



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Marcadores moleculares de resistência de *Plasmodium falciparum* à Sulfadoxina-Pirimetamina após a mudança de políticas de tratamento da malária em Angola.

Gisela Aleixo Isidoro

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM PARASITOLOGIA
MEDICA**

JANEIRO DE 2018



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Marcadores moleculares de resistência de *Plasmodium falciparum* à Sulfadoxina-Pirimetamina após a mudança de políticas de tratamento da malária em Angola.

Autor: Gisela Aleixo Isidoro

Orientador: Professor Doutor Henrique Silveira

Coorientador: Professor Doutor Paulo Adão de Campos

Investigadora Doutora Maria de Fátima Nogueira

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

Agradecimentos

Ao meu Orientador Professor Doutor Henrique Silveira, pelo extraordinário empenho que dedicou a minha formação, a sua confiança, apoio, estímulo, a sua boa disposição ultrapassando em todos os aspetos, o que se espera de um orientador, os seus ensinamentos e orientação prestada, contribuíram para o meu crescimento curricular.

Ao meu coorientador Professor Doutor Paulo Adão pela colaboração prestada, por me dispensar as suas amostras e poder realizar este trabalho, sem as quais não seria possível.

A minha coorientadora Investigadora Doutora Maria de Fátima Nogueira, pelos ensinamentos, pela sua irreverência, pelo seu pragmatismo, entusiasmo e contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

A coordenadora deste Mestrado, a Professora Doutora Carla Sousa.

Todos os Professores e Investigadores do Mestrado de Parasitologia Médica.

A professora Luzia Gonçalves, os meus agradecimentos pelas suas sugestões na análise estatística deste trabalho.

Os meus colegas do mestrado, aos colegas de gabinete em especial à Joana, ao Hélio e a Lis, por toda ajuda e pela ótima convivência ao longo da realização do trabalho no Instituto de Higiene e Medicina do Trabalho.

O meu muito obrigada a todos os membros da UEI Parasitologia Médica, que de alguma forma contribuíram para que este trabalho se concretiza-se.

Ao Dr. Joaquim Agostinho, pelo seu apoio e orientação.

Ao Dr. Rui Viegas Pinto, Presidente do conselho de gerência, da Clínica Sagrada Esperança, Lda. - CSE, pelo apoio demonstrado e pelo incentivo na formação dos seus colaboradores.

Ao Professor Doutor Santos Nicolau, Decano da Faculdade de Medicina da Universidade Agostinho Neto – FM-UAN, pelo apoio, na realização deste mestrado.

A minha família por serem parte importante na minha vida, pelo apoio e confiança que sempre depositaram em mim, em especial a minha mãe pelo apoio incondicional.

Ao meu marido Jorge, aos meus filhos, Giann e Kayla, um agradecimento especial pelo apoio, e carinho diários, pelas palavras doces e pela transmissão de força e confiança em todos os momentos, vocês são o meu tudo.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para este trabalho e que apesar de não terem sido mencionadas, o seu contributo não foi de modo algum menos precioso.

RESUMO

Os marcadores moleculares de resistência de *Plasmodium falciparum* à sulfadoxina-pirimetamina após a mudança de políticas de tratamento da malária em Angola.

Gisela Aleixo Isidoro

A malária causada por *Plasmodium falciparum* é, entre as doenças infecciosas e parasitárias, uma das maiores causas de mortalidade mundial. O diagnóstico atempado e correto são elementos chave para um programa de controlo da malária bem-sucedido. No entanto, controlo e tratamento têm sido bastante dificultados pelo aparecimento e disseminação da resistência dos parasitas aos antimaláricos mais utilizados nas últimas décadas, nomeadamente a cloroquina. Este facto conduziu à introdução de outros antimaláricos (ex. pirimetamina e sulfadoxina), assim como a modificação de esquemas terapêuticos e a inclusão de novas associações. Nas áreas endémicas de África, das 5 espécies de *Plasmodium* que infetam o homem, *Plasmodium falciparum*, é o que representa maior prevalência e virulência, uma vez que desenvolveu resistência a maioria dos antimaláricos atualmente em uso. De todos os grupos de risco, na mulher grávida a malária é considerada um grave problema de saúde pública pelas consequências que podem ocorrer tanto na mãe como no feto. O tratamento intermitente preventivo (TIP) com sulfadoxina e pirimetamina (SP) para grávidas foi uma das estratégias adotadas pela Organização Mundial de Saúde neste grupo de risco. A resistência aos fármacos utilizados tem colocado em causa esta intervenção e pode ter impacto na sua eficácia e custo-benefício, pelo que é fundamental a caracterização dos marcadores moleculares que estão na sua origem. A resistência à SP utilizada no TIP na grávida tem vindo a aumentar e surge com a presença de mutações pontuais nas regiões codificantes de 2 genes, o dihidrofolato redutase (*dhfr*) e o dihidropteroato sintase (*dhps*), assim, é importante perceber qual o papel que o sequestro na placenta poderá desempenhar no aparecimento/manutenção da resistência a estes fármacos. Este estudo envolveu mulheres grávidas em trabalho de parto nas Maternidades Lucrecia Paím e Hospital Geral Especializado Augusto Ngangula, de Abril de 2006 a Fevereiro de 2008, com o objetivo de caracterizar a malária placentária por *P. falciparum* em Luanda, Angola. Nas amostras positivas por PCR foi efetuada a caracterização da prevalência de marcadores de resistência através da técnica de sequenciação genética pelo método de Sanger, para detetar as mutações A16V, N51I, C59R, S108N e I164L no *pfdhfr* e S436A, A437G, K540E, A581G e A613S/T no *pfdhps*. Das 81 mulheres com amostras de sangue de 3 compartimentos (cordão umbilical, sangue periférico, e placenta), observou-se uma prevalência dos SNPs no gene *pfdhfr* 108N de 96%, 51I de 89,2% e 59R de 40,5%, no gene *pfdhps* 437G de 98,2%, 540E de 19,3%. Dos haplótipos 51I/59R/108N de 29,7%, do 437G/540E 19,3% e 20% de prevalência do quintuplo mutante *pfdhfr/pfdhps* 51I/59R/108N/437G/540E. Estes resultados sugerem que o uso de SP para o TIP em Angola é viável.

Palavras-chaves: Angola, Malária, Grávida, SP-TIP, *P. falciparum*, Marcadores de Resistência, Genes *pfdhfr* e *pfdhps*.

ABSTRACT

Resistance molecular markers of *Plasmodium falciparum* to sulfadoxine-pyrimethamine after the change of malaria treatment policies in Angola.

Gisela Aleixo Isidoro

Malaria caused by *Plasmodium falciparum* is one of the major causes of worldwide mortality among infectious and parasitic diseases. Early and correct diagnosis, are the key element for a successful malaria control program. However, the control and treatment have been greatly hampered by the appearance and dissemination of parasite resistance to the most commonly used antimalarials in recent decades, namely chloroquine. This fact led to the introduction of other antimalarials (eg. pyrimethamine and sulfadoxine), as well as to a modification of therapeutic schemes and the inclusion of new associations. In endemic areas of Africa, among the 5 *Plasmodium* species that infect humans, *P. falciparum*, is the one that represents greater prevalence and virulence, since it developed resistance to most of the antimalarials currently in use. Malaria in pregnant woman, is considered a serious public health problem because of the consequences on both the mother and the fetus. Intermittent preventive treatment with sulphadoxine and pyrimethamine (SP) was one of the strategies adopted by the World Health Organization to control the disease in this risk group. The resistance to the currently available drugs has been challenging this intervention and may impact on its efficacy and cost-effectiveness, so it is fundamental to characterize the molecular markers that are at its origin. The resistance to SP used in TIP in the pregnant women has been increasing and arises with the presence of point mutations in the coding regions of 2 genes, dihydrofolate reductase (*dhfr*) and dihydropteroate synthetase (*dhps*), so, it is important to understand which is the role that sequestration in the placenta may play in the onset / maintenance of resistance to these drugs. This study involved pregnant women in labor at the Lucrecia Paím Maternities and Augusto Ngangula General Specialized Hospital, from April 2006 to February 2008, with the objective of characterizing placental malaria by *P. falciparum* in Luanda, Angola. In the PCR-positive samples, the prevalence of resistance markers was determined using the Sanger method to detect the mutations A16V, N51I, C59R, S108N and I164L in *pf dhfr* and S436A, A437G, K540E, A581G and A613S/T in *pf dhps*. Of the 81 women with 3 compartment (blood samples, umbilical cord, peripheral blood, and placenta), a prevalence of SNPs in the *pf dhfr* gene 108N with 96%, 51I with 89,2% and 59R 40,5%. In the *pf dhps* gene 437G with 98,2%, 540E with 19,3%. Of the haplotypes 51I / 59R/108N with 29,7%, of the 437G/540E with 19,3% and 20% of the quintuple mutant prevalence of *pf dhfr/pf dhps* 51I/59R/108N/437G/540E. These results suggest that the use of SP for TIP in Angola needs to be reviewed.

KEYWORDS: Angola, Malaria, Pregnant woman, SP-IPTp, *P. falciparum*, Resistance Markers, *pf dhfr* and *pf dhps* Genes.

Índice	
Agradecimentos	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
1 Introdução.....	2
1.1 Malária	2
1.2 O parasita da Malária – <i>Plasmodium falciparum</i>	3
1.2.1 Classificação sistemática	3
1.2.3 Diversidade genética de <i>Plasmodium falciparum</i>	6
1.3 Malária em Angola, situação atual.....	6
1.4 Malária na gravidez.....	8
1.4.1 Malária Placentária e Periférica	11
1.4.2 A infecção placentária e o Recém-Nascido (cordão umbilical)	12
1.5 Prevenção da malária na gravidez.....	13
1.5.1 Efeito da resistência dos fármacos antimaláricos ao nível do controlo da malária durante a gravidez.....	14
1.6 Objetivos	16
2 Material e Métodos.....	17
2.1 Considerações éticas	17
2.2 Desenho do estudo	17
2.3 Área e população de estudo.....	17
2.4 Material biológico	17
2.5 Extração de DNA e deteção de <i>Plasmodium</i> por PCR	18
2.6 PCR - <i>Polymerase Chain</i>	19
2.5.1 Eletroforese em gel de agarose	21
2.5.2 Purificação do Produto de PCR	21
2.7 Sequenciação e deteção das mutações nos genes <i>pfdhfr</i> e <i>pfdhps</i>	21
2.8 Análise estatística.....	22
3 Resultados.....	23
3.1 Características das amostras.....	23
3.2 Amplificação dos fragmentos de interesse do Genes <i>pfdhfr</i> e <i>pfdhps</i> por PCR	

3.3	Estudo dos polimorfismos no gene <i>pfdhfr</i>	24
3.4	Estudo dos polimorfismos no gene <i>pfdhps</i>	27
3.5	Estudo dos polimorfismos e haplótipos nos genes <i>pfdhfr</i> e <i>pfdhps</i> em relação à paridade	30
3.6	Estudo dos polimorfismos e haplótipos nos genes <i>pfdhfr</i> e <i>pfdhps</i> nos diferentes compartimentos estudados – placenta, sangue periférico e sangue do cordão umbilical.....	31
3.7	Prevalência dos polimorfismos e haplótipos nos genes <i>pfdhfr</i> e <i>pfdhps</i> nos diferentes grupos de fármacos usados durante a gestação.	37
4	Discussão e Conclusão	41
5	Considerações Finais	51
6	Referências Bibliográficas.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl - microlitro
% - Percentagem
a.a - aminoácido
bp - Pares de bases
CA - Cloroquina e Amodiaquina
CMDT - Centro de Malária e Outras Doenças
Cu - Cordão Umbilical
CQH - Cloroquina, Quinino e Halfan
DHFR - Dihidrofolato redutase
DHPS - Dihidropteroato sintetase
DNA - Ácido Desoxirribonucleico trifosfato
dNTPs - 3'-desoxinucleósido - 5'-trifosfato – Ácido Desoxirribo
EDTA - Ácido Etileno Diamino Tetra Acético
g - gramas
h - hora
HGEAN - Hospital Geral Especializado Augusto Ngangula
HIV - Human Immunodeficiency Virus
IC - Intervalo de confiança 95%
IHMT - Instituto de Higiene e Medicina Tropical
TIPc - Tratamento Preventivo Intermitente na criança
TIP - Tratamento Preventivo Intermitente na grávida
mg - miligrama
min - Minuto
ml - mililitro
MLP - Maternidade Lucrecia Paim
MUT - Mutante
°C - Graus Centígrados
OMS - Organização Mundial da Saúde
PAM - Pregnancy-associated malária
PBS - *Phosphate Buffered Saline* / Tampão fosfato salino
PCR - "Polimerase Chain Reaction / Reação em cadeia da Polimerização
Pl - Placenta

Q - Quinino

R. Angola - Republica Popular de Angola

rpm - Rotações por minuto

SNPs - *Single Nucleotide Polymorphism* / polimorfismo pontual

Sp - Sangue Periférico

SP - Sulfadoxina - Pirimetamina (Fansidar)

SPQ - Sulfadoxina - Pirimetamina e Quinino

SPC - Sulfadoxina – Pirimetamina e Cloroquina

SPA - Sulfadoxina – Pirimetamina e Amodiaquina

TBE - Tampão constituído por Tris, ácido bórico e EDTA

TE - Tampão de eluição constituído por Tris EDTA

U - Unidades

UEI – Unidade de Investigação e Ensino

UNL – Universidade Nova de Lisboa

UV – Luz Ultra Violeta

V – Volt

WHO – World Health Organization

WT – Wild Type

1-Introdução

1 Introdução

1.1 Malária

A malária é um problema de saúde pública mundial, que afeta 107 países (90% África subsariana, com 20% de mortalidade infantil), 216 milhões de casos/ano e 650.000 morte/ano (WHO Malaria Report 2011). Em 2016, foram estimadas 445.000 mortes por malária a nível global, em comparação com as 446.000 mortes estimadas em 2015, a região Africana da OMS, representou 91%, a região da Asia do sudeste asiático 7%, e a região do Mediterrâneo oriental 2%. Todas as regiões registaram reduções da mortalidade em 2016, em relação a 2010 (Sudeste Asiático 44%, Africa 37% e Américas 27%, com exceção da região do Mediterrâneo Oriental da OMS). No entanto as taxas de mortalidade entre 2015-2016, permaneceram praticamente inalteradas, nas regiões da OMS do Sudeste Asiático, Pacífico Ocidental e África, aumentando no Mediterrâneo Oriental e nas Américas. Em 2016, estimou-se que ocorreram 216 milhões de casos de malária em todo o mundo, em comparação com 237 milhões em 2010 e 211 milhões de casos em 2015 (*World Malaria Report*, 2017).

A malária durante a gravidez é considerada um sério problema de saúde pública na África subsariana, sendo a causa de morbidade e mortalidade materna e fetal a nível da África subsariana. Apesar de assintomática, e frequentemente subvalorizada representa um risco acrescido para a mãe, o feto e o recém-nascido.

Uma das consequências clínicas é a anemia materna, baixo peso à nascença, abortos, baixo desenvolvimento intra-uterino, partos prematuros e nados mortos. Estima-se que está contribui com cerca de 75.000-200.000 mortes perinatais/ano e 10.000 mortes maternas. Cerca de 50 milhões de grávidas estão expostas a malária, o que à torna na infeção parasitária mais comum e recorrente que diretamente afeta a placenta (Steketee, *et al.*, 2001, Guyatt, *et al.*, 2004, Brabin, *et al.*, 2004) e cerca de 100 mil crianças morrem por ano devido aos efeitos adverso da doença (*World Malaria Report*, 2017).

Para proteger as mulheres que vivem em países com transmissão moderada e alta de malária em África, a OMS desde outubro de 2012, recomenda "Tratamento Intermitente Preventivo da malária durante a gravidez" (TIP), para prevenir a malária por *Plasmodium falciparum*, com sulfadoxina-pirimetamina (SP), a todas as mulheres

grávidas nas consultas pré-natal, iniciando o mais cedo possível no segundo trimestre. Cada dose de SP deve ser administrada com pelo menos 1 mês de intervalo, com pelo menos 3 doses durante a gravidez. Entre os 23 países africanos que relataram os níveis de cobertura do TIP em 2016, estima-se que 19% das mulheres grávidas elegíveis receberam as três ou mais doses recomendadas de TIP, em comparação com 18% em 2015 e 13% em 2014 (WHO, *world Malaria Report*, 2017).

A malária placentária, é uma complicação da malária na gravidez. A região com maior impacto de transmissão é a África subsariana, onde esta patologia é considerada grave nas regiões de transmissão estável, é particularmente frequente e mais grave nas primíparas (mães pela primeira vez) do que nas múltiparas (mulheres que já estiveram grávidas em ocasiões anteriores) (Riley *et al.*, 1989, Matteelli *et al.*, 1997, Harrington *et al.*, 2009). Pode encontrar-se parasitas sequestrados na placenta sem que sejam patentes no sangue periférico (Beeson *et al.*, 2002).

Embora, a malária na gravidez tem sido bem documentada em muitos países africanos, assim como, o impacto da malária placentária em zonas urbanas de África, em Luanda-Angola, estudos que se refiram a malária na mulher grávida, são escassos (Twing *et al.*, 2009) apesar de necessários para as tomadas de decisões no âmbito da prevenção e do controlo da mesma.

O estudo realizado por Valente e colaboradores (2011) mostrou que infeção placentária em Luanda era mais comum em mulheres jovens (≤ 18 anos) e primíparas que viviam em zonas periurbanas, revelando serem dados importantes para as políticas de controlo da malária em Angola.

1.2 O parasita da Malária – *Plasmodium falciparum*

1.2.1 Classificação sistemática

A malária é uma doença infecciosa, causada por protozoários unicelulares, que de acordo com Ayala *et al.* (1998), pertence ao Reino protista, Filo Apicomplexa, Classe Hematozoa, Ordem Coccidiida, Sub-ordem Haemosporidiidea, Família Plasmodiidae, Género *Plasmodium* e é transmitida pela picada de mosquitos fêmeas do género *Anopheles*. Podendo, no entanto, ser transmitida também através da exposição a

produtos de sangue infetado (transfusão sanguínea) e por transmissão congênita (Trampuz *et al.*, 2003).

