem e sequenciação do gene codificante da proteína bifuncional pirofosfocinase (PPPK)-*dhps* (dihidropterato sintase), e comparativamente aos aminoácidos homólogos do gene *Pfdhps*, foi possível detectar os polimorfismos responsáveis pela resistência à sulfadoxina (Korsinczky *et al.*, 2004). Inicialmente, pensou-se que a presença de V585 “tipo selvagem” (homólogo à posição 613 em *P. falciparum*) pode ser a chave para conferir a resistência de *P. vivax* à sulfadoxina. Além disso, os mesmos autores notificaram que as alterações do aminoácido na posição A383G e A553G, podem ser relacionados com a diminuição da afinidade entre o gene *Pvdhps* e a sulfadoxina. Um outro estudo realizado por Imwong *et al.*, (2005) verificou que as mutações no codão 383 e 553 ocorre na maioria dos isolados analisados da Tailândia, e de forma análoga, com alteração de uma alanina para uma glicina no codão 437 e 581, respectivamente ao gene *Pfdhps* e que estas alterações estavam associadas à redução de sensibilidade à sulfadoxina (Menegon *et al.*, 2006; Rungsihirunrat *et al.*, 2007).

I.7. A malária e Resistência aos Antimaláricos em Timor Leste

Em 1943, o “Medical Journal of Australia” relatou a existência de malária importada de Timor na Austrália (Winterbotham & Arden, 1943, revisto por David, 1965) e todos os infectados foram identificados como tendo *P. vivax* (Tebbutt, 1943; Collier, 1944, revisto por David, 1965). Em 1952, o relatório do Serviço de Saúde e Higiene da Província de Timor, referiu que a malária era considerada a doença local mais mortífera e a que mais pesava na economia da população (Castanheira, 1952). No entanto, só em 1955 foi possível criar uma Missão Médica de Estudo a Timor. Trata-se da primeira missão realizada a Timor com o fim de fazer uma apreciação geral sobre os principais problemas nosológicos, e teria também um importante papel no conhecimento da endemia malária e os mosquitos vectores de Timor Leste (Azevedo *et al.*, 1958a; Ferreira, 1961).

As primeiras publicações relativas à malária em Timor Leste aparecem em 1958, com Fraga de Azevedo, investigador e chefe da missão do estudo. Os dados publicados, baseados no Boletim Trimestral de Estatística da Província, registavam 22.013 incidências de casos de malária em 1955, 15.465 em 1956 e 11.533 em 1957. No mesmo ano, Azevedo e colaboradores publicam o trabalho intitulado “Contribuição para o conhecimento da endemia malárica na província de Timor” (Azevedo *et al.*, 1958b). Este estudo foi realizado durante os meses de Dezembro de 1955 e Janeiro – Março de 1956 em várias regiões do País e incluiu a colheita de 3.430 amostras de sangue em indivíduos de ambos os sexos e de várias idades, para estudo da parasitemia. Neste estudo a maior frequência de infecção foi verificado no grupo etário entre 7 - 14 anos, tendo-se registado o índice esplénico de 46,4% nas zonas de altitudes de 0 aos 100 m e de 34,2% nas zonas de altitudes de 100 aos 500m. As espécies identificadas foram em 48,7 % dos casos, *P. falciparum*, em 33,1 % *P. vivax* e em 18,2 % *P. malariae* (Azevedo *et al.*, 1958b).

Desde então, em consequência da primeira missão do estudo, apoiadas pelas recomendações da 2ª Conferência Asiática do Paludismo (Novembro de 1954) e 8ª Assembleia Mundial de Saúde (Maio de 1955), realizaram-se vários estudos em Timor Leste, os quais representam a continuação dos já efectuados por Azevedo e colaboradores (1958).

De 1959 a 1960, Ferreira e Breda (1961a) analisaram 7017 amostras de várias regiões do país, registando uma prevalência de 20,6% para parasitas de malária, constituídas por *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*, respectivamente de 42,41%, 30,07% e 27,5%, o que se encontra de acordo com os valores obtidos por Azevedo e colaboradores (1958b). Um outro estudo realizado durante o ano de 1963 e 1964 nas clínicas de Díli, verificou que a prevalência da malária foi de 17,5% e 14%, respectivamente. As espécies de *Plasmodium* identificadas, em mais de 60% foi *P. falciparum*, 27 % *P. vivax*, 7% *P. malariae* e encontrando-se ainda infecções mistas (*P. falciparum* + *P. vivax*/*P. malariae*) (David, 1965).

