

**Daniele Ribatski da Silva**

**Suscetibilidade *in vitro* de isolados de  
*Plasmodium falciparum* da Amazônia  
brasileira às drogas antimaláricas  
convencionais e ao antibiótico tigeciclina.**

Universidade Federal de Mato Grosso  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
Mestrado em Ciências da Saúde

Cuiabá (MT)  
Setembro, 2012

Universidade Federal de Mato Grosso  
Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
Mestrado em Ciências da Saúde

**Suscetibilidade *in vitro* de isolados de  
*Plasmodium falciparum* da Amazônia  
brasileira às drogas antimaláricas  
convencionais e ao antibiótico tigeciclina.**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Faculdade de  
Medicina da UFMT, como requisito  
parcial para a obtenção do grau de  
Mestre em Ciências da Saúde – Área  
de Concentração: Doenças Infecciosas  
e Tropicais.

**Mestranda: Daniele Ribatski da Silva**

**Orientador: Prof. Cor Jesus Fernandes Fontes**

Cuiabá (MT)  
Setembro, 2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.**

S586s Silva, Daniele Ribatski da.

Suscetibilidade in vitro de isolados de *Plasmodium falciparum* da Amazônia brasileira às drogas antimaláricas convencionais e ao antibiótico tigeciclina. / Daniele Ribatski da Silva. -- 2012

74 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Cor Jesus Fernandes Fontes.

Co-orientadora: Carmen Lucia Bassi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Ciências Médicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Cuiabá, 2012. Inclui bibliografia.

1. Malária. 2. Plasmodium falciparum. 3. Tratamento. 4. Resistência. 5. Suscetibilidade in vitro. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.**

Aos meus pais,

que me propiciaram uma vida digna onde eu pudesse crescer, acreditando que tudo é possível, desde que sejamos honestos, íntegros de caráter e tendo a convicção de que desistir nunca seja uma ação contínua em nossas vidas; que sonhar e concretizar os sonhos só dependerão de nossa vontade. Ao meu marido Evandro e a minha filha Carolina pela compreensão da minha ausência como esposa e mãe. Aos meus irmãos Gherhardt e João Vitor que sempre me apoiaram.

## **1. AGRADECIMENTOS**

- A Deus pelo dom da minha vida, onde Ele sempre será o alfa e o ômega.
- Ao meu orientador, Professor Cor Jesus Fernandes Fontes, os maiores e mais sinceros agradecimentos. Sua confiança e orientação foram capazes de me fazer trilhar por um crescimento profissional. Toda minha admiração por seu brilhantismo acadêmico se torna secundária quando contemplo seu lado humanista e sua perseverança em fazer sutilmente um mundo melhor. Orientador é uma palavra ideal para defini-lo: é sob sua tutela que guio meus passos. Muito obrigado!
- Ao Sr Nilson palmeirense de carteirinha, Maria da “malária”, à Gevanil, Edmar, Keilla, Matilde, Sr Fred (SVO) que durante este período se tornaram especiais, através da amizade, palavras de conforto e na ajuda diária. Assim como meus amigos Marcia, Marilene, Marco, Eduardo, Fabio, Luciano Simões, Luciano Teixeira e principalmente a Thamires, para quem deveria dedicar uma página de agradecimento, pois seu auxílio e seu companheirismo foram chaves para o meu sucesso.
- E em especial a Prof.<sup>a</sup> Carmen Lúcia Bassi, pessoa a qual tenho um grande carinho e admiração, esteve ao meu lado desde o começo, assim agradeço pela orientação, apoio, confiança, estímulo e paciência.
- Ao MT-Laboratório que me liberou das minhas atividades profissionais e aos meus colegas de trabalho, os quais talvez se sobrecarregassem em suas atividades para cobrir minha ausência.