São 5 as espécies reconhecidas como agentes etiológicos da malária humana com distintos padrões da doença e distribuição geográfica: *Plasmodium malariae* (Laveran, 1880), região tropical e subtropical, *Plasmodium vivax* (Grassi, Feletti, 1890), região tropical, subtropical e zonas temperadas, *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897), região tropical/subtropical, *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922), África ocidental tropical e pacífico ocidental, e o *Plasmodium knowlesi* (Chin *et al.*, 1968, Marcelo *et al.*, 2003), Sudoeste Asiático.

De todas as espécies descritas, *P. falciparum* é o mais virulento e o que predomina nas áreas endêmicas de África, representando cerca de 80%-90% das infecções, e responsável pela maioria das mortes associados a malária (WHO, *world Malaria Report*, 2017). Do ponto de vista clínico, em relação as outras espécies, é a que tem capacidade de produzir a forma mais grave da doença, a malária cerebral e de desenvolver rapidamente resistências aos diversos antimaláricos em uso (Marcelo *et al.*, 2003).

1.2.2 - Ciclo de vida do *Plasmodium* sp

O ciclo de vida do *Plasmodium* sp., inclui duas fases: fase esporogónica, com multiplicação do parasita no hospedeiro invertebrado (Género *Anopheles*), e a fase esquizogónica, com multiplicação no hospedeiro intermediário vertebrado (*Homo sapiens*) (Figura 1) (Gilles, 1989; Knell, 1988; Bruce-Chwatt *et al.*, 1970).

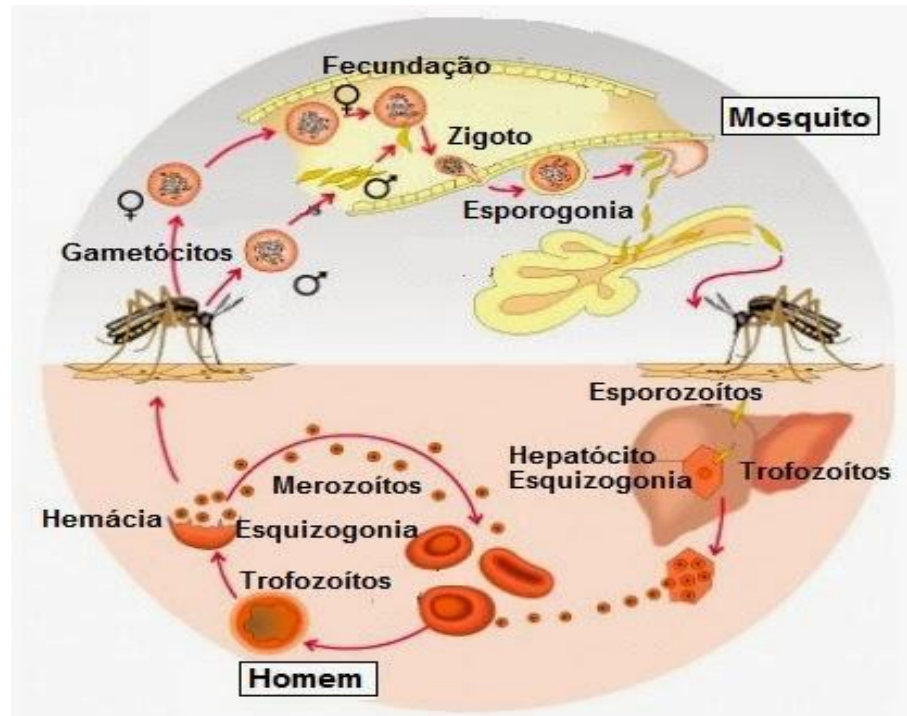


Figura 1. Ciclo de vida do *Plasmodium* sp (Adaptada de <http://www.abcdamedicina.com.br/malaria-ciclo-de-contaminacao-profilaxia-sintomas-e-tratamento.html>, acessado a 01/02/2017).

A fase da fertilização ocorre após o mosquito *Anopheles* fêmea se alimentar de sangue de uma pessoa infetada (hospedeiro vertebrado). Os gametócitos libertam-se dos eritrócitos e iniciam a fertilização no lúmen do intestino médio do mosquito. Os gametócitos masculinos produzem até 8 microgâmetas flagelados que se separam e movimentam livremente até ao macrogâmeta (gâmeta feminino). A fertilização tem lugar no lúmen do estômago dando origem à uma única estrutura diplóide em todo o ciclo de vida do *Plasmodium*, o zigoto. É nesta fase que ocorre a meiose. O zigoto dá origem ao oocineto, um corpo invasivo que atravessa o epitélio intestinal do mosquito e se aloja na parede externa, onde se diferencia em oocisto, onde o parasita sofre uma série de mitoses originando formas móveis, os esporozoítos. Dependendo das condições ambientais, um oocisto pode produzir milhares de esporozoítos.

Após maturação, o oocisto rompe-se e liberta os esporozoítos que vão migrar através do hemocélio do mosquito até invadirem as glândulas salivares. Este processo dura aproximadamente 2 semanas, dependendo da temperatura ambiente. Na picada posterior a estas duas semanas o mosquito inocula esporozoítos na corrente sanguínea, estes rapidamente atingem os hepatócitos, iniciando assim a esquizogonia hepática. Os esporozoítos diferenciam-se em trofozoítos hepáticos que por sua vez originam

esquizontes hepáticos ou pré-eritrocitários. Estes sofrem sucessivas divisões por mitose e produzem milhares de novas formas invasivas, os merozoítos.

Os merozoítos são libertados na circulação sanguínea, dando início à esquizogonia eritrocitária. Em *P. ovale* e *P. vivax* alguns trofozoítos hepáticos originam hipnozoítos que são formas latentes e podem iniciar novos ciclos eritrocitários meses ou mesmo anos após a infeção inicial ter ocorrido. O merozoíto invade o eritrócito originando os estádios de desenvolvimento: anel, trofozoíto e esquizonte. O trofozoíto inicia um processo de divisão e origina os esquizontes eritrocitários. O eritrócito rompe e liberta 8-16 merozoítos que, uma vez na circulação sanguínea, vão invadir outros eritrócitos. São estes ciclos de multiplicação, no sangue, que provocam as febres periódicas características da malária. Alguns merozoítos diferenciam-se nas formas sexuadas do parasita, gametócitos. Estes demoram cerca de quatro dias para amadurecerem, mas depois ficam dormentes até à ingestão pelo mosquito, reiniciando assim o ciclo de transmissão (Knell, 1991).

1.2.3 Diversidade genética de *Plasmodium falciparum*

São três os diferentes locais celulares onde o material genético do *Plasmodium* se encontra organizado (Wilson *et al.*, 1991): a) mitocôndria, que contém os genes, que codificam as proteínas de enzimas responsáveis pelo transporte de eletrões; b) apicoplasto, que contém os genes que codificam principalmente rRNA, tRNA e proteínas e lípidos; c) núcleo, constituído por 14 cromossomas. O desenvolvimento das técnicas de amplificação de DNA, por PCR, veio confirmar a grande variabilidade genética deste parasita, assim como, o elevado número de polimorfismos, mesmo em regiões geográficas de baixa transmissão (Babiker & Walliker, 1997).

1.3 Malária em Angola, situação atual

A WHO estima que em Angola tenham surgido 3,8 milhões de casos confirmados notificados e 15,997 mortes em 2016 (http://www.who.int/malaria/publications/country-profiles/profile_ago_en.pdf, acessado em 19/04/2018).

A malária ainda é a primeira causa de morte, de consultas médicas e de absentismo laboral e escolar, sendo uma das principais causas de morbidade perinatal, de baixo peso à nascença, de anemia em mulheres grávidas e de mortalidade materna, tornando-se um desafio para as autoridades sanitárias, pois representa cerca de 35% da procura de cuidados curativos, 20% de internamentos hospitalares, 40% das mortes perinatais e 25% de mortalidade materna (Ministério da Saúde da República de Angola, 2014).

Em Angola a malária é endémica nas 18 províncias do país, é a doença que mais mata, tornando-se um desafio para as autoridades sanitárias. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a transmissão é mais elevada nas províncias de Cabinda, Uíge, Malange, Kuanza Norte, Lunda Norte, Lunda Sul e com surtos epidemiológicos as províncias de Namibe, Cunene, Huíla e Cuando Cubango. A infeção e transmissão são mais problemáticas durante a estação das chuvas, com pico entre os meses de janeiro e maio. No entanto, a falta de saneamento básico, no país acaba por estar na origem dos muitos casos diagnosticados. *Plasmodium falciparum* é a espécie mais predominante em Angola (Inquérito de Indicadores da Malária em Angola, 2011), é o mais virulento das 5 espécies que causam malária nos seres humanos (Harrington *et al.*, 2009).

Estudos efetuados por Alonso e colaboradores (1991), Nevill e colaboradores (1996), corroboram que o uso de redes mosquiteiras tratadas com inseticida, é uma das formas mais eficazes na prevenção da malária. A mortalidade infantil por malária pode ser reduzida em 20% pelo uso de redes mosquiteiras (Lengeler, 2004). Mas em zonas do interior do país, muitos pescadores usam essas redes mosquiteiras para a pesca, ignorando completamente a sua utilidade na luta contra a malária (Cosep Consultoria, Consaúde e ICF Macro, 2011).

Existem 4 regiões de endemicidade em Angola, segundo o Programa Nacional de Controlo da Malária: Região hiperendémica, com maior prevalência, onde há alta transmissão durante todo o ano, região mesoendémica estável, onde a transmissão é relativamente baixa, por outro lado os níveis de transmissão da região mesoendémica instável variam de acordo com a época do ano (Fig. 2), (Cosep Consultoria, Consaúde e ICF Macro, 2011).

Em Luanda a prevalência da malária, segundo os Inquéritos de Indicadores de Malária (IIMA de 2011, <https://dhsprogram.com/pubs/pdf/MIS10/MIS10.pdf>, acessado em 13/02/2017) é a mais baixa do país, isto deve-se a Luanda ser a cidade mais urbanizada do país.



Figura 2. Distribuição das 4 regiões de endemicidade em Angola.

1.4 Malária na gravidez

As mulheres grávidas apresentam maior vulnerabilidade de contrair a infeção por *Plasmodium* uma vez que o seu sistema imunológico se encontra mais vulnerável nesta fase, devido a depressão transitória da imunidade durante a gravidez (Alvarez, *et al.*, 2005), aumentando o risco de desenvolver anemia grave que pode eventualmente causar a morte, aborto espontâneo, nados mortos, parto prematuro e baixo peso à nascença (Ofori *et al.*, 2009). As mulheres principalmente na primeira e segunda gravidez, são particularmente mais vulneráveis em contrair a infeção por malária e correm maior risco destas complicações, uma vez que o desenvolvimento da imunidade anti-parasitária de

ligação à placenta, mediado pela expressão do parasita a um antígeno de superfície variante específico da gravidez (VAR2CSA), na superfície dos glóbulos vermelhos que se ligam ao Sulfato de Condroitina A (CSA), glicosaminoglicano identificado como recetor para adesão placentária, só é adquirida com gravidezes subsequentes (Omer *et al.*, 2017).

A malária durante a gravidez é caracterizada pelo sequestro de eritrócitos infetados (IEs) em espaços intervilositários da placenta que se ligam ao CSA, resultando em malária placentária (PM). Soros testados de mulheres múltíparas do Quênia e da Tailândia, continham anticorpos que inibiam a ligação dos eritrócitos parasitados ao CSA (Fried *et al.*, 1998).

Uma das metas do Plano Estratégico Global para fazer recuar a malária 2005 – 2015, era o Tratamento Intermitente Preventivo (TIP), até 2010, de 80% das mulheres grávidas das áreas de transmissão estável visando o aumento proporcional das intervenções de tratamento e prevenção comprovadas (France *et al.*, 2008).

Em 2006, uma das diretrizes da OMS, para a redução da malária durante a gravidez, esta relacionada com a implementação de três elementos, que ajudariam na prevenção e tratamento da malária:

- Utilização de redes mosquiteiras tratadas com inseticida (MTLI);
- TIP com sulfadoxina associada à pirimetamina;
- Diagnóstico precoce e rápida gestão dos casos.

O uso de TIP com SP em mulheres grávidas foi introduzido em Angola em 2006 pelo Programa Nacional de Controlo da Malária, no segundo trimestre da gravidez, em 2011 atingiu taxa de cobertura de 45% (Ministério da Saúde da Republica de Angola, 2014), e atualmente esta estratégia foi tida em consideração para o controlo da malária em crianças (Fortes *et al.*, 2011).

De acordo com o Programa Nacional de Controlo da Malária em Angola o TIP consiste em duas doses de SP entre a 20^a a 32^a semana e a partir do 4^o e 7^o mês pela OMS. O TIP é um tratamento profilático, impedindo que a grávida desenvolva a doença, levando a interrupção da infeção placentária assim como, os efeitos adversos para o feto.

Um inquérito de indicadores de malária foi realizado em Angola em 2011 (Cosep Consultoria, Consaúde e ICF Macro, 2011), em mulheres em idade fértil, entre os 15 e

os 49 anos. A amostra foi concebida para abranger a nível nacional a população rural e urbana, as regiões hiperendémicas, mesoendémica estável e instável e a província de Luanda, tendo resultado 8.589 questionários.

A avaliação do uso do TIP foi um dos objetivos do inquérito, tendo concluído que 29% das mulheres em Luanda receberam o TIP durante uma consulta pré-natal, comparando com 11% das mulheres da região hiperendémica, 13% na região mesoendémica estável e 23% na mesoendémica instável. A meta até 2017-2025 é de garantir uma cobertura de 80% e 90%, respetivamente, com TIP nas mulheres grávidas nas consultas, segundo dados publicados pelo Plano Nacional de Saúde de Angola 2015-2025 (Ministério da Saúde da República de Angola, 2014).



Figura 3. Distribuição da percentagem de mulheres grávidas com TIP nos anos de 2006/07 e 2011 em Angola. <https://dhsprogram.com/pubs/pdf/MF5/GF23.pdf>, acedido em 13/02/2017.

Apesar de existirem mais infeções com malária nas áreas estáveis, muitas grávidas com parasita da malária não apresentam sintomas, isto acontece porque estas mulheres apresentam alguma imunidade, que diminui a probabilidade de malária grave, não obstante é importante referir que a saúde da grávida e do feto podem estar afetadas (France *et al.*, 2008).

Os fatores que influenciam a prevalência da malária nas mulheres grávidas, são a idade materna, a paridade, o uso de profilaxia, nutrição, a genética do hospedeiro, o nível de imunidade anti-parasitaria, bem como a genética do parasita (Tako *et al.*,

2005). As mulheres grávidas que vivem em áreas de baixa transmissão apresentam maior risco de desenvolverem a doença grave (por apresentarem imunidade insuficiente), associada a uma anemia grave e consequências severas para o feto, ao contrário das que vivem nas áreas de transmissão estável, que desenvolvem imunidade, não apresentando sintomas clínicos durante esse período (Desai *et al.*, 2007).

1.4.1 Malária Placentária e Periférica

A relação entre a infecção periférica e a placentária na malária já foi avaliada em algumas regiões de África subsariana. Esses estudos mostraram que existe uma relação com a malária adquirida durante a fase tardia da gravidez e a positividade do esfregaço placentário ou a presença de pigmento (Watkinson *et al.*, 1983).

É na placenta que o embrião e feto crescem e se desenvolvem durante a gravidez, e é ela que assume as características de vários órgãos da vida extrauterina. A sua função é de absorção de nutrientes, excreção de desperdícios e o transporte de gases, em conjunto com os rins, pulmões e intestinos. Além disso tem um papel de síntese hormonal bem como atividade metabólica que mais tarde será do fígado (Netter, 1965). É ainda indispensável, para a sustentação do crescimento fetal durante a gestação, pois qualquer defeito funcional pode levar a baixo crescimento e morte fetal (Jansson & Powell, 2007).

A infecção placentária tem sido utilizada como indicador, para a caracterização da infecção na mulher grávida em investigações epidemiológicas (Uneke, 2007). Os parasitas podem ser sequestrados em grande quantidade na placenta, sem que se encontre um no sangue periférico (Beeson, 2002).

A malária placentária é reconhecida como uma complicação da malária na gravidez em áreas de transmissão estável, sendo frequente e grave em primíparas, devido principalmente, à anemia na mulher e ao baixo peso do feto à nascença (Matteeli *et al.*, 1994).

Nas áreas de transmissão instável, as mulheres grávidas são suscetíveis a todas as manifestações da malária grave por *P. falciparum* e apresentam duas a dez vezes maior mortalidade em relação as não grávidas (Brabin, 1983).

Estudos recentes, sugeriram que não há um padrão temporal claro de uma infecção periférica, que resulte em infecção placentária, apoiando a hipótese de que as mulheres correm risco de desenvolver infecção placentária durante a gravidez. Apesar das limitações da genotipagem das amostras da placenta, os resultados tiveram uma forte base fisiopatológica. Nem todas as infecções periféricas levam ao sequestro placentário, devido a resposta dos anticorpos maternos a antígenos de superfície específicos do parasita na gravidez. (Cohee *et al.*, 2016). Em estudos anteriores a ocorrência de parasitemia periférica no início e no termo da gravidez foi significativamente relacionada com a malária placentária e considerou-se que a malária periférica, adquirida no meio da gravidez não estava relacionada com a malária placentária (Cottrell *et al.*, 2005). Ainda esse estudo sugere que a malária adquirida no início da gravidez, permanece ao longo da gravidez na placenta, com consequências possivelmente graves para o recém-nascido e para a placenta (Cottrell *et al.*, 2005).

A malária periférica no início da gravidez pode ser um fator de risco importante para a infecção placentária, devido à baixa proteção imunitária, levando a consequências graves para a placenta e no recém-nascido. Devido ao facto de os parasitas serem sequestrados na placenta, e a falha no diagnóstico resultar num tratamento inadequado, pode causar anemia grave e levar à morte, assim como outras complicações obstétricas tais como pré eclâmpsia/eclâmpsia e hemorragia pós-parto (Dorman *et al.*, 2000, Mockenhaupt *et al.*, 2006).