A violência após o referendo de 1999 dificultou o acesso aos dados estatísticos de saúde recolhidos durante a ocupação Indonésia (1975-1999), tendo sido os dados perdidos, destruídos e inacessíveis. No entanto, segundo Webster (2000) e Morris (2001), em 1998 o número de casos confirmados foi registado em mais de 10.000 casos. A taxa de casos positivos varia em cada distrito (Ermera 10%, Díli 55% e Manufahi 73%).

A crise de 1999 contribuiu para que mais de 75% da população fosse desalojada e se refugiasse; parte dela, foi forçada a migrar para Timor Ocidental – Indonésia. Muitas infraestruturas foram completamente destruídas, incluindo as instalações de saúde. Após a crise, aumentaram os problemas de saúde pública devido à proliferação da malária, principalmente na época de chuva. Sendo assim, num relatório de 2001, "Role and Function of WHO in East Timor" registou 133.750 suspeitas de casos de malária, um aumento significativo relativamente ao ano anterior, tendo-se verificado 110 óbitos relatados em Setembro de 1999. Segundo o mesmo relatório, o sistema de vigilância registou mais de 133.000 casos de malária e detectou resistência à cloroquina por *P. falciparum* e casos esporádicos de resistência à sulfadoxina-pirimetamina (WHO, 2001c). Nos 2 anos subsequentes, os serviços de saúde foram reabilitados com o apoio de ONG's (Organizações Não Governamentais), sob coordenação da Divisão dos Serviços de Saúde da UNTAET (Administração Transitória das Nações Unidas em Timor Leste).

Actualmente, a malária constitui um grave problema de saúde pública, caracterizada por ser uma doença endémica em todos os distritos, com as mais elevadas taxas de mortalidade e morbidade nas crianças e mulheres grávidas (Ministry of

Health, 2002a). Estima-se que, no mínimo, 150 pessoas morrem em cada ano, como consequência directa da malária (Ministry of Health, 2002b). A distribuição dos casos de malária anualmente após a independência entre 2000 a 2006 encontra-se ainda muito elevada (Figura 6). O número total de óbitos foi de 132 em 2000 (www.searo.who.int/en/section10), 100 em 2003, 65 em 2004, 88 em 2005 e 68 em 2006 (WHO, 2008). A malária é causada por *P. falciparum* em 60 – 80 % dos casos, *P. vivax* 20 – 40 % e esporadicamente por *P. ovale*. (Webster, 2000). No entanto, dados recentes mostraram que *P. falciparum* e *P. vivax* são igualmente encontrados (Ministry of Health, 2002a).

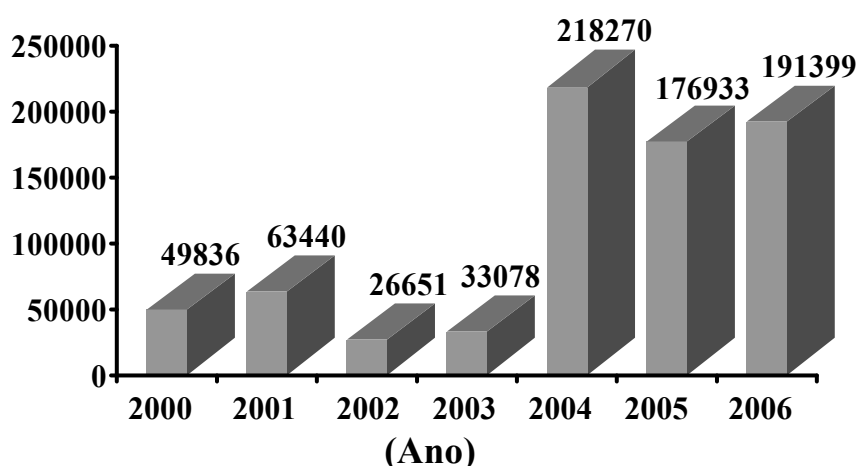


Figura 6. Representação gráfica dos casos de malária entre 2000- 2006. (adaptado de WHO, 2008).