## Sumário

<b>1 - Introdução</b>	1
1.1 - Aspectos gerais da doença.	2
1.2 - Aspectos gerais sobre a malária.	2
1.3 - Manifestações clínicas e tratamento da malária.	3
1.3.1 - Drogas recomendadas para o tratamento da malária no Brasil.	6
1.4 - Resistência <i>in vitro</i> do <i>P. falciparum</i> aos antimaláricos.	12
1.5 - Testes de avaliação da susceptibilidade <i>in vitro</i> do <i>P. falciparum</i> aos antimaláricos.	14
1.5.1 - Contagem dos estágios do parasito por microscopia.	15
1.5.2 - Incorporação de radioisótopos em precursores metabólicos do parasito.	15
1.5.3 - Detecção de antígenos produzidos pelo parasito em cultura.	16
1.5.4 - Contagem automatizada de células infectadas.	18
<b>2 - Objetivos</b>	20
2.1 - Objetivo geral.	21
2.2 - Objetivos específicos.	21
<b>3 - Material e métodos</b>	22
3.1 - Local do estudo.	23
3.2 - Isolados de <i>P. falciparum</i> avaliados.	23
3.3 - Preparação das hemácias parasitadas para cultura contínua do <i>P. falciparum</i> .	24
3.4 - Cultura contínua do <i>P.falciparum</i> .	24
3.5 - Sincronização da cultura de <i>P. Falciparum</i> para testes de suscetibilidade <i>in vitro</i> .	27
3.6 - Drogas testadas para atividade antimalárica <i>in vitro</i> contra o <i>P. falciparum</i> .	28
3.7 - Avaliação da atividade antimalárica <i>in vitro</i> das drogas.	29
3.8 - Avaliações da atividade antimalárica <i>in vitro</i> por contagem de hemácias parasitada através da microscopia - teste 48 horas - modificado	30

3.9 - Avaliação da atividade antimalárica <i>in vitro</i> pela análise da produção de HRP2 em elisa.	31
3.10 - Procedimentos de análise dos resultados.	32
3.11 - Considerações éticas.	35
<b>4 - Resultados</b>	<b>36</b>
4.1 - Resultado da implantação da cultura e das técnicas de avaliação da suscetibilidade <i>in vitro</i> do <i>P. falciparum</i> no laboratório de malária do Hospital Universitário Júlio Müller.	37
4.2 - Atividades antimalárica <i>in vitro</i> das drogas convencionais contra isolados clínicos regionais e de referência do <i>P. falciparum</i> .	40
4.3 - Avaliação do potencial de resistência cruzada do <i>P.falciparum</i> entre as drogas antimaláricas convencionais.	42
4.4 - Atividade antimalárica <i>in vitro</i> do antibiótico tigeciclina.	44
<b>5 - Discussão</b>	<b>47</b>
<b>6 - Conclusões</b>	<b>57</b>
<b>7 - Referências bibliográficas</b>	<b>59</b>
<b>8 - Anexos</b>	<b>72</b>

## Lista de Tabelas

- Tabela 1 - Comparação das médias das concentrações de drogas antimaláricas convencionais que induziram metade (EC50%) ou 99% (EC99%) da atividade máxima *in vitro* contra isolados de *P. falciparum* sensíveis e resistentes à cloroquina, avaliada por microscopia 48 horas e ELISA-HRP2. 38
- Tabela 2 - Concentrações de diferentes drogas antimaláricas convencionais que induziram metade (EC50%) *in vitro* contra *P. falciparum* cloroquina-sensível (3D7), cloroquina-resistente (DW2) e isolados da Amazônia brasileira. 41
- Tabela 3 - Comparação das EC50% médias obtidas de diferentes drogas antimaláricas convencionais quando testadas contra isolados de *P. falciparum* cloroquina-sensíveis e cloroquina-resistente. 42
- Tabela 4 - Correlação entre as concentrações de diferentes drogas antimaláricas convencionais que induziram metade (EC50%) da atividade máxima *in vitro* contra *P. falciparum* cloroquina-sensível (3D7), cloroquina-resistente (DW2) e isolados clínicos da Amazônia brasileira. 43
- Tabela 5 - Concentrações de tigeciclina que induziram metade (EC50%) e 99% (EC99%) da atividade máxima *in vitro* contra *P. falciparum* cloroquina-sensível (3D7), cloroquina-resistente (DW2) e isolados da Amazônia brasileira. 44
- Tabela 6 - Correlação entre as concentrações médias de tigeciclina e das drogas antimaláricas convencionais que induziram metade (EC50%) da atividade máxima *in vitro* contra *P. falciparum* cloroquina-sensível, cloroquina-resistente e isolados clínicos da Amazônia brasileira. 45