1.4.2 A infecção placentária e o Recém-Nascido (cordão umbilical)

A malária é considerada congénita no recém-nascido quando a presença das formas assexuadas do *P. falciparum* são detetados no sangue periférico durante a primeira semana de vida do mesmo (Falade *et al.*, 2007). A malária do cordão umbilical é comum (Tobian *et al.*, 2000 e Kamewendo *et al.*, 2002), no entanto a doença clínica nos recém-nascidos é rara, resultado de uma eficiente barreira placentária e transferência de anticorpos maternos, que oferecem alguma proteção ao recém-nascido até as 6 meses de idade (Snow *et al.*, 1998).

Os efeitos da malária no feto ou no recém-nascido, estão dependentes de mecanismos variáveis, desde a malária grave materna, danos na circulação placentária, ou diretamente da infecção, provocando sofrimento fetal, atraso no crescimento intrauterino ou morte fetal por sequestro dos parasitas na placenta (Unek, 2007). Em seguida, a placenta pode estar diretamente infetada, podendo resultar numa insuficiência da circulação sanguínea na placenta dificultando as trocas entre a mãe e o feto. E o feto pode estar diretamente infetado através da circulação placentária, outras vezes a infecção materna pode induzir o parto prematuro, levando a intolerância do feto a vida intrauterina (Menendez & Mayor, 2007).

A malária congênita é no entanto, a manifestação menos conhecida da malária e uma área de pesquisa muito negligenciada, a informação existente é limitada por relatos de crianças que nasceram de mulheres não imunes. Com o uso das técnicas de biologia molecular, tem sido possível detetar, a infecção congênita em crianças que nasceram de mulheres semi-imunes de países endêmicos. No entanto, são necessárias mais pesquisas para estabelecer recomendações preventivas e de manuseamento adequadas de forma a evitar essa consequência da malária na gravidez. Na infecção congênita podem surgir sintomas clinicamente relevantes em alguns casos, tais como febre alta e convulsões, anemia, h pato-esplenomegalia, icterícia, anorexia, v mitos, diarreia, sonolência, palidez, dificuldade respiratória e cianose (Menendez & Mayor, 2007).

Para o diagnóstico diferencial da febre neonatal, a malária cong nita é um fator importante nos países endêmicos, uma vez que os sintomas graves são raros e, portanto, não parece constituir uma epidemia no presente. A malária durante a gravidez, está associada a episódios anteriores, assim como, episódios clínicos de malária, em crianças (Schwarz *et al.*, 2008 e Le port *et al.*, 2011).

1.5 Preven o da malária na gravidez

Um dos maiores desafios para o controlo da malária nas regiões end micas é o surgimento e dissemina o da resistência aos antimaláricos. A sulfadoxina-pirimetamina (SP), foi implementado como Tratamento Preventivo Intermitente (TIP) durante a gravidez, de forma a evitar os danos causados a grávida e ao seu recém-

nascido. A sua eficácia, no entanto, é ameaçada pela resistência dos parasitas à SP, que pode ser estimada pela prevalência das mutações da dihidropteroato sintase (*dhps*) e dihidrofolato redutase (*dhfr*) (Marc *et al.*, 2015). Em Angola a SP-TIP, foi introduzida em 2006, pelo Programa Nacional de Controlo da Malária (Fortes *et al.*, 2011).

1.5.1 Efeito da resistência dos fármacos antimaláricos ao nível do controlo da malária durante a gravidez

Desde 2002, a OMS recomendou que TIP seja administrado a todas as mulheres grávidas, e que o tratamento inicie mais cedo possível no segundo trimestre (OMS, 2010).

A monitorização da prevalência dos marcadores moleculares de resistência ao tratamento com SP é essencial para estimar a eficácia desta política de tratamento, (Nzila *et al.*, 2000). O surgimento e a propagação de resistência aos antimaláricos representam um dos maiores desafios para o controlo da malária em regiões endêmicas. O TIP com SP está implantado para evitar os efeitos adversos da malária na mãe e no feto. No entanto, a sua eficácia é ameaçada pela resistência à SP, que pode ser estimado pela prevalência das mutações nos genes *pfdhps* que confere resistência à sulfadoxina e *pfdhfr* à pirimetamina (Marc *et al.*, 2015), além da possibilidade de que o TIP possa selecionar alelos de resistência ao parasita, também existe a hipótese de que o TIP pode modificar a dinâmica da população de parasitas nos espaços vasculares maternos da placenta, onde os eritrócitos parasitados por *Plasmodium falciparum* são sequestrados e aderem (Harrington *et al.*, 2009).

A resistência de *P. falciparum* a pirimetamina, mostrou-se devido a mutações no gene *pfdhfr*, principalmente pela substituição da asparagina (A) do alelo selvagem Ser108Asn no codão 108 do *pfdhfr* por mutação *pfdhfr* 108N, parece ser suficiente para conferir resistência à pirimetamina (Mockenhaupt *et al.*, 2001) Este fato, explica a razão pela qual a resistência do parasita tenha surgido imediatamente após início do uso deste fármaco como terapêutica da malária (Mayor *et al.*, 2001).

A substituição de asparagina por isoleucina no codão 51 (N51I) e cisteína por arginina no codão 59 (C59R), juntamente com a mutação a S108N, conferem elevados níveis de resistência a pirimetamina (Kublin *et al.*, 2002), quando comparada com a

mutação S108N por si só (Tarnchompoo *et al.*, 2002). Quando se junta a mutação do codão 164 (I164L), a sequência anterior, tem sido associada a um elevado grau de resistência a este fármaco (Plowe *et al.*, 1997).

As mutações A437G e K540E no gene *pfdhps* desempenham um papel mais relevante na resistência a sulfadoxina entre os parasitas africanos. Na África Oriental e do Sul, estas mutações são frequentemente encontradas em conjunto, enquanto na África Ocidental e Central estão separadas e a mutação 437G aparece isoladamente em maior frequência (Pearce *et al.*, 2009, Naidoo & Rope, 2013). Um indicador de falência terapêutica do tratamento de *P. falciparum* com SP é o designado quintuplo mutante (Mishra *et al.*, 2016).

A eficácia *in vivo* do TIP-SP em grávidas é mantida tanto na presença do triplo mutante *pfdhfr* - 51I/59R/108N como do mutante quádruplo (*pfdhfr* - 51I/59R/108N + *pfdhps* 437G). A eficácia *in vivo* de SP é menor em áreas com alta frequência do mutante quintuplo (com uma mutação adicional *pfdhps* - K540E). Esta menor eficácia reflete a capacidade reduzida de SP para eliminar a infecção patente bem como uma redução na capacidade de prevenir novas infecções, em relação às áreas com baixa resistência à combinação SP (Desai *et al.*, 2016). Apesar de pouco frequentes em África, o haplótipo de resistência sêxtuplo está presente (uma mutação adicional *pfdhps* 581G), apresenta reduzida (Harrington *et al.*, 2009), ou mesmo ausência total de suscetibilidade à SP (Harrington *et al.*, 2011, Gutman *et al.*, 1997-2005).

A prevalência de mutações de resistência, é definida pela proporção de seres humanos infetados que transportam pelo menos um clone de parasita mutante. No entanto, a interpretação desses dados é complicada pelos indivíduos que se apresentam infetados com múltiplos clones de parasitas, especialmente em áreas de alta transmissão. Já frequência de resistência na população de parasitas, é definida como a proporção de clones de parasitas que possuem um marcador de resistência, geralmente não é a mesma que a prevalência de resistência em seres humanos infetados. Tanto a prevalência como a frequência de resistência, podem ser clinicamente relevantes para o TIP em mulheres grávidas como para em crianças (Lucy *et al.*, 2017).

1.6 Objetivos

Objetivo geral

Caracterizar a resistência à Sulfadoxina e Pirimetamina na infecção placentária por *Plasmodium falciparum*

Objetivos específicos:

- Determinar a frequência de polimorfismos genéticos associados à resistência aos fármacos: Sulfadoxina e Pirimetamina, em mulheres grávidas primíparas e múltíparas infetadas por *P. falciparum* em Luanda, Angola.
- Determinar a frequência de polimorfismos genéticos associados à resistência à Sulfadoxina e Pirimetamina em mulheres que receberam Sulfadoxina e Pirimetamina, outros ou nenhum antimalárico durante a gravidez.
- Caracterizar e comparar as populações parasitárias em amostras de sangue do cordão umbilical, placenta e sangue periférico, para a presença de polimorfismos nos genes *pfdhfr* e *pfdhps* de *P. falciparum*

2-Material e Métodos

2 Material e Métodos

2.1 Considerações éticas

O protocolo desenvolvido para a realização deste trabalho obteve a aprovação do comité de ética Angola (documento em anexo 2) e do Conselho de Ética do Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

2.2 Desenho do estudo

O estudo enquadra-se como sendo do tipo observacional, analítico transversal e retrospectivo, para caracterizar os polimorfismos dos genes *pfdhfr* e *pfdhps*, em mulheres grávidas de Luanda – Angola

2.3 Área e população de estudo

As amostras foram colhidas em Luanda, capital de Angola, onde 90% das infeções é causada pelo *P. falciparum*. Fica localizada na costa do Oceano Atlântico, tem uma população de aproximadamente 6,5 milhões de habitantes, o que corresponde a 27% do total do país (24,3 milhões), dados divulgados pelo INE de Angola, no censo realizado em 16 de maio de 2014 (www.marktest.com/wap/a/n/id~1df4.aspx, acessado a 17/03/2017). Luanda é a província com maior densidade populacional (347.6 habitantes/Km²), e conta com sete (7) Municípios e seis (6), Distritos Urbanos. Entre eles: Municípios de Luanda, de Belas, Cazenga, Viana, Cacuaco, Icolo e Bengo e Quissama. E os distritos urbanos da Maianga, Ingombota, Kilamba Kiaxi, Rangel, Samba e Sambizanga.

2.4 Material biológico

As amostras foram colhidas nas Maternidades, Lucrecia Paim (MLP) e no Hospital Geral Especializado Augusto Ngangula (HGEAN), as 1009 mulheres grávidas foram recrutadas durante a consulta pré-natal (CPN) de rotina, desde abril de 2006 a fevereiro de 2008. Estes são os dois centros obstétricos de referência para toda a província de Luanda.

Os critérios de inclusão no estudo foram: gravidez de feto único e residência em Luanda. Os critérios de exclusão foram: gravidez múltipla ou de alto risco, assim como qualquer infecção aparente (exceto a malária), determinadas pela história clínica e exames físico obstétrico, assim como, paciente com HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) positivo. Após a aplicação dos critérios de exclusão ficaram incluídas no estudo 866 mulheres. Foi entregue o consentimento informado (documento no anexo 1), e preenchido o questionário para recolha dos dados demográficos, história clínica, idade, paridade, tempo de gestação, em semanas completas, autoinformação de episódios de malária anteriores e uso de antimaláricos, temperatura axilar e história recorrente de cefaleias.

O sangue periférico foi colhido por punção do dedo indicador, para preparação de esfregaços, gota espessa e impressão em papel de filtro, e depois do parto foram obtidas quatro quadrantes arbitrários e colhidas quatro sub-amostras da placenta e impressionadas em papel de filtro. E para analisar um pouco mais o fenómeno da malária nos recém-nascidos, através da transmissão placentária, também se colheu o sangue do cordão umbilical. As amostras foram posteriormente transportadas para o Instituto de Higiene e Medicina Tropical em Lisboa, Portugal, com a devida autorização (documento em anexo 3).

2.5 Extração de DNA e deteção de *Plasmodium* por PCR

A presença de *Plasmodium* e a identificação das espécies foram realizadas em todos os espécimes (sangue periférico (Sp), quatro quadrantes da placenta (Pl) e do cordão umbilical (Cu)), das 866 mulheres envolvidas no estudo. Das 866 mulheres, 143 mulheres grávidas infetadas, foram positivas por PCR para *P. falciparum*, em pelo menos um dos compartimentos (Sp, Pl ou Cu). Sendo que 58 amostras do sangue periférico, 118 da placenta e 32 do cordão umbilical, foram positivas com *P. falciparum*. Essas 204 amostras foram conservadas a -20°C e usadas no referido estudo.

A colheita do material e procedimento das amostras para a preparação de DNA e identificação de espécies foram efetuadas no âmbito de um estudo mais alargado. Detalhe dos procedimentos poderá ser encontrado em Valente e colaboradores (2010, 2012), Campos (2011) e Campos e colaboradores (2012).

O referido estudo, assim como a presente extensão ao mesmo foram aprovados pelo Comité de Ética da Republica de Angola, Ministério da Saúde (Anexo 2) e Conselho de Ética do Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

2.6 PCR - *Polymerase Chain*

As amostras positivas para *P. falciparum* foram analisadas através das técnicas descrito por Duraisingh e colaboradores (1998) e Lau e colaboradores (2013) com algumas alterações. Resumidamente o DNA do parasita foi amplificado utilizando um Nested-PCR, que consiste em duas reações de PCR consecutivas. Foram utilizados os pares de *primers* (*forward* e *reverse*) cujas sequências se encontram descritas na tabela 1: D1 + D2 para *pfdhfr* e N185 + N218 para *pfdhps*, na primeira reação PCR; M3 + M5 para *pfdhfr* e R2 + R/ para *pfdhps*, na segunda reação Nested-PCR.

Tabela 1. Sequência dos *Primers* utilizados para amplificação das mutações genéticas nos genes *pfdhfr* e *pfdhps*

Gene	Primers	Sequência
<i>pfdhfr</i>		
1ª PCR 718bp	D1	5' TTT ATA TTT TCT CCT TTT TA3'
	D2	5' CAT TTT ATT ATT CGT TT CT3'
2ª <i>Nested</i> 648bp	M3	5' TTT ATG ATG GAA CAA GTC TGC3'
	M5	5' AGT ATA TAC ATC GCT AAC AGA3'
<i>pfdhps</i>		
1ª PCR 1031bp	N185	5' TGA TAC CCG AAT ATA AGC ATA ATG3'
	N218	5' ATA ATA GCT GTA GGA AGC AAT TG3'
2ª <i>Nested</i> 728bp	R2	5' GGT ATT TTT GTT GAA CCT AAA CGT GCT GTT CAA3'
	R/	5' ATC CAA TTG TGT GAT TTG TCC AC3'

O volume total final das reações da PCR, tanto na primeira como na segunda reação foi de 25 µl, e a mistura de reação elaborada de acordo com a tabela 2.

Tabela 2. Mistura para a realização da 1ª reação PCR e 2ª *Nested*-PCR

Reagentes	Stock	Mix	1 Reação
H2O			9,3 μ l
DNA	2 μ l		2,0 μ l
Master MIX (nzytech)	250 U/ml	0,2 U/ μ l	12,50 μ l
Primers Fwd	10 μ M	0,25 μ M	0,63 μ l
Primers Rev	10 μ M	0,25 μ M	0,63 μ l

As condições de reação para os dois genes, foram diferentes tanto para a primeira reação, como para a segunda reação (Tabela 3 e Tabela 4). As reações foram efetuadas num termociclador (Biometra T1 thermocycler Alfagene).

Tabela 3. Condições para a realização da 1ª PCR e 2ª *Nested*-PCR para o gene *pfdhfr*

Condições da PCR - DHFR	
1ª Reação PCR	2ª <i>Nested</i> -PCR
94°C - 3 min	92°C - 3 min
94°C - 30 sec (X 45)	92°C - 30 sec (X 45)
45°C - 45 sec (X 45)	50°C - 30 sec (X 45)
72°C - 45 sec (X 45)	72°C - 1 min (X 45)
72°C - 5 min	72°C - 3 min

Tabela 4. Condições para a realização da 1ª PCR e 2ª *Nested*-PCR para o gene *pfdhps*

Condições da PCR - DHPS	
1ª Reação PCR	2ª <i>Nested</i> -PCR
94°C - 5 min	94°C - 3 min
94°C - 55 sec (X 30)	94°C - 1 min (X 40)
45°C - 45 sec (X 30)	45°C - 1 min (X 40)
72°C - 45 sec (X 30)	72°C - 1 min (X 40)
72°C - 5 min	72°C - 3 min

2.5.1 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR, foram separados através de eletroforese em gel de agarose. O gel a 2%, constituindo por uma mistura de 2 g de agarose em 100 ml de TBE (0,1M ácido Bórico, 5 mM EDTA, pH 8,3) e 5 µl de brometo de etídio (Sigma). Em cada poço do gel de agarose foi colocado 10 µl de produto amplificado, com 5 µl de tampão de corrida (*Loading Buffer* 6x, da Bioline). Ao mesmo tempo, colocou-se um marcador de peso molecular de 100 pb (Bioline). Aos géis aplicou-se uma corrente de 90V/cm durante 90 minutos. As amostras foram visualizadas num transiluminador de luz ultravioleta (Vilber Lourmat).

2.5.2 Purificação do Produto de PCR

Os amplicões foram purificados utilizando o kit da Bioline de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. O DNA purificado foi suspenso num volume final de 15 µl de água miliQ autoclavada.

2.7 Sequenciação e deteção das mutações nos genes *pfdhfr* e *pfdhps*

Os produtos amplificados e purificados, foram sequenciados para a identificação das mutações nos genes *pfdhfr* e *pfdhps*, utilizando o método Sanger e recorrendo aos serviços de 2 empresas: Stabvida (Portugal) e Macrogen (Coreia do Sul).

As sequências *forward* e *reverse* para cada amostra foram alinhadas com a estirpe 3D7 (tipo selvagem) para *pfdhfr* e *pfdhps*. A presença de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) foi confirmada através da leitura das sequências *forward* e *reverse*, para cada amostra, usando o *software* Bioedit Sequence Alignment Editor Versão 7.2.5. Parasitas com alelos mistos (em que ambos os alelos de tipo selvagem e mutante estavam presentes) foram considerados mutantes para estimação da prevalência dos SNPs.

2.8 Análise estatística

Foram comparadas a prevalência de SNPs e haplótipos dos genes *pfdhfr* e *pfdhps* e a prevalência de haplótipos combinados dos genes *pfdhfr* e *pfdhps* entre: a) mulheres primíparas e múltíparas; e b) tipos de fármaco usado pelas mulheres do estudo, utilizando o teste exacto de Fisher e Qui-quadrado (χ^2), conforme apropriado. A comparação foi considerada estatisticamente significativa para valores de $P < 0,05$. Os dados foram analisados com o Software Graph Pad Prism 6.