Relativamente aos vectores da malária no país, as primeiras referências publicadas surgem com o trabalho de Azevedo e colaboradores entre 1955-1956. Estes investigadores, estudando mosquitos capturados em diferentes altitudes permitiu identificar a presença de *Anopheles sundaicus*, *Anopheles barbirostris barbirostris* e *Anopheles minimus* nas zonas baixas e *Anopheles maculatus* nas zonas de média altitude (Azevedo *et al.*, 1958b). Em 1959 a 1960, Ferreira e Breda realizaram outro estudo que envolveu a captura de mosquitos *Anophelinae*, quer sob a forma larvar quer

sob a forma de adulto na cidade de Díli, dividida em 8 zonas, tendo identificado a existência das espécies já referidas por Azevedo e colaboradores (1958) e encontrando ainda as seguintes: *Anopheles (Myzomyia) subpictus malyensis*, *Anopheles (Anopheles) barbumbrosus*, *Anopheles (Anopheles) hyrcanus nigerrimus*, *Anopheles (M.) vagus vagus*, *Anopheles (M.) subpictus subpictus*, *Anopheles (M.) sundaicus*, *Anopheles (A.) barbirostris barbirostris*, *Anopheles (A.) maculatus maculatus* e *Anopheles (M.) anularis*. Fora da Cidade de Díli, observou-se uma aparentemente desigual incidência das várias espécies e, da sua prevalência, confirmando-se a exofílica e antropofílica de *Anopheles (M.) vagus vagus* e a antropofílica, endofílica e frequente predominância sobre as outras espécies, de *Anopheles (M.) subpictus subpictus* (Ferreira & Breda, 1961b). Segundo Webster (2000) e Kolaczinski & Webster (2003), os mosquitos *Anopheles barbirostris*, *An. aconitus*, *An. sundaicus* e *An. subpictus* são os vectores que asseguram a transmissão na região e a sua intensidade depende da altitude e hábitos do vector.

As actividades de controlo do vector antes da independência em 2002, eram baseadas na pulverização das casas com DDT (1982-1991) e Bendiocarb desde 1992. O controlo biológico e químico foram realizados numa escala muito limitada (Anstey, 1999; Kolaczinski & Webster, 2003).

Em 2003, o Programa Nacional do Controlo a Malária foi estabelecida. O Plano Nacional Estratégico da Malária foi desenvolvido pelo Ministério de Saúde com o objectivo de garantir o acesso rápido de toda a população ao tratamento eficaz, prover medidas de prevenção da malária com a utilização de ITNs (*Insecticide-treated mosquito nets*) sobretudo para crianças e mulheres grávidas e garantir a utilização de métodos apropriados para o controlo do vector, incluindo irrigação, aquacultura e educação da população. Embora o Programa Nacional do Controlo a malária tenha sido implementado, os factores sócio-económicos, o saneamento, a pobreza, o tipo de habitação, proximidade das casas aos criadouros, tipos de construção/casas, a criação dos animais junto às casas continuam a ser determinantes para a proliferação da malária.

A primeira evidência na diminuição da sensibilidade de *P. falciparum* à cloroquina foi em 1968 quando Ferreira (1961) observou um paciente em estado comatoso internado no hospital de Baucau. O doente foi hospitalizado cerca de duas semanas antes em Díli, por acesso febril com presença de plasmódios no sangue.

Prosseguiu-se o tratamento por via parental (dose total de 1,5 g de cloroquina base). No primeiro dia observou-se melhoria e prosseguiu-se a terapêutica até ao terceiro dia. Porém, passados quatro dias, a doente voltou a cair em coma e ao retomar a mesma terapêutica, voltou a ocorrer o mesmo.

Sendo assim, só nos anos 80, a resistência à cloroquina foi registada e publicada pela primeira vez na República Democrática de Timor Leste (WHO., 1984; revisto por Kolaczinski & Webster, 2003). Embora tenha sido detectada a resistência durante os anos 80, a cloroquina continuou a ser utilizada como a primeira linha no tratamento de malária não complicada. A primaquina e a sulfadoxina-pirimetamina eram utilizadas como segunda linha e a malária grave tratada com quinino, segundo o protocolo da OMS (referindo em Krause *et al.*, 1999; revisto por Kolaczinski & Webster, 2003). Em 1992, verificou-se que neste país se encontravam índices elevados de resistência à cloroquina (Webster, 2000; Chen *et al.*, 2002; Ezard, 2003), e também se verificavam casos esporádicos de resistência à SP (Arbani & Peterson, 1999; Webster, 2000).