3-Resultados

3 Resultados

3.1 Características das amostras

As amostras analisadas neste trabalho correspondem a 81 mulheres grávidas, entre 2006 e 2008 em Luanda, positivas para *P. falciparum* pela PCR e lâmina. Estas foram também classificadas de acordo com a paridade (número de gravidezes), em primíparas e múltiparas, onde as primíparas eram significativamente mais jovens, a mediada de idade foi de 22,3 anos. No total foram analisadas 185 amostras dos 3 compartimentos estudados: sangue do cordão umbilical (Cu), sangue periférico (Sp) e sangue da placenta (Pl). Para análise dos polimorfismos nos genes *pfdhfr* e *pfdhps*, foram realizadas PCR e *Nested-PCR*, a todas as amostras. O gene *pfdhfr* foi amplificado em 106 amostras de 74 mulheres e o gene *pfdhps* em 79 amostras de 57 mulheres.

3.2 Amplificação dos fragmentos de interesse do Genes *pfdhfr* e *pfdhps* por PCR

Relativamente ao estudo dos genes *pfdhfr* e *pfdhps* a figura 4, mostra um exemplo de amplificação da segunda reação de *Nested-PCR*, com os tamanhos de pares de bases concordantes com os pretendidos 648bp (*pfdhfr*) e 728bp (*pfdhps*).



Figura 4. Produto amplificado de DNA 2ª reação de PCR, nos genes *pfdhfr* e *pfdhps*

Todas as amostras foram amplificadas recorrendo a 1ª reação de PCR e a reação de *Nested-PCR*. As amostras amplificadas foram purificadas e de seguida enviadas para sequenciação.

3.3 Estudo dos polimorfismos no gene *pfdhfr*

Para as mulheres estudadas os polimorfismos mais prevalentes no gene *pfdhfr*, nos 3 compartimentos (Cu, Pl, Sp) foram os SNPs 108N (96%), 51I (89,2%) e 59R (40,5%), não foram detetados os SNPs 16V e 164L. Quanto aos haplótipos, o mais prevalente foi a 51I/108N (58,1%), seguido de 51I/59R/108N (29,7%) e 59R/108N (10,8%) (Tabela 5).

Tabela 5. Prevalência de SNPs e haplótipos, no gene *pfdhfr*

SNPs / Haplótipos	N = 74	Prevalência %
<u>51I</u>	66	89,2
<u>59R</u>	30	40,5
<u>108N</u>	71	96
Outras*	11	14,9
51I/59R	0	0
51I/108N	43	58,1
<u>51I/59R/108N</u>	22	29,7
51I/59R/108N/Outras*	1	1,4
<u>59R/108N</u>	8	10,8
59R/108N/Outras*	0	0
108N/Outras*	0	0
WT	3	4,1

*Discriminadas na Tabela 7. SNPs Polimorfismo de Nucleótidos Únicos

Quanto ao tipo de compartimento, é de salientar que se detetou maior prevalência de SNPs 108N (97,1%), 51I (86,6%) e 59R (38,2%) na placenta, seguindo do Cordão umbilical, 108N (93,3%), 51I (86,7%), 59R (20%) e por último sangue periférico, com 108N (87%), 51I (78,3%) e 59R (30,4%).

Quanto à associação de compartimentos, parasitas com o SNP 108N, foram mais frequentes nos conjuntos Pl + Cu, Cu + Sp e Pl + Sp + Cu (100%), Pl + Sp (84,2%), parasitas com o SNP 51I foram mais frequentes nos conjuntos Pl + Cu (92,3%), Cu + Sp e Pl + Sp + Cu (85,7%) e Pl + Sp (78,9%), parasitas com SNP 59R foram mais frequentes nos conjuntos Cu + Sp e Pl + Sp + Cu (28,6%), Pl + Cu (23,1%) e Pl + Sp (21,1%) (Tabela 6).

Foram detetadas 12 novas mutações no gene *pfdhfr* com uma prevalência de 14,9% (Tabela 6), onde a mais prevalente com 4,1% se encontra no codão 207F, e a

única presente em dois compartimentos Cu e Pl (Tabela 7). No entanto, ocorreram com mais frequência no Cu (20%), Pl (14,7%) e Sp (8,7%) (Tabela 6).

Tabela 6. Frequências de SNPs e haplótipos no gene *pfhfr*

SNPs / Haplótipos	Compartimento													
	Cu		Pl		Sp		Pl + Sp		Pl + Cu		Cu + Sp		Pl + Sp + Cu	
	N = 15	F%	N = 68	F%	N = 23	F%	N = 19	F%	N = 13	F%	N = 7	F%	N = 7	F%
<u>51I</u>	13	86,7	59	86,8	18	78,3	15	78,9	12	92,3	6	85,7	6	85,7
<u>59R</u>	3	20	26	38,2	7	30,4	4	21,1	3	23,1	2	28,6	2	28,6
<u>108N</u>	14	93,3	66	97,1	20	87,0	16	84,2	13	100	7	100	7	100
Outras*	3	20	10	14,7	2	8,7	1	5,3	0	0	0	0	0	0
<u>51I/59R</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>51I/108N</u>	10	66,7	41	60,3	13	56,5	7	36,8	5	38,5	0	0	5	71,4
<u>51I/59R/108N</u>	2	13,3	19	27,9	4	17,4	3	15,8	2	15,4	2	28,6	1	14,3
<u>51I/59R/108N/Outras*</u>	0	0	1	1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>59R/108N</u>	1	6,7	8	11,8	1	4,3	1	5,3	1	7,7	1	14,3	1	14,3
<u>59R/108N/Outras*</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>108N/Outras*</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
WT	1	6,7	2	2,9	3	13,0	0	0	0	0	0	0	0	0

*Discriminadas na Tabela 7. SNPs Polimorfismo de Nucleótidos Únicos; Cu: cordão umbilical, Pl: placenta, Sp: sangue periférico

Tabela 7. Novas SNPs identificadas no gene *pfldhfr*

SNPs	Compartimento		
	Cu	Pl	Sp
31V	0	1	0
35C	0	0	1
90N	0	0	1
107I	0	1	0
120G	0	1	0
145E	0	1	0
199N	0	1	0
199C	1	0	0
200K	0	1	0
200G	1	0	0
203K	0	2	0
207F	1	2	0

3.4 Estudo dos polimorfismos no gene *pfdhps*

Os polimorfismos no gene *pfdhps*, com maiores prevalências foram 437G (98,2%), seguindo-se 540E (19,3%), 613T (7%), 436A (3,5%). O 581G não foi detetado.

Tabela 8. Prevalência de SNPs e haplótipos no gene *pfdhps*

SNPs / Haplótipos	N = 57	Prevalência %
<u>436A</u>	2	3,5
<u>437G</u>	56	98,2
<u>540E</u>	11	19,3
<u>613T</u>	4	7
Outras*	13	22,8
436/437G	2	3,5
436/437G/540E	0	0
436/437G/540E/613T	0	0
436/437G/540E/613T/Outras*	0	0
<u>437G/540E</u>	11	19,3
<u>437G/613T</u>	3	5
437G/540E/613T	0	0
437G/540E/613T/Outras*	0	0
540E/613T	0	0
540E/613T/Outras*	0	0
613T/Outras*	1	1,8
WT	1	1,8

*Discriminadas na Tabela 10. SNPs Polimorfismo de Nucleótidos Únicos

Considerando o haplótipo, de *pfdhps* mais prevalente 437**G**/540**E** (19,3%) (Tabela 8), este faz parte do quántuplo mutante associado à falência terapêutica ao tratamento por SP.

Na análise por compartimento individual, parasitas com o SNP 437**G** foram os mais frequentes, com 100% no Sp, 62,5% na Pl e 23,1% no Cu (Tabela 9).

Na associação de compartimentos, parasitas com o SNP 437**G** apresentaram uma frequência de 100% para os conjuntos Pl + Sp, Cu + Sp e Pl + Sp + Cu, já no conjunto Pl + Cu 90,9%, para parasitas com o SNP 540**E**, Pl + Sp + Cu (16,7%) e Pl + Cu (36,4%), para 436**A**, Pl + Sp (16,7%) (Tabela 9).

Já parasitas com SNP 613**T**, apenas foram identificados isoladamente na Pl (Tabela 9). Neste gene foram identificadas 13 novas mutações, a mais prevalente encontra-se na posição 556**K** com 8,8% (Tabela 10). Foi no Sp onde foram detetadas com maior frequência 44,4%, Pl com 33,3% e Cu com 15,4% (Tabela 9).

Tabela 9. Frequência de SNPs e haplótipos gene *pfdhps*

SNPs / Haplótipos	Compartimento													
	Cu		Pl		Sp		Pl + Sp		Pl + Cu		Cu + Sp		Pl + Sp + Cu	
	N=13	F%	N=48	F%	N=18	F%	N=12	F%	N=11	F%	N=6	F%	N=6	F%
<u>436A</u>	0	0	2	4,2	2	11,1	2	16,7	0	0	0	0	0	0
<u>437G</u>	3	23,1	30	62,5	18	100	12	100	10	90,9	6	100	6	100
<u>540E</u>	0	0	10	20,8	1	5,6	0	0	0	0	0	0	1	16,7
<u>613T</u>	0	0	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Outras*	2	15,4	16	33,3	8	44,4	0	0	1	9,1	0	0	0	0
436A+437G	0	0	2	4,2	2	11,1	2	16,7	0	0	0	0	0	0
436A+437G+540E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
436A+437G+540E+613T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
436A+437G+540E+613T/Outras*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>437G+540E</u>	0	0	10	20,8	1	5,6	0	0	0	0	0	0	1	16,7
<u>437G+ 613T</u>	0	0	1	2,1	0	0	1	8,333	0	0	0	0	0	0
437G+540E+613T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
437G+540E+613T/Outras*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
540E+613T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
540E+613T/Outras*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
613T/Outras*	0	0	1	2,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
WT	0	0	0	0	0	0	0	0	1	9,1	0	0	0	0

*Discriminadas na Tabela 10. SNPs - Polimorfismo de Nucleótidos Únicos; Cu: cordão umbilical, Pl: placenta, Sp: sangue periférico

Tabela 10. Novas SNPs identificadas do gene *pfdhps*

SNPs	Compartimento		
	Cu	Pl	Sp
527F	0	2	1
532K	0	1	3
556K	0	4	1
558K	0	1	0
563A	0	0	1
566A	0	0	2
586H	0	1	0
587F	0	1	0
608E	1	0	0
632D	1	2	0
633H	0	1	0
633K	0	1	0
637I	0	2	0

3.5 Estudo dos polimorfismos e haplótipos nos genes *pfdhfr* e *pfdhps* em relação à paridade

As 81 mulheres foram agrupadas segundo à paridade em primíparas e múltíparas (de acordo com o número de gravidezes, informadas na altura do preenchimento do consentimento escrito para a realização da pesquisa nas respetivas unidades hospitalares) e as prevalências dos haplótipos dos genes *pfdhfr* e *pfdhps* analisadas nesses grupos. Das 74 mulheres onde foi possível analisar o gene *pfdhfr*, 40 eram primíparas e 34 eram múltíparas; no que respeita ao gene *pfdhps* das 57 mulheres estudadas 32 era primíparas e 25 eram múltíparas (Tabela 11).

As múltíparas apresentaram maior prevalência do haplótipo 51I/108N (68%), já as primíparas do 51I/59R/108N (35%). O fenótipo WT (parasitas sem mutações no gene *pfdhfr*), apenas foi observado no grupo das primíparas (7,5%). O SNP 108N, não foi observado isoladamente em qualquer dos grupos (Tabela 11).

Tabela 11. Prevalência de SNP e haplótipos nos genes *pfdhfr* e *pfdhps* nos grupos das primíparas e múltiparas.

Gene	Haplótipos	Primíparas (%)	Múltiparas (%)	P ^a
<i>pfdhfr</i>	S108N	40 (100)	34 (100)	0,2447
	N51I/S108N	18 (45)	23(68)	0,0630
	C59R/S108N	5(12,5)	4 (12)	1,0000
	N51I/C59R/S108N	14 (35)	7 (21)	0,1941
	N51I/C59R/S108N	3 (7,5)	0 (0)	0,2447
<i>pfdhps</i>	A437G	21 (65,6)	18 (72)	0,7752
	A437G/K540E	8 (25)	4 (16)	0,5203
	S436A/A437G	1 (3,1)	1 (4)	1,0000
	A437G/A613T	1 (3,1)	2 (8)	0,5762
	S436A/A437G/A613T	1 (3,1)	0 (0)	1,0000

P^a Calculados por Teste exacto de Fisher

Primíparas apresentaram maior prevalência do haplótipo 437G/540E (25%) e apenas foi observado o fenótipo WT (parasitas sem mutações) em uma mulher, pertencendo esta ao grupo das primíparas com 3,1% (Tabela 11).

A prevalências de SNPs e haplótipos duplos e triplos mutantes do gene *pfdhfr* e *pfdhps*, não existem diferenças significativas entre os dois grupos de mulheres (tabela 11).

Apenas primíparas de cada um dos genes conservam alelos selvagens.

3.6 Estudo dos polimorfismos e haplótipos nos genes *pfdhfr* e *pfdhps* nos diferentes compartimentos estudados – placenta, sangue periférico e sangue do cordão umbilical.

Nas 45 amostras (isolados correspondentes a 45 mulheres) em que foi possível sequenciar com sucesso ambos os genes apenas 9 tinham a combinação de haplótipos correspondente ao quádruplo mutante (51I/59R/108N + 437G/540E - associado à falência terapêutica com SP), 7 (26,9%) das quais primíparas e 2 (10,5%) múltiparas (Tabela 12).

Quanto a prevalência dos haplótipos combinados dos 2 genes, não se observaram diferenças significativas entre primíparas e múltiparas (Tabela 12).

Tabela 12. Prevalência de haplótipos combinados nos genes *pfdhfr*/*pfdhps*

<i>pfdhfr</i> / <i>pfdhps</i>	Haplótipos (%)	Primíparas (%)	Múltiparas (%)	<i>P</i> ^a
51I/108N + 437G	23 (51,1)	12 (46,2)	11 (57,9)	0,7666
59R/108N + 437G	5 (11,1)	3 (11,5)	2 (10,5)	1,0000
51I/108N + 437G/613T	3 (6,7)	1 (3,8)	2 (10,5)	0,5772
51I/108N + 436A/437G	1 (2,2)	0 (0)	1 (5,3)	0,4444
51I/59R/108N + 437G	3 (6,7)	1 (3,8)	2 (10,5)	0,5772
51I/59R/108N + 437G/540E	9(20)	7 (26,9)	2 (10,5)	0,2604
51I/59R/108N + 436A/437G	1 (2,2)	1 (3,8)	0 (0)	1,0000

P^a Calculados por Teste exacto de Fisher

Apenas sete mulheres apresentaram PCR positivo para *pfdhfr* e 6 para o gene *pfdhps* nos 3 compartimentos (Cu, Pl, Sp) em simultâneo (Tabela 13 e Tabela 14). A combinação mais comum para *pfdhfr* foi 51I/108N e para *pfdhps* foi o SNP 437G. Não foram observadas diferenças entre as populações de mutantes e não mutantes nos diferentes compartimentos para ambos os genes.

Tabela 13. Mutações no gene *pfdhfr* em mulheres com PCR positivo nos 3 compartimentos estudados

Amostra	Compartimento	<i>pfdhfr</i>				
		16	51	59	108	164
6	Cu	A	I	R	N	I
	Pl	A	I	R	N	I
	Sp	A	I	R	N	I
299	Cu	A	I	C	N	I
	Pl	A	I	C	N	I
	Sp	A	I	C	N	I
308	Cu	A	I	C	N	I
	Pl	A	I	C	N	I
	Sp	A	I	C	N	I
317	Cu	A	I	C	N	I
	Pl	A	I	C	N	I
	Sp	A	I	C	N	I
366	Cu	A	I	C	N	I
	Pl	A	I	C	N	I
	Sp	A	I	C	N	I
424	Cu	A	N	R	N	I
	Pl	A	N	R	N	I
	Sp	A	N	R	N	I
501	Cu	A	I	C	N	I
	Pl	A	I	C	N	I
	Sp	A	I	C	N	I

Cu: cordão umbilical, Pl: placenta, Sp: sangue periférico, A- Alanina, C - Cisteína, I - Isoleucina, N - Asparagina, R - Arginina

Tabela 14. Mutações no gene *pfdhps* em mulheres com PCR positivo nos 3 compartimentos estudados.

Amostra	Compartimento	<i>pfdhps</i>				
		436	437	540	581	613
6	Cu	S	G	E	A	A
	Pl	S	G	E	A	A
	Sp	S	G	E	A	A
307	Cu	S	G	K	A	A
	Pl	S	G	K	A	A
	Sp	S	G	K	A	A
308	Cu	S	G	K	A	A
	Pl	S	G	K	A	A
	Sp	S	G	K	A	A
366	Cu	S	G	K	A	A
	Pl	S	G	K	A	A
	Sp	S	G	K	A	A
424	Cu	S	G	K	A	A
	Pl	S	G	K	A	A
	Sp	S	G	K	A	A
501	Cu	S	G	K	A	A
	Pl	S	G	K	A	A
	Sp	S	G	K	A	A

Cu: cordão umbilical, Pl: placenta, Sp: sangue periférico, S- Serina, G - Glicina, K - Lisina, A - Alanina, E - Ácido glutâmico

Quando analisamos simultaneamente os genes *pfdhfr* e *pfdhps*, foram observados três haplótipos (51**I**/108**N**+437**G**), um (59**R**/108**N**+437**G**) e um (51**I**/59**R**/108**N**+437**G**/540**E**). Este último o é um indicador de resistência à Sp (Tabela 15).

Tabela 15. Mutações nos genes *pfhfr* e *pfhps* em mulheres com PCR positivo nos 3 compartimentos estudados.

Mulheres	Compartimento	<i>Pfdhfr</i>					<i>pfhps</i>				
		16	51	59	108	164	436	437	540	581	613
6	Cu	A	I	R	N	I	S	G	E	A	A
	Pl	A	I	R	N	I	S	G	E	A	A
	Sp	A	I	R	N	I	S	G	E	A	A
308	Cu	A	I	C	N	I	S	G	K	A	A
	Pl	A	I	C	N	I	S	G	K	A	A
	Sp	A	I	C	N	I	S	G	K	A	A
366	Cu	A	I	C	N	I	S	G	K	A	A
	Pl	A	I	C	N	I	S	G	K	A	A
	Sp	A	I	C	N	I	S	G	K	A	A
424	Cu	A	N	R	N	I	S	G	K	A	A
	Pl	A	N	R	N	I	S	G	K	A	A
	Sp	A	N	R	N	I	S	G	K	A	A
501	Cu	A	I	C	N	I	S	G	K	A	A
	Pl	A	I	C	N	I	S	G	K	A	A
	Sp	A	I	C	N	I	S	G	K	A	A

Cu: cordão umbilical, Pl: placenta, Sp: sangue periférico, A- Alanina, C - Cisteína, I - Isoleucina, N - Asparagina, R - Arginina S- Serina, G - Glicina, K - Lisina, A - Alanina, E - Ácido glutâmico

Comparamos também, mulheres simultaneamente positivas na Pl e Sp, para o gene *pfhfr*, e verificamos que apenas três apresentaram mutações diferentes entre compartimentos. Uma com haplótipo 51I/59R/108R na Pl e o N51/C59/S108 no Sp. Já outras duas mulheres apresentaram a mutação dupla 51I/108N na Pl e N51/S108 no Sp. Nas outras mulheres não houve diferença entre os dois compartimentos (Tabela 16).

Tabela 16. Mutações no gene *pfdhfr* em mulheres com PCR simultaneamente positivo para sangue periférico e placenta.

Amostra	Compartimento	<i>Pfdhfr</i>				
		16	51	59	108	164
17	Pl	A	I	R	N	I
	Sp	A	N	C	S	I
77	Pl	A	I	I	N	I
	Sp	A	I	I	N	I
90	Pl	A	I	C	N	I
	Sp	A	I	C	N	I
106	Pl	A	I	C	N	I
	Sp	A	I	C	N	I
265	Pl	A	I	C	N	I
	Sp	A	I	C	S	I
318	Pl	A	I	I	N	I
	Sp	A	I	R	N	I
336	Pl	A	I	C	N	I
	Sp	A	I	C	N	I
345	Pl	A	I	C	N	I
	Sp	A	I	C	N	I
368	Pl	A	I	C	N	I
	Sp	A	I	C	N	I
707	Pl	A	I	C	N	I
	Sp	A	N	C	S	I
730	Pl	A	I	C	N	I
	Sp	A	I	C	N	I
759	Pl	A	I	C	N	I
	Sp	A	I	C	N	I

Cu: cordão umbilical, Pl: placenta, Sp: sangue periférico, A- Alanina, C - Cisteína, I - Isoleucina, N - Asparagina, R - Arginina

Não se verificou diferenças de haplótipos entre os parasitas dos compartimentos Cu + Pl (Tabela 18). Comparamos também, mulheres simultaneamente positivas para Pl e Sp, para o gene *pfdhfr* e verificamos que destas apenas uma apresentava haplótipos diferentes entre os compartimentos, na posição 613 (Tabela 17).

Tabela 17. Mutações no gene *pfdhps* em mulheres com PCR simultaneamente positivo no sangue periférico e placenta.

		<i>pfdhps</i>				
Amostra	Compartimento	436	437	540	581	613
90	Pl	S	G	K	A	A
	Sp	S	G	K	A	T
299	Pl	S	G	K	A	A
	Sp	S	G	K	A	A
317	Pl	S	G	K	A	A
	Sp	S	G	K	A	A
318	Pl	A	G	K	A	A
	Sp	A	G	K	A	A
345	Pl	A	G	K	A	A
	Sp	A	G	K	A	A
864	Pl	S	G	K	A	A
	Sp	S	G	K	A	A

Cu: cordão umbilical, Pl: placenta, Sp: sangue periférico, S- Serina, G - Glicina, K - Lisina, A - Alanina, E - Ácido glutâmico

Comparando as mulheres com parasitas, simultaneamente no Cu + Pl, apenas uma mulher apresentava diferenças entre *P. falciparum* dos diferentes compartimentos com mutação na posição 540, onde 540E ocorreu na Pl e o K540 no Cu (Tabela 18). Não ocorreram haplótipos na associação Cu + Sp, sugerindo que não havia parasitas de *P. falciparum* mutantes em circulação, indicação de infecção recente.

Tabela 18. Mutações no gene *pfdhps* em mulheres com PCR simultaneamente positivo para o cordão umbilical e a placenta.

		<i>pfdhps</i>				
Amostra	Compartimento	436	437	540	581	613
64	Cu	S	G	K	A	A
	Pl	S	G	E	A	A
82	Cu	S	G	K	A	A
	Pl	S	G	K	A	A
306	Cu	S	G	K	A	A
	Pl	S	G	K	A	A
461	Cu	S	G	K	A	A
	Pl	S	G	K	A	A
466	Cu	S	A	K	A	A
	Pl	S	A	K	A	A

Cu: cordão umbilical, Pl: placenta, Sp: sangue periférico, S- Serina, G - Glicina, K - Lisina, A - Alanina, E - Ácido glutâmico

3.7 Prevalência dos polimorfismos e haplótipos nos genes *pfdhfr* e *pfdhps* nos diferentes grupos de fármacos usados durante a gestação.

Das 81 mulheres incluídas neste estudo, 17 foram tratadas com SP, 18 com cloroquina (CQ), 14 com outros fármacos em monoterapia ou em associação e 32 não receberam qualquer fármaco durante a gestação. No grupo dos outros fármacos incluí-se quinino (Q), amodiaquina (A), SP e amodiaquina (SPA), SP e Quinino (SPQ), SP e CQ (SPCQ), CQ e alfam (CQH).

Das 74 mulheres com amostras amplificadas para gene *pfdhfr*, 15 fizeram tratamento com SP, 15 com CQ, 14 com outros e 30 não receberam qualquer tipo de fármaco. Para as 57 mulheres com amostras amplificadas para o gene *pfdhps*, 10 fizeram tratamento com SP, 15 com CQ, 8 com outros e 24 não receberam qualquer tipo de fármaco (Tabela 19). Cerca de metade das mulheres (com toma de fármaco ou sem toma de fármaco) estavam infetadas com parasitas que possuíam duas das mutações em *pfdhfr* associadas com a resistência à combinação SP. O haplótipo mutante triplo de *pfdhfr* (N51I/C59R/S108N) foi mais frequente no grupo tratado com CQ (53,3%).

Usou-se o teste de χ^2 , para verificar a dependência ou independência das prevalências dos diferentes SNPs e haplótipos dos genes *pfdhfr* e *pfdhps*, com os diferentes fármacos usados pelas mulheres durante o período de gestação, e observamos que não existe associação significativa entre os haplótipos dos 2 genes quanto a SP, CQ, Outros (associações de fármacos) e Sem Fármaco (Tabela 19).

Tabela 19. Frequência de haplótipos nos genes *pfdhfr* e *pfdhfr* de acordo com tipo de fármaco.

Gene	Haplótipos	Fármaco				P
		SP (%)	CQ (%)	Outros (%)	Sem Fármaco (%)	
<i>pfdhfr</i> (n=74)	S108N	15 (100)	14 (100)	14 (100)	30 (100)	1,0000 ^b
	N51I/S108N	10 (66,7)	7 (46,7)	9 (64,3)	17 (56,7)	0,6816 ^a
	C59R/S108N	1 (6,7)	0 (0)	1 (7,1)	6 (20)	0,1787 ^a
	N51I/C59R/S108N	3 (20)	8 (53,3)	3 (21,4)	6 (20)	0,0853 ^a
	N51R/C59R/S108N	1 (6,7)	0 (0)	1 (7,1)	1 (3,3)	0,7338 ^b
<i>pfdhps</i> (n=57)	A437G	9 (90)	9 (60)	5 (62,5)	17 (70,8)	0,4153 ^a
	A437G/K540E	1 (10)	6 (40)	1 (12,5)	3 (12,5)	0,1309 ^a
	S436A/A437G	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	1 (4,2)	0,4153 ^b
	A437G/A613T	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (12,5)	0,2257 ^b
	S436A/A437G/A613T	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)	0,1007 ^b

SP: sulfadoxina + pirimetamina; CQ: Cloroquina, outros (Quinino, amodiaquina, SP e amodiaquina (SPA), SP e Quinino (SPQ), SP e CQ (SPCQ), CQ e alfam (CQH). Sem Fármaco: Sem indicação de fármaco antimalárico durante a gestação.

^a Calculado pelo teste χ^2

^b Valores de χ^2 não válidos, pois 20% dos valores são inferiores a 5

Das 40 primíparas com informação para o gene *pfdhfr*, 7 foram tratadas com SP, 10 com CQ, 9 com outros e 14 sem tratamento, das 34 múltiparas, 8 com SP, 5 com CQ, 5 com outros e 16 sem tratamento. Para o gene *pfdhps*, 32 primíparas, 4 foram tratadas com SP, 10 com CQ, 5 com outros e 13 sem tratamento, nas 25 múltiparas, 6 foram tratadas com SP, 5 com CQ, 3 com outros e 11 sem fármaco.

Foram observados um total de 7 polimorfismos da associação dos genes *pfdhfr* e *pfdhps*, (Tabela 20). É de referir que o haplótipo 51I/59R/108N + 437G foi mais frequente no grupo sem fármaco (66,7%) e o 51I/59R/108N + 437G/540E mais frequente no grupo tratado com CQ (55,6%).

Os haplótipos formados pela associação dos dois genes *pfdhfr/pfdhps* triplo mutante 51I/108N+437G, foi o mais comum (51,1%), seguido do mutante quártuplo 51I/59R/108N+437G/540E (20%).

Quanto análise estatística, foi observada diferença estatística significativa entre a prevalência dos diferentes fármacos, em relação ao haplótipo quártuplo ($p = 0,0446$) (Tabela 20).

Tabela 20. Frequência de haplótipos combinados nos genes *pfdhfr/pfdhfr* de acordo com o tipo de fármaco.

<i>pfdhfr/pfdhps</i>	Haplótipos (%)	Fármaco				<i>P</i>
		SP (%)	CQ (%)	Outros (%)	Sem Fármaco (%)	
51I/108N + 437G	23 (51,1)	4 (17,4)	6 (26,1)	5 (21,7)	8 (34,8)	0,3337 ^a
59R/108N + 437G	5 (11,1)	1 (20)	0	0	4 (80)	0,3154 ^b
51I/108N + 437G/613T	3 (6,7)	0	0	0	3 (100)	0,3138 ^b
51I/108N + 436A/437G	1 (2,2)	0	0	0	1 (100)	0,7706 ^b
51I/59R/108N + 437G	3 (6,7)	0	1 (33,3)	0	2 (66,7)	0,6916 ^b
51I/59R/108N + 437G/540E	9(20)	1 (11,1)	5 (55,6)	1 (11,1)	2 (22,2)	0,0446^a
51I/59R/108N + 436A/437G	1 (2,2)	0	0	1 (100)	0	0,1631 ^b

SP: sulfadoxina + pirimetamina; CQ: Cloroquina, outros (Quinino, amodiaquina, SP e amodiaquina (SPA), SP e Quinino (SPQ), SP e CQ (SPCQ), CQ e alfam (CQH). Sem Fármaco: Sem indicação de fármaco antimalárico durante a gestação.

^a Calculado pelo teste χ^2

^b Valores de χ^2 não válidos, pois 20% dos valores são inferiores a 5

4-Discussão e Conclusão

4 Discussão e Conclusão

Este é o primeiro estudo que avaliou a prevalência de polimorfismos dos genes *pfdhfr* e *pfdhps* de *P. falciparum*, implicados na resistência a SP em mulheres grávidas primíparas e multíparas de termo em Luanda, Angola, uma zona de transmissão mesoendêmica estável. A caracterização dos parasitas foi efetuada em três locais: placenta, cordão umbilical, e sangue periférico.

A transmissão da malária no século XXI diminuiu substancialmente, devido ao aumento das intervenções contra a malária, como o uso de rede mosquiteiras tratadas com inseticida, assim como, o aumento dos casos tratados com sucesso, no entanto, as mulheres grávidas em regiões de transmissão sustentada, ainda necessitam de proteção para prevenir a malária durante a gestação devido aos efeitos adversos (Walker *et al.*, 2017).

As mulheres grávidas apresentaram maior risco de contrair infecção por malária, em relação às não grávidas, devido a fatores de risco tais como; idade materna, baixa paridade, e baixa idade gestacional (Campos, 2011). As complicações decorrentes mais frequentes da malária na gravidez são: anemia, baixo desenvolvimento intra-uterino, baixo peso à nascença do recém-nascido, parto prematuro e aumento da mortalidade infantil e materna (Matteelli *et al.*, 1996, Ebako e Umberto, 2013).

As redes mosquiteiras tratadas com inseticida e o TIP-SP, comprovou-se serem meios seguros, bem tolerados, eficazes e económicos para reduzir o peso da malária na gravidez, são recomendados para a prevenção da malária na gravidez, em regiões de transmissão estável (Walker *et al.*, 2017, World Malaria Report, 2017).

Dados publicados pelo Plano Nacional de Saúde de Angola 2015-2025 referem que em 2006, 22% das mulheres grávidas tinham acesso a redes mosquiteiras e em 2011 a cobertura passou para 26%. No mesmo ano apenas 18% das mulheres grávidas receberam o TIP. O objetivo do PNDS é garantir até 2025, uma cobertura de 80-90% do TIP (1ª e 2ª doses) nas mulheres grávidas que frequentam a consulta pré-natal (CPN) e redes mosquiteiras (Ministério da Saúde da República de Angola, 2014).

Apesar da resistência à SP ser uma preocupação, atualmente é usado na África subsariana para o TIP, para prevenir infecções de *P. falciparum* em mulheres grávidas

com baixa imunidade adquirida e geralmente assintomática, com baixa densidade parasitária. SP demonstrou ser eficaz no TIP, e por recomendação da OMS deve ser efetuado o mais cedo possível, no segundo trimestre.

No entanto, apesar das vantagens do TIP-SP, a utilização desta intervenção ainda é baixa em toda a África, com apenas 21,5% das mulheres em risco a receber pelo menos as duas doses de SP em 2010. Não estando a ser bem recebida, devido a falha deste fármaco em algumas regiões de África, com ao surgimento de parasitas com múltiplas mutações de resistência (Walker *et al.*, 2017)

Estudos efetuados entre 2000 e 2011, demonstraram que a prevalência da malária em mulheres grávidas atendidas em consultas pré-natal foi de 32% na África Oriental e Austral e 38,2% na África Ocidental e Central, enquanto a malária placentária foi de 25,8% na África Oriental e Austral e de 39,9% na África Ocidental e Central (Chico *et al.*, 2012). Os níveis de resistência a SP devem ser alvo de vigilância e esta é feita pelo monitoramento dos marcadores moleculares (WHO, 2004).

A resistência à SP tem vindo a aumentar em todo o mundo, e é causada por mutações pontuais que se acumulam em múltiplos locais dos genes *pfdhfr* e *pfdhps* (Wang *et al.*, 1997), de *P. falciparum* que codificam enzimas que visam a pirimetamina e sulfadoxina respetivamente (Peterson *et al.*, 1988 e Triglia *et al.*, 1997), aumentando a tolerância do parasita à SP *in vivo* (Triglia *et al.*, 1998). O sucesso contínuo do TIP depende em grande parte da prevalência das mutações de resistência nos genes *pfdhfr* e *pfdhps* na população alvo (Venkatesan *et al.*, 2013).

Relativamente ao estudo dos polimorfismos para o gene *pfdhfr*, 96% das mulheres apresentaram o SNP 108N, isso indica que este SNP pode se encontrar já fixado na população em estudo, pelo que, a monitorização deste polimorfismo deve ser contínuo. Esta alta prevalência é semelhante a estudos já realizados em várias regiões de Angola, Luanda (100%), Cabinda (100%), Uíge (100%), Kwanza Norte (100%), Malange (98%), Huambo (100%), Lubango (98%), (Gama *et al.*, 2011, Fortes *et al.*, 2011, e Ngane *et al.*, 2015, Kaingona-Daniel, E., *et al.*, 2016) e em outros países africanos, tais como, Etiópia (100%) e São Tomé e Príncipe (95%) (Gebu-Woldearegai *et al.*, 2005 e Salgueiro *et al.*, 2010). O SNP 108N está indicada como a primeira mutação relacionada com a resistência a pirimetamina no gene *pfdhfr* (Zolg *et al.*, 1989).

O SNP 51I foi o segundo mais prevalente (63,8%) como já foi descrito por Gama e colaboradores (2011) e Ngane e colaboradores (2015) para outras províncias de Angola.

O facto de não se ter detetado estes dois SNPs, poderá dever-se ao limitado número de amostras, ou a baixa densidade de clones parasitas presente no grupo das nossas amostras. No entanto é de realçar que o SNP 164L é muito raro em África (Venkatesan *et al.*, 2013), mas, já foi detetado num estudo efetuado no Lubango - Angola com uma prevalência de 2% (Fortes *et al.*, 2016). Lembrando que o SNP 164L, em associação com a 108N + 51I e / ou 59R, confere altos níveis de resistência *in vivo* e *in vitro* a SP, o que a poderia tornar o tratamento totalmente ineficaz (Cortese *et al.*, 2002 e Basco *et al.*, 1995). Já a mutação 108N seguida da substituição nos codões 51 e 59, parece ser necessária para criar resistência à pirimetamina (Plowe *et al.*, 1997).

Foi detetado o haplótipo 51I/59R/108N que é considerado preditivo para aumento do nível de resistência à pirimetamina, quando comparada com a mutação simples 108N (Tarnchompoo *et al.*, 2002). Uma análise recente da eficácia *in vivo* da SP para eliminar infeções existentes em mulheres grávidas assintomáticas que receberam TIP-SP, demonstrou que a eficácia da SP é retida tanto onde a mutação tripla do gene *pfdhfr* 51I/59R/108N é encontrada em alta prevalência (Gutman *et al.*, 2015). Neste trabalho o haplótipo 51I/59R/108N apresentou uma prevalência de 29,7% nas amostras estudadas, indicando baixa resistência a pirimetamina, o que está de acordo com o que já foi referido em estudos mais recentes por Fortes e colaboradores (2011 e 2016), que verificaram uma prevalência de 24,8%.