Estudos *in vitro* têm reportado a resistência do *P. falciparum* à cloroquina, amodiaquina e sulfadoxina-pirimetamina em Timor Leste (Pribadi, 1992). Noutro trabalho, os testes “*in vivo*” realizados em 2000 no distrito Lospalos, área mesoendémica na região Leste do País, revelaram que a prevalência total de falência terapêutica da cloroquina foi de 67,7% (2,1% no fracasso de tratamento inicial, 54,2% resistente RI, 12,5% resistente RII e não resistente RIII) (Chen *et al.*, 2002; Ezard *et al.*, 2003; Kolaczinski & Webster, 2003).

O crescente nível de resistência à cloroquina nos últimos anos levou à alteração da política terapêutica em 1999. Actualmente, os antimaláricos utilizados como a primeira linha no tratamento da malária não complicada em pacientes com infecção confirmada no laboratório (por Microscopia Óptica) consistem na combinação Sulfadoxina-Pirimetamina em dose única para *P. falciparum*, e Cloroquina 25mg/kg durante três dias para *P. vivax*. Nos pacientes diagnosticados apenas nas clínicas (e/ou com outras causas como febre – vômito tais infecções respiratórias, meningite etc.), a terapêutica era a Sulfadoxina-Pirimetamina dose única + Cloroquina durante três dias (Delacollete, 1999).

Num estudo utilizando marcadores moleculares realizado com amostras recolhidas em 2001, um ano após a introdução da Sulfadoxina-Pirimetamina como a

primeira linha no tratamento, foram detectados 81% (31/38) de isolados que tinham uma ou mais mutações no codão 108N (59R+108N) do gene *pfdhfr* e nenhum isolado com mutação no gene *pfdhps* (Burns *et al.*, 2006). Outro estudo mais recente realizado entre Novembro de 2003 e Janeiro de 2004, demonstrou uma elevada prevalência das mutações implicadas na resistência à Cloroquina (*Pfcrt*, *Pfmdr1*) e Sulfadoxina-Pirimetamina (*Pfdhps*, *Pfdhfr*). Nesse estudo, observou-se ainda uma elevada prevalência de amostras (42,86 %) que continham em simultâneo “mutações quádruplas” distribuídas pelos genes *Pfdhfr* e *Pfdhps*, constituída pelo haplótipo *dhfr108Asn/51Ile/59Arg + dhps437Gly* (de Almeida *et al.*, 2009).

I.8. Objectivos

No actual quadro da situação da malária na RDTL, o aumento do número de casos da malária, a inexistência de dados epidemiológicos e poucos estudos ligados à resistência aos antimaláricos alertaram a necessidade de actualizar o conhecimento da situação, tanto a nível nacional como local, com o objectivo de fomentar uma política de intervenção, no domínio da vigilância e controlo da malária no país.

Da necessidade de dispor de dados mais objectivos e actualizados do que os actualmente disponíveis, de modo a obter informações relevantes que permitam implementar medidas de controlo adequadas, considerou-se prioritária a implementação de um estudo que permitisse fazer um levantamento da situação epidemiológica da malária e da situação de resistência aos antimaláricos e marcadores moleculares associados. Este estudo, tendo como objectivo avaliar a frequência da malária em cada distrito estudado, identificar e caracterizar os factores causais da sua distribuição, deveria contemplar também os diversos factores socio-económicos envolvidos na transmissão nos diferentes distritos do país. No caso do estudo ligado à resistência aos antimaláricos, pretende-se avaliar a prevalência da principal mutação nos genes responsáveis pela resistência de *P. falciparum* e *P. vivax* aos fármacos em uso oficial no país. Assim, de acordo com as considerações anteriores, no âmbito deste estudo foram propostos os seguintes objectivos científicos específicos:

1. Determinar a prevalência da infecção individual e de infecções mistas, por *P. falciparum* e *P. vivax* em 6 regiões/distritos diferentes na RDTL.
 - a) Correlacionar a prevalência da infecção com os factores ambientais e sócio-económicos;
 - b) Determinar se existe uma possível relação entre as infecções detectadas na população humana e as infecções detectadas nos mosquitos capturados em 6 distritos na RDTL.
2. Determinar a prevalência alélica nos genes *pfprt*, *pfmdr1*, *pfdhfr*, *pfdhps* e *pfy-GCS* em diferentes regiões/distritos.
3. Determinar a prevalência alélica nos genes *pvdhfr* e *pvdhps* em diferentes regiões/distritos.