Para o gene *pfdhps*, a mutação simples 437G, com uma prevalência de 98,2% (56/57) indicando que este pode estar fixo na população, sendo o SNP inicial para a resistência à sulfadoxina (Peterson *et al.*, 1988, Mourier *et al.*, 2005), a sua monitorização deve ser contínua.

Este SNP já foi detetado em outras localidades de Angola, e em outros países Africanos, especialmente na África Ocidental e Central (Gama *et al.*, 2011, Fortes, *et al.*, 2011 e 2016, Lynch *et al.*, 2008, Gebru-Woldearegai *et al.*, 2005 e Salgueiro *et al.*, 2010) apresentando menor grau de tolerância à sulfadoxina, do que quando associado ao SNP 540E. Essa mutação aumenta a tolerância a sulfadoxina em 200 vezes, em comparação com apenas 10 vezes para a substituição SNP 437G (Triglia *et al.*, 1997).

O haplótipo 437G/540E está associado à resistência à sulfadoxina entre os parasitas africanos. Os SNPs 437G e 540E são encontrados juntos na África Oriental e Sul e separados na África Ocidental e Central (Pearce *et al.*, 2009). Já o haplótipo 437G/540E é muito menos observado em África, o que está de acordo com a baixa prevalência detetada neste estudo (19,3%), tal como observado nos estudos realizados em Luanda (Gama *et al.*, 2011 e Figueiredo *et al.*, 2008) e em outras províncias de Angola (Fortes *et al.*, 2011 e 2016). Já o haplótipo formado pelo triplo mutante do gene *pfdhfr* 51I/59R/108N e o mutante único do gene *pfdhps* 437G, está associado a falha terapêutica na África Ocidental e Central (Kun *et al.*, 1999, Dunyo *et al.*, 2006). No entanto, num estudo efetuado recentemente, mostrou a eficácia do TIP-SP, mesmo em áreas de alta prevalência do quadruplo mutante (Gutman *et al.*, 2015).

A presença do haplótipo 437G/540E indica a possível formação do mutante quártuplo. Neste estudo, a prevalência deste haplótipo foi de 25% em primíparas e de 16% em múltiparas. Quando associado ao haplótipo triplo mutante 51I/59R/108N do gene *pfdhfr* forma uma mutação quártupla, que desempenha um papel crucial na resistência a SP entre os parasitas africanos (Pearce *et al.*, 2009). Esta menor eficácia reflete tanto a capacidade reduzida da SP para eliminar as infeções existentes, assim como, redução na capacidade de prevenir novas infeções, isto porque ocorre uma redução da duração da profilaxia pós-tratamento em relação às áreas com baixa resistência a SP (Gutman *et al.*, 2015)

Neste trabalho verificou-se uma prevalência de 20% do mutante quártuplo, em contraste com o observado anteriormente por Gama e colaboradores (2011) em Luanda e Kaingona-Daniel E. e colaboradores (2016) no Lubango. No entanto, em estudos efetuados por Fortes e colaboradores (2011), esta mutação foi detetada em Cabinda (2,8%), num estudo efetuado em 5 províncias de Angola.

Pela sua importância na resistência a SP, a mutação quártupla é definida como baixa com uma frequência do alelo 540E inferior a 50%, e uma prevalência inferior a 15%, intermédia com uma frequência de 50% - 90% e uma prevalência entre 15% - 80% e alta como uma frequência maior de 90% e uma prevalência maior de 80% (Walker *et al.*, 2017)

O SNP 581G, não foi detetado, podendo isso estar relacionado com a limitação do número de amostras usadas no presente estudo, assim como, a baixa densidade de

clones de parasitas nas nossas amostras. Em áreas sem este SNP 581G a capacidade da SP para reduzir a parasitemia em mulheres grávidas poderá contribuir para a redução da anemia e prevenir assim o baixo peso à nascença (Desai *et al.*, 2016, Beck *et al.*, 2001).

Em áreas com presença do SNP 581G, o TIP com SP poderá aumentar a densidade parasitária ao eliminar parasitas tipo selvagem e, assim, permitir uma maior capacidade de multiplicação dos parasitas resistentes (Harrington *et al.*, 2009). Quando a prevalência do SNP 540E esta acima dos 80%, isso implica que a prevalência do SNP 581G esta acima dos 10% (walker *et al.*, 2017).

A eficácia do SP-TIP está comprometida no leste da África pelo aumento da prevalência da mutação 581G no norte da Tânzania (Gesase *et al.*, 2009). Lucy e colaboradores (2017) verificaram que a prevalência e frequência das mutações 540E e 581G aumentaram em 60% das áreas após 2008, destacando-se a necessidade de se fazer uma vigilância contínua. O aumento da prevalência e fixação desses haplótipos tem sido associada à perda da eficácia da SP e podem representar uma ameaça em África, onde a SP ainda é usada para tratar malária clínica e preventiva em grávidas. Apesar de serem poucas as áreas de África, com presença do haplótipo de resistência sêxtuplo, formado pela junção do SNP 581G ao quártuplo mutante 51I/59R/108N/437G/540E, torna-se preocupante, uma vez que estudos observacionais que não mostraram efeito da SP após a infecção por malária e densidades parasitárias, sugerindo que a SP pode realmente causar danos as mulheres gravidas (Harrington *et al.*, 2009, Harrington *et al.*, 2011 e Gutman *et al.*, 2015).

Para além do haplótipo 51I/59R/108N/437G/540E, está a surgir o conceito de haplótipos super-resistentes, que aumentam ainda mais o limite de tolerância dos parasitas à SP, e o TIP com SP é altamente prejudicial. Os haplótipos super-resistentes devem-se à junção de a) SNPs do gene *pfdhfr* 164L, não detetado neste estudo (com prevalência de 2%, em estudos efetuados por Kaingona-Daniel E. e colaboradores (2016)), b) SNPs do gene *pfdhps* 581G (não detetado no nosso estudo) e 613T/S (7% de prevalência no nosso estudo) e c) do haplótipo 51I/59R/108N/437G/540E (20%). O maior foco de super-resistência associado o SNP 581G está na África Oriental, embora o SNP 581G esteja também presente na África Ocidental, já a ausência do SNP 540E, na África Ocidental, impede que essas populações sejam classificadas como super-resistentes (Naidoo and Roper, 2013). Neste trabalho não foram detetados estes

sêxtuplos mutantes, estando de acordo com o descrito por Naidoo and Roper (2013), em que na África Ocidental e Central a resistência à SP é parcial.

A OMS recomenda que, antes da implementação do SP-TIP, em regiões com transmissão moderada a alta de malária, deve ser determinada a prevalência das mutações 540E e 581G, uma vez que têm um papel central nas decisões políticas do uso de SP-TIP e este deve ser usado em regiões com uma taxa de prevalência de 540E inferior a 50% e 581G inferior a 10% (OMS, 2013). Por recomendação preliminar da OMS sobre o TIP em mulheres grávidas recomenda a suspensão quando a prevalência de 581G é superior a 10% e 540E é superior a 95% (Lucy C. Okell *et al.*, 2017). Estas duas mutações são raras na África Ocidental e Central o que coincide com a eficácia do SP-TIP durante este período 2006-2011 (Falade *et al.*, 2007, Aziken *et al.*, 2011).

Os 5 haplótipos formados pela associação dos genes *pfdhfr/pfdhps*, que estão ligados à resistência a SP, detetados no nosso estudo, todos apresentaram prevalências abaixo dos 50%. Encontra partida, os SNPs, que indicam alto nível de resistência 59R (25,5%), 164L (não detetado), 540E (19,3%), 613T (7%) e o 581G (não detetado), devem ser monitorizados.

Haplótipos são mais frequentemente associados ao aumento dos níveis de resistência à SP que os SNPs (Naiboo and Roper, 2013).

Relativamente aos resultados obtidos, detetamos uma prevalência de 19,3% do 540E e o SNP 581G não foi detetado, indicando que em 2006-2008, a SP ainda podia ser usada como TIP em Luanda.

Em relação aos três compartimentos estudados, a placenta foi o compartimento que apresentou parasitas com maior frequência de SNPs nos genes *pfdhfr* e *pfdhps*. As alterações da placenta provocadas pela malária, foram descritas para regiões de transmissão estável e instável, e incluem: a presença de parasitas; alterações inflamatórias; e a deposição de hemozoína (pigmento malárico). Estas alterações foram categorizadas em 4 níveis: aguda (presença de parasitas e pigmento ausente); crónica (presença de parasitas e pigmento); infecção passada (sem presença de parasita e presença de pigmento); e ausência de infecção (ausência de parasitas e pigmento) (Ismail, *et al.*, 2000). Num estudo realizado por Demba e colaboradores (2006), nas áreas de baixa transmissão a malária placentária é mais frequente.

A malária associada a gravidez é mais severa em primíparas do que em multíparas, uma vez que uma das características fundamentais da malária durante a gravidez é a acumulação de eritrócitos infetados de *P. falciparum* na placenta, que se pensa contribuir para o comprometimento da circulação placentária e alterações nas trocas fisiológicas com o feto (Demba, *et al.*, 2006).

A mortalidade materna devido a malária está muito provavelmente subestimada, segundo Romagosa e colaboradores (2007) e Ali e colaboradores (2012). Estes descreveram nos seus estudos em Maputo e Sudão que a malária foi uma importante causa de morte materna naqueles países. No entanto, quando não é a causa direta de morte, poderá estar relacionada com a morte por eclampsia (Adam *et al.*, 2011 e Anya, 2004).

O plasmódio quando detetado no sangue periférico deve ser tratado imediatamente com um anti-malárico eficaz para se evitar a ocorrência de efeitos adversos na mãe e no feto, independentemente dos sintomas e outras medidas preventivas na gravidez (Kattenberg *et al.*, 2011).

Atualmente a SP é usada como TIP em Angola, onde as mulheres recebem uma dose mensal de SP em cada consulta pré-natal programada durante os nove meses, iniciando na 12^a semana de gestação. As amostras usadas para este trabalho foram recolhidas na altura em que o TIP com SP foi implementado em mulheres grávidas. O TIP com SP em populações vulneráveis reduz a morbilidade por malária em África. No entanto, as mutações de resistência no gene *pfdhps* do parasita, combinadas com mutações *pfdhfr* põem em causa a sua eficácia. Além disso, a imunidade das mulheres grávidas à malária é menor do que em não grávidas. Angola está localizada na África Ocidental, onde, segundo Lucy, C. Okell e colaboradores (2017), na África Oriental, os parasitas têm um limite maior de tolerância a SP do que os encontrados na África Ocidental, onde os parasitas apresentam um limite de resistência menor à SP (Lucy *et al.*, 2017).

O fator mais importante na malária durante a gravidez será reduzir a duração da infeção parasitária, que é o objetivo do TIP, uma vez que já mostrou eficiência na redução da anemia materna, do baixo peso à nascença e o parto prematuro que são os fatores de risco que mais contribuem para a mortalidade neonatal e infantil (Demba, 2006). Estudos realizados em recém-nascidos de mães que receberam o SP-TIP

demonstraram que o seu peso médio era maior do que os recém-nascidos de mães que não receberam SP-TIP. Além disso, as mulheres sujeitas a este tratamento apresentaram menor prevalência de partos prematuros (Kassam *et al.*, 2006, Van Geertruyden *et al.*, 2004). Estudo realizado no Benin por Bertin e colaboradores (2011) demonstrou que, apesar da presença de marcadores moleculares de resistência dos haplótipos 51I/59R/108N e 51I/59R/108N + 437G, a SP permanece eficaz tal como confirmado por uma revisão efetuada por ter Kuile e seus colaboradores (2007), ou seja, o TIP com SP é efetivo até certo nível de resistência. Relativamente às doses de SP, estudos indicaram que a toma de 3 doses ou mais durante segundo e terceiro trimestres foi associada a um aumento de peso à nascença quando comparado com o regime padrão de 2 doses (Kassoum *et al.*, 2013).

As mulheres que realizaram tratamento com cloroquina (CQ) apresentaram maior prevalência do triplo mutante do gene *pfdhfr* (51I/59R/108N) e do duplo mutante do gene *pfdhps* (437G/540E) do que as mulheres que realizaram os outros tipos de fármaco. A monoterapia com CQ foi altamente eficaz no tratamento da malária durante vários anos mas, o aparecimento de resistência em *P. falciparum* tornou-se um desafio para os programas de controlo, sendo então substituída por SP (Clyde, 1987). Num estudo realizado por Briand e colaboradores (2008), evidenciou claramente que o TIP foi mais benéfico para as mulheres durante a gravidez do que a profilaxia CQ. Embora o TIP com sulfadoxina-pirimetamina, como atualmente recomendado pela OMS, seja atualmente a estratégia de prevenção eficaz e adequada, há preocupações sobre sua eficácia futura, particularmente devido ao aumento da prevalência da resistência dos parasitas à sulfadoxina-pirimetamina. Embora seja provável que a sulfadoxina-pirimetamina seja substituída em breve por uma droga antimalárica mais eficaz, não se sabe quando esta mudança será necessária. Neste trabalho verificou-se que a única mulher que apresentou o mutante quártuplo nos três compartimentos era primípara e não tinha indicação de ter tomado qualquer tipo de fármaco.

Relativamente às novas mutações encontradas nos dois genes, é necessário manter a sua vigilância, uma vez que ainda não foram descritas. Foi a placenta que apresentou parasitas com mais frequência de SNPs nos genes *pfdhfr* e *pfdhps*. Investigar o papel das novas SNPs na resistência à SP será necessário, pela importância da SP no TIP. Estudos mais alargados nesse órgão são também importantes e necessários para se

detetar possíveis mecanismos de resistência específicos. A monitorização das mutações deve ser mantida, usando marcadores moleculares, como base de vigilância de resistência à SP, de forma a garantir a eficácia dos programas de controlo e estratégias de prevenção da malária nas grávidas e nas crianças. Na ausência de outro tipo de prevenção adequada, e segundo os nossos resultados, o uso da SP continua viável para o TIP em Luanda.

Pelo seu impacto positivo na saúde materna e infantil, deve ser usada em todas as regiões endémicas de malária, desde que na ausência de haplótipos sêxtuplos, prevalência de 540E < 95% e 581G < 10%, como recomenda a OMS (Lucy *et al.*, 2017).

A política atual do TIP, é baseada na prevalência de marcadores de resistência em indivíduos infetados. Será fundamental caracterizar ainda mais as relações entre o impacto clínico do TIP - SP com as mutações *pfdhfr* e *pfdhps* e o mecanismo biológico de ação da SP (Lucy *et al.*, 2017).

A vigilância da malária é importantes para informar e apoiar estratégias de prevenção, controlo e eliminação de doença.

O presente estudo fornece dados sobre a prevalência de mutações que conferem resistência à sulfadoxina-pirimetamina, em mulheres grávidas de Luanda-Angola, podendo ser uteis servindo de base para estudos futuros.

5-Considerações Finais

5 Considerações Finais

A prevalência do haplótipo formado pela associação, dos gene *pfdhfr* e gene *pfdhps*, 51I/59R/108N/437G/540E (20%), ligado à falha do tratamento com SP, ressalta a necessidade de se monitorar os marcadores moleculares, implicados na resistência à SP, para se reavaliar o uso atual da SP no TIP a mulheres grávidas, em Angola. No entanto é importante encontrar uma alternativa a SP para o TIP, à medio prazo para regiões onde a resistência a SP, esteja confirmada.

Devido ao aumento da resistência do *P. falciparum* a SP, e devido a sua vida útil para o uso no TIP, ensaios clínicos realizados com a Mefloquina, graças a sua longa vida útil de eliminação, proporciona um logo período profilático de pós-tratamento, poderia ser uma boa escolha em relação a SP, na prevenção do baixo peso à nascença e foi também mais eficaz na prevenção da malária placentária, malária clínica e anemia materna, no entanto foi menos bem tolerada do que a SP, mesmo quando divide a dose em 2 dias, comprometendo o seu uso em larga escala no TIP. Estes resultados não suportam uma alteração na atual política do TIP recomendada pela OMS (Briand *et al.*, 2008 e Briand *et al.*, 2009). A SP e MQ foram considerados equivalentes e altamente eficazes na prevenção de BPN (Bertin *et al.*, 2011).

O uso de Amodiaquina (AQ) como dose única ou sua combinação com SP mostrou ser uma opção para o tratamento da malária na gravidez. No entanto, num estudo realizado por Clerk *et al.*, 2008 mostrou que, embora AQ e SPAQ sejam tão eficazes quanto SP para TIP em áreas onde há um nível relativamente baixo de resistência a esses dois medicamentos, a alta incidência de eventos adversos associados à administração de AQ ou de SPAQ limita a adequação desses tratamentos para o TIP.

Apesar da resistência, o uso da SP continua a ser benéfico, até certos níveis de resistência (Ebako *et al.*, 2013). Contudo, é imprescindível monitorizar a eficácia do TIP-SP, implementar com segurança o uso de 3 doses, segundo as novas recomendações da OMS, e monitorizar a eficácia da entrega do TIP-SP, nas consultas pré-natal, para proteção das mulheres contra desfechos adversos da malária na gravidez.

No futuro, será necessário basear a decisão de mudar para antimaláricos mais eficazes do que a sulfadoxina-pirimetamina na associação entre vários indicadores, alguns clínicos (como peso ao nascer, infeção placentária e anemia materna) e outros

mais diretamente relacionados à droga (como a eficácia *in vivo* da sulfadoxina-pirimetamina em mulheres grávidas e não em crianças e os marcadores moleculares da resistência à sulfadoxina-pirimetamina). Uma vez que a relação entre os marcadores de resistência, eficácia protetora do TIP e os marcadores clínicos, ainda não está estabelecida, há necessidade de se realizar o monitoramento contínuo da eficácia e efetividade do TIP com sulfadoxina-pirimetamina em mulheres grávidas. Há também a necessidade de avaliar medicamentos antimaláricos alternativos para uso futuro no TIP. Como sugerido, a Mefloquina pode ser uma das opções mais atraentes. Finalmente, deve-se ter em mente que as mudanças na política de prevenção são difíceis de realizar, porque afetam substancialmente os programas para educar a população-alvo, as organizações de saúde e a rede de fornecimento de medicamentos. Tais mudanças também têm um custo econômico e político considerável que deve ser cuidadosamente ponderado.

A investigação de fármacos alternativos para uso futuro no TIP, como por exemplo a mefloquina, é fundamental e urgente. Uma vez que, mulheres que realizam o TIP apresentam maior proteção contra a anemia, mortalidade neonatal e redução do baixo peso nascença, e desenvolvimento do feto intrauterina.

6-Referências Bibliográficas

6 Referências Bibliográficas

Adam, I., Elhassan, E.M., Haggaz, A.E., Ali A.A., and Adam, G.K. (2011) A perspective of the epidemiology of malaria and anaemia and their impact on maternal and perinatal outcomes in Sudan. *J Infect Dev Ctries.* 5(2): 83-7.

Anya, S.E. (2004) Seasonal variation in the risk and causes of maternal death in the Gambia: malaria appears to be an important factor. *Am J Trop Med Hyg.* 70(5):510-3.

Ali, A.A, Okud, A., Khojali, A., and Adam, I. (2012) High incidence of obstetric complications in Kassala Hospital, Eastern Sudan. *J Obstet Gynaecol.* 32(2): 148-9.

Alifrangis, M., Nag, S., Schousboe, M.L, Ishengoma, D., Lusingu, J., Pota, H. (2014) Independent origin of *Plasmodium falciparum* antifolate super-resistance, Uganda, Tanzania and Ethiopia. *Emergência Infect Dis* 20(8): 1280-1286.

Alvarez, R., Khan, A., Apuzzio, J. (2005). Malaria in Pregnancy. *Journal of Infectious diseases obstetric Gynecology.* 13. 229 – 36.

Aziken, M.E., Akubuo, K.K., Gharoro, E.P. (2011) Efficacy of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine on placental parasitemia in pregnant women in midwestern Nigeria. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 112:30–33.

Babiker, H.A., Walliker, D. (1997). Current Views on the population structure of *Plasmodium falciparum*: implications for control. *Parasitology Today* 13 (7): 262-267.

Basco, L.K., Péculas, P.E., Wilson, C.M., Le Bras, J., Mazabraud, A. (1995) Point mutation in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and pyrimethamine and cycloguanil resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 69: 135-138.

Bassey, G., Nyengidiki, T.K., John, C.T. (2015) Prevalence of placenta *Plasmodium* parasitemia and pregnancy outcome in asymptomatic patients at delivery in a university teaching hospital in Nigeria. *Niger J Clin Pract.* 18(1):27-32.

Beck, S., *et al.* (2001) Multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection in pregnancy. *Am J Trop Med Hyg.* 65:631–636.

Beeson, J.G., Cooke, B.M., Rowe, J.A., & Rogerson, S.J. (2002) Expanding the paradigms of placental malaria. *Trends Parasitol* 18(4):145-147.

Bertin, G., Briand, V., Bonaventure, D., Carrieu, A., Massougbdji, A., Cot, M., and Deloron, P. (2011) Molecular markers of resistance to sulphadoxine-pyrimethamine during intermittent preventive treatment of pregnant women in Benin. *Malar J.* 10: 196.

Brabin, B.J., Romagosa, C., Abdelgalil, S., Menéndez, C., Verhoeff, F.H., McGready, R., Fletcher, K.A., Owens, S., d'Alessandro, U., Nosten, F., Fischer, P.R., & Ordi, J. (2004) The Sick Placenta. The role of Malaria placenta 25, 359-378.

Brabin, B.J. (1983) An analysis of malaria infection in Africa. Bulletin of the World Health Organization, 61, 1005-1016.

Briand, V., Denoeud, L., Massougbody, A., and Cot, M. (2008) Efficacy of intermittent preventive treatment versus chloroquine prophylaxis to prevent malaria during pregnancy in Benin. J Infect Dis. 198(4): 594-601.

Briand, V., Bottero, J., Noel, H., Masse, V., Cordel, H., Guerra, J., Kossou, H., Fayomi, B., Ayemonna, P., Fievet, N., Massougbody, A., and Cot, M. (2009) Intermittent treatment for the prevention of malaria during pregnancy in Benin: a randomized, open-label equivalence trial comparing sulfadoxine-pyrimethamine with mefloquine. J Infect Dis. 200(6): 991-1001.

Bruce-Chwatt, L.J., Garnham, P.C., Shute, P.G. & Draper, C.C. (1970). Induced double infection with *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* in a splenectomized chimpanzee. Trans R Soc Trop Med Hyg 64, 2.

Brustoski, K., Moller, U. & Kramer, M. (2006) Reduced cord blood immune effector-cell responsiveness mediated by CD4+ cells induced in utero as a consequence of placental *Plasmodium falciparum* infection. J Infect Dis 193:146-54.

Brooks, D.R., Wang, P., Read, M., Watkins, W.M., Sims, P.F., Hyde, J.E. (1994) Sequence variation of the hydroxymethyl-dihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. Eur. J. Biochem. 224:397-405.

Campos, P.A., Valente, B., Campos, R.B., Gonçalves, L., Rosário, V.E., Varandas, L., Silveira, H. (2012) *Plasmodium falciparum* infection in pregnant women attending antenatal care in Luanda, Angola. Rev Soc Bras Med Trop. 45(3):369-74.

Campos, P.A. (2011) *Caracterização de Factores de Risco da Malária Placentária por Plasmodium falciparum em Luanda*. Dissertação para obtenção do grau de Doutor, ramo das Ciências Biomédicas, especialidade Parasitologia. IHMT – Universidade Nova de Lisboa 134pp.

Chico, R.M., Mayaud, P., Ariti, C., Mabey, D., Ronsmans, C., and Chandramohan, D. (2012) Prevalence of malaria and sexually transmitted and reproductive tract infections in pregnancy in sub-Saharan Africa: a systematic review. JAMA. 307(19): 2079-86.

Clerk, C.A., Bruce, J., Affipunguh, P.K., Mensah, N., Hodgson, A., Greenwood, B., and Chandramohan, D. (2008) A randomized, controlled trial of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine, amodiaquine, or the combination in pregnant women in Ghana. J Infect Dis. 198(8): 1202-11.

Clyde, D.F. (1987) Recent trends in the epidemiology and control of malaria. Epidemiol Rev. 9:219-243.

Cohee, M.L., Kalilani-Phiri, L., Mawindo, P., Joshi, S., Adams, M., Kenefic, L., Jacob, G.C., Taylor, E.T., and Laufer, K.M. (2016) Parasite dynamics in the peripheral blood and the placenta during pregnancy-associated malaria infection. Malar j. 15:483.

Consultoria de Serviços e Pesquisas – COSEP Lda., Consultoria de Gestão e Administração em Saúde – Consaúde Lda., & Macro International Inc. (2007). *Inquérito de Indicadores de Malária em Angola 2006-07*. Calverton, Maryland. Retrieved from <http://www.measuredhs.com/pubs/pdf/MIS3/MIS3.pdf>.

Cortese, J.F., Caraballo, Alejandro, Contreras, C.E., Plowe, C.V. (2002) Origin and Dissemination of *Plasmodium falciparum* drug-resistance Mutation in South America. *J Infect Dis* 186: 999-1006.

Cosep Consultoria, Consaúde, & I.C.F. Macro. (2011) *Inquérito de Indicadores de Malária em Angola*. Calverton, Maryland. Cosep Consultoria, Consaúde e ICF Macro. 2011. *Inquérito de Indicadores de Malária em Angola de 2011*. Calverton, Maryland: Cosep consultoria, Consaúde e ICF Macro e ICF Macro. Retrieved from <http://www.measuredhs.com/pubs/pdf/MIS10/MIS10.pdf>

Cottrell, G., Mary, J.Y., Barro, D. & Cot, M. (2005) Is Malarial Placental Infection Related to Peripheral Infection at any time of Pregnancy? *Am J Trop Med Hyg.* 73:1112-1118.

De Beudrap, P., Turyakira, E., White, L.J., Nabasumba, C., Tumwebaze, B., Muehlenbachs, A., Guérin, P.J., Boum, Y., McGready, R., Piola, P. (2013) Impact of malaria during pregnancy on pregnancy outcomes in a Ugandan prospective cohort with intensive malaria screening and prompt treatment. *Malar J.* 12:139.

Demba, S., Laurence, M., Alioune, G., Jean, M.D., Makhtar, N., Odile, M.P., Jean, Y.L., and Ronan, J. (2006) High prevalence of placental malaria and low birth weight in Shaelian periurban área. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75(1), 171-177.

Desai, M., *et al.* (2016) Impact of Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistance on Effectiveness of Intermittent Preventive Therapy for Malaria in Pregnancy at Clearing Infections and Preventing Low Birth Weight. *Clin Infect Dis.* 62:323–33.

Desai, M., ter Kuile, F.O., Nosten, F., Asamoah, K., McGready, R., Braibin, B., and Newman, R.D. (2007) Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet infectious Diseases* 7, 98 – 104.

Dunyo, S., Ord, R., Hallett, R., *et al.* (2006) Randomised trial of chloroquine/sulphadoxine/pyrimethamine in Gambian children with malaria: Impact against multidrug-resistant *P. falciparum*. *PLoS Clin Trials*; 1: e14.

Ebako, N.T., and Umberto, D'Alessandro. (2013) Malaria in pregnancy. *Mediterr J of Hematol Infect Dis* 5(1).

Falade, C.O., Yusuf, B.O., Fadero, F.F., Mokuolu, O.A., Hamer, D.H., Salako, L.A. (2007) Intermittent preventive treatment with sulphadoxine-pyrimethamine is effective in preventing maternal and placental malaria in Ibadan, south-western Nigeria. *Malar. J.* 6:88.

Falade, C.O., Mokuolu, O.A., Okafor, H.U., Orogade, A.A., Falade A.G., Adedovin, O., Oguonu, T., Aisha, M., Hamer, D., H., Callahan, M.V. (2007) Epidemiology of congenital malaria in Nigeria: a multi-centre study. *Trop Med Int Health* 12: 1279-1287.

Figueiredo, P., Benchimol C., Lopes, D., Bernardino, L., do Rosário, V.E., Varandas, L. *et al.* (2008) Prevalence of *pfmdr1*, *pfcr1*, *pfdhfr* and *pfdhps* mutations associated with drug resistance, in Luanda, Angola. *Malar J* 7:236.10

Fortes, F., Dimbu, R., Figueiredo, P., Neto, Z., do Rosário, V.E., Lopes, D. (2011) Evaluation of prevalence's of *pfdhfr* and *pfdhps* mutations in Angola. *Malar J* 10:22.

Frances, G., Patricia, G. (2008) *Prevenção e Controlo da Malaria durante a Gravidez. Manual de referência para profissionais de saúde. 2ª Edição pela Jhpiego. 65pp.*

Fried, M., Nosten, F., Brockman, A., Brabin, B.J. & Duffy, P.E. (1998) Maternal antibodies block malaria. *Nature* 395:851-2.

Gama, B.E., Pereira-Carvalho, G.A.L., Lutucuta, Kosi, F.J.I, de Oliveira, N.K.A, Fortes, F., Rosenthal, P.J., *et al.* (2011) Molecular markers of antifolate resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Luanda, Angola. *Malar J* 10:248.

Gebbru-Woldearegai, T., Hailu, A., Grobusch, M.P., Kun, J.F. (2005) Vigilância molecular de mutações em dihidrofolato redutase e genes de dihidropteroate sintase de *Plasmodium falciparum* na Etiópia. *Am J Trop Med Hyg* 6: 1131-1134.

Gesase, S., Gosling, R.D., Hashim, R., Ord, R., Naidoo, I., Madebe, R., Mosha, J.F., Joho, A., Mandia, V., Mrema, H., Mapunda, E., Savael, Z., Lemnge, M., Mosha, F.W., Greenwood, B., Roper, C., Chandramohan, D. (2009) High resistance of *Plasmodium falciparum* to sulphadoxine/pyrimethamine in northern Tanzania and the emergence of *dhps* resistance mutation at Codon 581. *PLoS One*. 4:e4569.

Gilles H.M. (1989). Malaria an overview. *J Infect* 18, 11-23.

Gutman, J., Kalilani, L., Taylor, S., Zhou, Z., Wiegand, R.E., Thwai, K.L., *et al.* (2015) *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthetase-A581G mutation reduces effectiveness of sulfadoxine-pyrimethamine preventive therapy in Malawian pregnant women. *J Infect Dis*. 211(12):1997–2005.

Guyatt, H.L. & Snow, R.W. (2004) Impact of Malaria during Pregnancy on Low Birth weight in sub-Saharan Africa. *Clin Microbiol Rev* 17 (4): 760-769.

Harrington, W.E, *et al.* (2009) Competitive facilitation of drug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria parasites in pregnant women who receive preventive treatment. *Proc Natl Acad Sci USA*.106:9027–9032.

Harrington, W.E., Mutabingwa, T.K., Kabyemela, E., Fried, M., Duffy, P.E. (2011) Intermittent treatment to prevent pregnancy malaria does not confer benefit in an area of widespread drug resistance. *Clin Infect Dis.* 53:224–30.

Ismail, M.R., Ordi, J., Menendez, C., Ventura, P.J., Aponte, J.J., Kahigwa E., Hirt, R., Cardesa, A., and Alonso, P.L. (2000) Placental pathology in malaria: a histological, immunohistochemically, and quantitative study. *Hum Pathol.* 31(1): 85-93.

Jansson, T. & Powell, T.L. (2007) Role of the placenta in fetal programming; underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin Sci (London)* 113 (1) 1 – 13.

Kamewendo, D.D., Dzinjalama, F.K. & Snounou, G. (2002) *Plasmodium falciparum*: PCR detection and genotyping of isolates from peripheral, placental, and cord blood of pregnant Malawian women and their infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96:145-149.

Kassam, S.N., Nesbitt, S., Hunt, L.P., Oster, N., Soothill, P., Sergi, C. (2006) Pregnancy outcomes in women with and without placental malaria infection. *Int J Gynaecol Obstet.* 93(3):225-32.

Kassoum, K., Paul, G., Anne, M.E., *et al.* (2013) Intermittent preventive therapy for malaria during pregnancy using 2 vs 3 or more doses of sulphadoxine-pyrimethamine and risk of low birth weight in Africa. *JAMA* 309(6):594-604.

Kattenberg, J.H., Ochodo, E.A., Boer, K.R., Schallig, H.D., Mens, P.F., Leeftang, M.M. (2011) Systematic review and meta-analysis: rapid diagnostic tests versus placental histology, microscopy and PCR for malaria in pregnant women. *Malar J.* 10:321.

Knell, A.J. (1988). Origin of *falciparum*. *Parasitol Today* 4, 20.

Knell, A.J. (1991) *Malária*, The Wellcome Trust, Oxford University.

Kublin, J.G., Dzinjalama, F.K., Kamwendo, D.D., Malkin, E.M., Cortes, J.F., Martino, L.M., Mukadam, R.A., Rogerson, S.J., Lescano, A.G., Molyneux, M.E., Winstanley, P.A, Chimpeni, P., Taylor, T.E., Plowe, C.V. (2002) Molecular markers for failure of sulfadoxine pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *Journal of Infectious Diseases* 185: 380-388.

Kun, J., F., Lehman, L., G., Lell, B., *et al.* (1999) Low-dose treatment with sulphadoxine/pyrimethamine combinations selects for drug-resistant *Plasmodium falciparum* strains. *Antimicrob Agents Chemother*; 43:2205-8.

Lucy, C.O., Jamie, T.G., Cally, R. (2017) Mapping sulphadoxine-pyrimethamine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in infected humans and in parasite populations in Africa. *Scientific reports.*7:7389.

Lynch, C., Pearce, R., Pota, H. (2008) Emergence of a dhfr mutation conferring high-level drug resistance in *Plasmodium falciparum* populations from southwest Uganda. *J Infect Dis* 197: 1598-1604.

Matteelli, A., Donato, F. & Shein, A. (1994) Malaria and anemia in pregnant women in urban Zanzibar, Tanzania. *Ann Trop Med Parasitol.* 88: 475-483.

Matteelli, A., Donato, F., Shein, A., Muchi, J.A., Abass, A.K., Mariani, M., Leopardi, O., Maxwell, C.A., Carosi, G. (1996) Malarial infection and birthweight in urban Zanzibar, Tanzania. *Ann Trop Med Parasitol.* 1996 Apr; 90 (2):125-34.

Marc, C., Tahita, Halidou, T., Annette, E., Adama, K., Robert, F., Chantal, V., Anna, R.U., Jean-Bosco, O., Robert, T.G., Jean-Pierre, V.G., Umberto, D. (2015) Prevalence of the dhfr and dhps Mutations among Pregnant Women in Rural Burkina Faso Five Years after the Introduction of Intermittent Preventive Treatment with Sulfadoxine-Pyrimethamine. *PLoS ONE* 10 (9).

Marcelo Urbano Ferreira, Annette Silva Foronda & Teresinha Tizu Sato Schumaker. (2003) *Fundamentos Biológicos da Parasitologia Humana* 1ª Edição – Barueri, SP: Manole.

Mayor, A.G., Gomez-Olive, X., Aponte, J.J., Casimiro, S., Mabunda, S., Dgedge M., Barreto, A., Alonso, P.L. (2001) Prevalence of the K76T mutation in the putative *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*pfcr*) gene and its relation to chloroquine resistance in Mozambique. *Journal of Infectious Disease.*

Menendez, C., Ordi, J., Ismail, M.R., Ventura, P.J., Aponte, J.J., Kahigwa, E., Font, F., Alonso, P.L. (2000) The impact of placental malaria on gestational age and birth weight. *J Infect Dis* 181:1740–1745.

Menendez, C., Mayor, A. (2007) Congenital malaria: the least known consequence of malaria in pregnancy. *Semin Fetal Neonatal Med* 12:207–213.

Ministério da Saúde da República de Angola. *Plano Nacional de Desenvolvimento Sanitário 2012-2015*. Ministério da Saúde da República de Angola Abril, 2014. Volume 2.

Mishra, N., Srivastava, B., Bharti, R.S., Rana, R., Kaitholia, K., Anvikar, A.R., Das, M.K., Ghosh, S.K., Bhatt R.M., Tyagi, P.K., Dev, V., Phookan, S., Wattal, S.L., Sonal, G.S., Dhariwal, A.C., Valecha, N. (2016) Monitoring the efficacy of antimalarial medicines in India via sentinel sites: Outcomes and risk factors for treatment failure. *J Vector Borne Dis.* 53(2):168-78.

Mockenhaupt, F.P., Eggelte, T.A., Till, H., Bienzle, U. (2001) *Plasmodium falciparum* *pfcr* and *pfmdr1* polymorphisms are associated with the *pfdhfr* N108 pyrimethamine-resistance mutation in isolates from Ghana. *Trop Med Int Health* 6:749-55.

Naidoo, I., Roper, C. (2013) Mapping partially resistant, fully resistant, and super resistant malaria. *Trends Parasitol.* 29(10):505-15.

Netter, F.H. (1965) *The Ciba Collection of medical illustrations*, vol 2 Reproductive System.

Ngane, F.V., Allico, D.J., Culeux, C., Piette, N., Carnevale, P., Besnard, P., *et al.* (2015) Molecular epidemiology of drug-resistant *Plasmodium falciparum* in Benguela province, Angola. *Malar J* 14:113.

Nzila, A.M., Mberu, E.K., Sulo, J., Dayo, H., Winstanley, P.A., Sibley, C.H., and Watkins, W.M. (2000) Towards an understanding of the mechanism of pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: genotyping of dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of Kenyan parasites. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:991–996.

Ofori, M.F., Ansah, E., Agyepong, I., Ofori-Adjei, D., Hviid, L. and Akanmori, B.D. (2009) Pregnancy-Associated Malaria in a Rural Community of Ghana. *GMJ – Ghana Medical Journal* 43(1):13-18.

Pearce, R., Pota, H., Evehe, M.B., Bâ el, H., Mombo-Ngoma, G., Malisa, A.L., Ord, R., Inojosa, W., Matondo, A., Diallo, D.A., Mbacham, W., van den Broek, IV., Swarthout, T.D., Getachew, A., Dejene, S., Grobusch, M.P., Njie, F., Dunyo, S., Kweku, M., Owusu-Agyei, S., Chandramohan, D., Bonnet, M., Guthmann, J.P., Clarke, S., Barnes, K.I., Streat, E., Katokele, S.T., Uusiku, P., Agboghoroma, C.O., Elegba, O.Y., Cissé, B., A-Elbasit, I.E., Giha, H.A., Kachur, S.P., Lynch, C., Rwakimari, J.B., Chanda, P., Hawela, M., Sharp, B., Naidoo, I., Roper, C. (2009) Multiple origins and regional dispersal of resistant *dhps* in African *P. falciparum* malaria.

Peterson, D.S., Walliker, D., Wellems, T.E. (1988) Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in *P. falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA*; 85: 9114-8.

Plowe, C.V., Cortese, J.F., Djimde, A., Nwanyanwu, O.C., Watkins, W.M., Winstanley, P.A., Estrada-Franco, J.G., Mollinedo, R.E., Avila, J.C., Cespedes, J.L., Carter, D., Doumbo, O.K. (1997) Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *J. Infect. Dis.* 176:1590–1596.

Riley, E.M., Schneider, G., Sambou, I. & Greenwood, B.M. (1989) Suppression of cell-mediated immune responses to malaria antigens in pregnant Gambian women. *Am J Trop Med Hyg.* 40: 141-144.

Riley, E.M., Wagner, G.E., Akanmori, B.D. & Koram, K.A. (2001) Do maternally acquired antibodies protect infants from malaria infection? *Parasite Immunology* 23:51-9.

Romagosa, C., Ordi, J., Saute, F., Quinto, L., Machungo, F., Ismail, M.R., Carrilho, C., Osman, N., Alonso, P.L., and Menendez, C. (2007) Seasonal variations in maternal mortality in Maputo, Mozambique: the role of malaria. *Trop Med Int Health*. 12(1): 62-7.

Salgueiro, P., Vicente, J.L., Ferreira, C., Teófilo, V., Galvão, A., do Rosário, V.E., *et al.* (2010) Tracing the origins and signatures of selection of antifolate resistance in island populations of *Plasmodium falciparum*. *BMC Infect Dis*. 2010; 10:163.

Sibley, C.H., Hyde, J.E., Sims, P.F., Plowe, C.V., Kublin, J.G., Mberu, E.K., Cowman, A.F., Winstanley, P.A., Watkins, W.M., Nzila, A.M. (2001) Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? *Trends in Parasitology* 17: 582-588.

Simia, A.O., Hagir, E.I., Ishag, A., Mutasim, A., Ali, N.N., Abdelrahim, M.A., Mohammed, O.E., and Suad, M.S. (2017) Placental malaria and its effect on pregnancy outcomes in Sudanese women from Blue Nile State. *Malaria Journal* 16:374.

Snow, R.W., Nahelen, B., Palmer, A., Donnelly, C.A., Gupta, S., & Marsh, K. (1998) Risk of severe malaria among African infants; direct evidence of clinical protection during early infancy. *Journal of Infections disease* 3, 819-822.

Steketee, R.W., Nahlen, B.J., Parise, M.E., and Menendez, C. (2001) The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. *Am J Trop Med Hyg* 64 (suppl. 1-2): 28-35.

Taco, E.A., Zhou, A., Lohoue, J., Leke, R., Taylor, D.W. & Leke, R.F. (2005) Risk factors for placental malaria and its effect on pregnancy outcome in Yaoundé, Cameroon. *Am J Trop Med Hyg* 72:236-242.

Tarnchompoo, B., Sirichaiwat, C., Phupong, W., Intaraudom, C., Sirawaraporn, W., Kamchonwongpaisan, S., Vanichtanankul, J., Thebtaranonth, Y., Yuthavong, Y. (2002) Development of 2,4-diaminopyrimidines as antimalarials based on inhibition of the S108N and C59R + S108N mutants of dihydrofolate reductase from pyrimethamine-resistant *Plasmodium falciparum*. *J Med Chem* 45:1244-52.

ter Kuile, F.O., van Eijk, A.M., and Filler, S.J. (2007) Effect of sulfadoxine-pyrimethamine resistance on the efficacy of intermittent preventive therapy for malaria control during pregnancy: a systematic review. *JAMA*. 297(23): 2603-16.

Thevenon, A.D., Zhou, J.A., Megnekou, R., Ako, S., Leke, R.G., and Taylor, D.W. (2010) Elevated levels of soluble TNF receptors 1 and 2 correlate with *Plasmodium falciparum* parasitemia in pregnant women: potential markers for malaria-associated inflammation. *J Immunol*. 185(11): 7115-22.

Tobian, A.A., Mehlotra, R.K., Malhotra, I., Wamach, A., Mungai, P. & Koeh, D. (2000) Frequent umbilical cord—blood and maternal-blood infection with

Plasmodium falciparum, *P. malariae* and *P. ovale* in Kenia. *Journal of Infectious Diseases* 182:558-63.

Trampuz, A., Jereb, M., Muzlovic, I., Prabhu, R.M. (2003) Clinical review: Severe malaria. *Crit care*, 7, 315-323.

Triglia, T., Menting, J.G., Wilson C., *et al.* (1997) Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 94: 13944-9.

Triglia, T., Wang, P., Sims, P.F.G., Hyde, J.E., Cowman A.F. (1998) Allelic exchange at the endogenous genomic locus in *Plasmodium falciparum* proves the role of dihydropteroate synthase in sulfadoxine-resistant malaria. *EMBO J.* 17:3807–3815.

Umbers, A.J., Boeuf, P., Clapham, C., Stanistic, D.I., Baiwog, F., Mueller, I., Siba, P., King, C.L., Beeson, J.G., Glazier, J., and Rogerson, S.J. (2011) Placental malaria-associated inflammation disturbs the insulin-like growth factor axis of fetal growth regulation. *J Infect Dis.* 203(4): 561-9.

Uneke, C.J. (2007) Impact of Placental *Plasmodium falciparum* Malaria on Pregnancy and Perinatal Outcome in Sub-Saharan Africa. *Yale J Biol Med.* 80:39-50.

Van Geertruyden, J.P., Thomas, F., Erhart, A., D'Alessandro, U. (2004) The contribution of malaria in pregnancy to perinatal mortality. *Am J Trop Med Hyg* 71(2 Suppl):35-40.

Venkatesan, M., Alifrangis, M., Roper, C., Plowe, C.V. (2013) Monitoring antifolate resistance in intermittent preventive therapy for malaria. *Trends Parasitol* 10: 497-504.

Walker P.G.T., Floyd Jessica, Kuile F. ter, and Cairns Matt (2017) Estimated impact on birth weight of scaling up intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy given sulphadoxine-pyrimethamine resistance in Africa: A mathematical model. *PLoS Med*, 14(2).

Wang, P., Lee, C.S., Bayoumi, R, Djimde, A., Doumbo, O., Swedberg, G., Dao, L.D., Mshinda H., Tanner, M., Watkins, W.M., Sims, P.F., Hyde, J.E. (1997) Resistance to antifolates in *Plasmodium falciparum* monitored by sequence analysis of dihydropteroate synthetase and dihydrofolate reductase alleles in a large number of field samples of diverse origins. *Mol. Biochem. Parasitol.* 89:161–177

Watkinson, M. & Rushton, D.I. (1983) Plasmodial pigmentation of placenta and outcome of pregnancy in West African mothers. *Br Med J (Clin Res Ed)* 287:251-254.

World Health Organization. (2004) A strategic framework for malaria control and prevention during pregnancy in the African region. AFR/MAL/04/01. WHO Regional Office for Africa, Brazzaville, Congo.

World Health Organization. (2005) World Malaria Report 2005. WHO, Geneva.

World Health Organization. (2013) WHO Evidence Review Group on Intermittent Preventive Treatment (IPT) of Malaria in Pregnancy. http://www.who.int/malaria/mpac/mpac_sep13_erg_ipt_malaria_pregnancy_report.pdf

World health Organization. (2016)
http://www.who.int/malaria/publications/country-profiles/profile_ago_en.pdf

World Health Organization. (2017) World Malaria Report, 2017.

Zolg JW, Plitt JR, Chen GX, Palmer S.(1989) Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene as the molecular basis for pyrimethamine resistance in Plasmodium falciparum. Mol Biochem Parasitol. Oct;36(3):253-62.

Anexos

Anexo 1

PROJECTO: Caracterização e Factores de Risco da Malária Placentar **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E INFORMADO**

A Sra. foi escolhida pelo seu médico-assistente e equipa deste serviço para participar num estudo sobre “Caracterização e Factores de Risco da Malária Placentar”, com a aprovação do Comité de ética Nacional.

Por favor, leia estas informações com atenção.

Pergunte à equipa presente o que achar necessário.

A sua participação é livre e, caso não queira tomar parte do estudo, a atenção médica para a sua situação de saúde será garantida.

1. Objectivos gerais do estudo

Caracterizar a malária placentar em mulheres angolanas, e determinar factores do hospedeiro e do parasita associado ao mau prognóstico.

2. Justificação

A escassa existência de dados nestas áreas, em Angola, torna fundamental a realização de pesquisas que contribuam para o melhor conhecimento da malária na grávida e, conseqüentemente, levem à diminuição da morbidade e da mortalidade materna e perinatal.

3. Procedimentos

Se a Sra. aceitar participar neste estudo, será preenchido um questionário com os seus dados (anexar o formulário para o conhecimento e perguntas) que será guardado em conjunto com os questionários dos restantes pacientes. A Sra. poderá ter acesso a eles na presença do seu médico assistente ou de outro membro da equipa, se assim o desejar.

Serão colhidos ainda os seguintes materiais biológicos:

- Algumas gotas de sangue do seu dedo
- Sangue do cordão umbilical
- Sangue da placenta

4. Garantia de sigilo

Todas as informações obtidas durante o estudo serão confidenciais, isto é, são segredos profissionais e não podem ser comentadas. No caso de publicação do estudo, a Sra. não será identificada.

5. Despesas

A sua participação no estudo não envolve despesas adicionais, outros exames além dos previstos para as suas consultas ou internamento. Também não receberá qualquer pagamento pela sua participação.

6. Garantia de informação

A Sra., seu parente ou responsável têm o direito de fazer qualquer pergunta à equipa presente. A sua participação é voluntária, e mesmo que não aceite participar no estudo beneficiará dos cuidados de saúde devidos. Se considerar que está bem esclarecido, por favor leia a folha a seguir e caso esteja tudo claro para si e caso queira participar do nosso estudo, assine juntamente com o membro da equipa, a declaração anexa.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO LIVRE E INFORMADO

Declaro que fui informada sobre todos os passos deste estudo e que me foram dadas de forma clara todas as explicações relacionadas com este projecto.

Todos os dados que vou dar a meu respeito são segredo, isto é, os profissionais de saúde, médicos e enfermeiros envolvidos não poderão comentar e guardarão em local adequado e seguro os registos clínicos. Quando estes dados forem usados para conhecimento dos resultados, de forma falada, em reuniões, ou escrita em revistas científicas, serão apresentados em conclusões ou perguntas, com números ou não, mas sempre em conjunto e sem nomes.

Compreendo também que durante este estudo, os meus direitos ao internamento, consultas e tratamento neste hospital e neste serviço não se alteram, isto quer dizer que continuarei a fazer as análises necessárias ao controlo da minha situação de saúde e a ter os medicamentos adequados.

Entendo que poderei não sentir, como pessoa, qualquer benefício, isto é, diferença para melhor, por causa deste estudo, a não ser os efeitos dos próprios medicamentos, usados

para o meu tratamento. Sei que os benefícios deste estudo podem fazer-se sentir daqui a alguns anos, ou não, para o grupo geral de pessoas afectadas e infectadas pela “ Malária Placentar”.

Também fui informado de que poderei desistir deste estudo e sair a qualquer momento, se esta for a minha vontade.

Se eu decidir sair do estudo, essa decisão não diminui nem altera os cuidados médicos, nem as análises e outros exames para o conhecimento e controlo da minha situação e posso continuar a ter os medicamentos para o tratamento.

Assinatura da doente

Nome

Data

___/___/___

Assinatura do técnico

Nome

Data

___/___/___

Anexo 2



República de Angola
Ministério da Saúde

COMITÉ DE ÉTICA

DECLARAÇÃO

Na sequência da aprovação pela Comissão Coordenadora do Conselho Científico do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa dos documentos de intenção de Doutoramento, o Comité de Ética do Ministério da Saúde, reuniu aos 12 de Abril de 2006, apreciou e analisou do ponto de vista ético os seguintes protocolos de pesquisa:

- 1) Título do Trabalho: "Caracterização e Factores de Risco da Malária Placentar"
Candidato: Paulo Adão de Campos
- 2) Título do Trabalho: "Efeito de Factores do Hospedeiro e Parasitários na Susceptibilidade à Malária e Gravidade da Doença"
Candidato: Maria Fernanda A. Dias Monteiro
- 3) Título do Trabalho: "Opções de Utilização Sequencial de Antiretrovirais em Doentes com Falência Terapêutica em Angola"
Candidato: Maria Helena Fonseca Pereira Agostinho
- 4) Título do Trabalho: "Monitorização Molecular e Epidemiológica da Resistência do *Plasmodium falciparum* aos Antifolatos na Grávida com Tratamento Intermitente e Presuntivo com Sulfadoxina Pirimetamina em Angola"
Candidato: Nilton Saraiva
- 5) Título do Trabalho: Impacto da Implementação do Diagnóstico e Tratamento das Principais Infecções Sexualmente Transmissíveis Curáveis na Saúde Perinatal da Mulher Grávida e do Recém-Nascido
Candidato: Paula Figueiredo

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'C. F. F.' or similar, with a date '12/2' written above it.

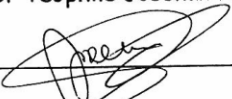
Deliberação:

- 1) O Comité de Ética considerou que os protocolos prevêem o cumprimento dos princípios fundamentais da ética na pesquisa biomédica.
- 2) O Comité recomendou aos candidatos uma especial atenção na preservação das normas de bio segurança e da protecção dos interesses dos participantes (doentes).
- 3) Os pesquisadores devem informar o Comité de Ética nas seguintes eventualidades:
 - Mudança de protocolo
 - Mudança do consentimento informado
 - Mudança no procedimento de recrutamento dos participantes (doentes)
 - Problemas inesperados que atentem contra a segurança dos participantes
- 4) Os pesquisadores devem apresentar anualmente o relatório sobre o estado de implementação dos protocolos com as devidas considerações éticas.


Luanda, 12 de Abril de 2006

Os Membros do Comité

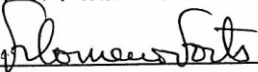
Prof. Dr Teophile Josenando



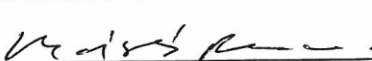
Prof. Dr Raúl Feio



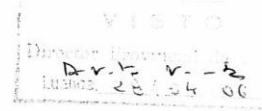
Prof. Dr Filomeno Fortes



Dr Moisés Francisco



Anexo 3



**REPÚBLICA DE ANGOLA
GOVERNO DA PROVINCIA DE LUANDA
DIRECÇÃO PROVINCIAL DE SAÚDE DE LUANDA
GABINETE DO DIRECTOR**

Declaração

Para efeitos de pesquisa em Portugal e a pedido do interessado: **Prof. Dr. Paulo Adão Campos** está devidamente autorizado a deslocar – se para Portugal - Lisboa, com amostras laminadas de artigos biológicos para investigação científica .

E, para constar e devidos efeitos , mandei passar esta declaração que vai por mim assinada e autenticada com o carimbo a óleo em uso nesta Direcção .

**DIRECÇÃO PROVINCIAL DE SAÚDE DE LUANDA, EM LUANDA
AOS 27 DE ABRIL DE 2006.**

O Director Provincial

v. to V-2

**Vita Vemba
MD-MPH**