## Lista de Figura

Figura 1 - Representação esquemática do ciclo biológico do <i>Plasmodium sp.</i>	4
Figura 2 - Estrutura molecular da cloroquina e mefloquina.	7
Figura 3 - Estrutura molecular da quinina.	8
Figura 4 - Estrutura molecular da primaquina.	9
Figura 5 - Estrutura molecular da lumefantrina.	10
Figura 6 - Estrutura molecular da artemisinina.	10
Figura 7 - Amostras de culturas <i>in vitro</i> do <i>Plasmodium falciparum</i> em placas de Petri, em um momento da troca diária do meio de cultura.	25
Figura 8 - Dessecador com chama de vela utilizado para a cultura do <i>P. falciparum</i> .	25
Figura 9- Recipiente hermeticamente fechado, do tipo Tupperware®, adaptado com sistema de válvulas para a introdução da mistura de gás necessária à cultura <i>in vitro</i> do <i>Plasmodium falciparum</i> .	26
Figura 10- Esfregaço obtido de cultura sincronizada de <i>Plasmodium falciparum</i> mostrando hemácias infectadas com predomínio de trofozoítos jovens.	28
Figura 11- Placa pré-doseada com as drogas e com hemácias parasitadas	30
Figura 12 - Esfregaços delgados confeccionados de cada poço da placa de cultura.	31
Figura 13 - Correlação entre os logaritmos das médias das concentrações de drogas antimaláricas convencionais que induziram metade (EC50%) da atividade máxima <i>in vitro</i> contra isolados de <i>P. falciparum</i> sensíveis e resistentes à cloroquina, determinada por microscopia 48 horas e ELISA-HRP2 ( $r = 0,984$ ; $p < 0,0001$ ). [n = 35, sendo 5 isolados e 7 drogas].	39
Figura 14 - Correlação entre os logaritmos das médias das concentrações de tigeciclina e de drogas antimaláricas convencionais que induziram metade (EC50%) da atividade máxima <i>in vitro</i> contra isolados de <i>P. falciparum</i> sensíveis e resistentes à cloroquina.	46

**Lista de Abreviaturas e/ou Siglas**

$\mu\text{g/ml}$	Microgramas por mililitros
AcMo	Anticorpo monoclonal
ACT	artemisinin-based combination therapies
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
$\text{CO}_2$	Dióxido de carbono
Dhfr	Dhydrofolate reductase gene
DNA	Ácido desoxirribonucleico
3D7	Cepa de <i>P. falciparum</i> cloroquina-sensível
DW2	Cepa de <i>P. falciparum</i> cloroquina-resistente
EC50%	Concentração do fármaco necessária para causar 50% da resposta máxima
EC99%	Concentração do fármaco necessária para causar 90% da resposta máxima
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent
FACS	Fluorescence activated cell sorting
GFP	Proteína de Fluorescencia verde
HRP2	Proteína 2 Rica em Histidina
HUJM	Hospital Universitário Júlio Müller
IC95%	Intervalo de confiança de 95%
MS	Ministério da Saúde
MT	Mato Grosso
nM	Nano molar
$\text{N}_2$	Nitrogênio
OMS	Organização Mundial da Saúde

O <sub>2</sub>	Oxigênio
P.M.	Peso molecular
PBS	Phosphate buffered saline
Pfcr1	<i>Plasmodium falciparum</i> Chloroquine Resistance Transporter
Pf-LDH	<i>Plasmodium falciparum</i> Lactate Dehydrogenase
pLDH	Lactado desidrogenase Parasito
PNCM	Programa Nacional de Controle à Malária
RNA	Ácido ribonucleico
r <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
RPMI 1640	Mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular
WHO	World Health Organization

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia *in vitro* das drogas utilizadas para o tratamento do *P. falciparum* no Brasil e do antibiótico tigeciclina, com vistas a sugerir esse antibiótico injetável como alternativa para o tratamento da malária grave em nosso meio. Pela análise da produção da proteína 2 rica em histidina (HRP2) do *P. falciparum* em ELISA, foi possível definir a suscetibilidade *in vitro* de três isolados clínicos regionais de *P. falciparum* e das cepas de referência DW2 (cloroquina-resistente) e 3D7 (cloroquina-sensível) dessa espécie de parasito. A eficácia *in vitro* de cada droga foi avaliada pela determinação de sua EC50%, que foi comparada aos pontos de corte previamente padronizados. Além disso, foi feita análise de correção entre as EC50% calculadas para cada droga, com vistas a avaliar o potencial de resistência cruzada entre elas. A cloroquina foi o único antimalárico que não apresentou eficácia *in vitro* para todos os isolados de *P. falciparum* avaliados. Dois isolados clínicos regionais apresentaram suscetibilidade *in vitro* à cloroquina, sugerindo resgate da eficácia dessa droga contra essa espécie de parasito. A quinina, a mefloquina, a lumefantrina, a artemisinina e o artesunato foram eficazes contra todos os isolados clínicos regionais e de referência do *P. falciparum* avaliados. O antibiótico tigeciclina também se mostrou eficaz contra isolados clínicos regionais e de referência do *P. falciparum* em avaliação *in vitro*. A lumefantrina apresentou potencial de desenvolver resistência cruzada com a artemisinina. Os resultados do estudo mostraram que as drogas componentes dos esquemas convencionais de antimaláricos preconizados no Brasil para tratamento do *P. falciparum* apresentam boa atividade antimalárica *in vitro*. A tigeciclina, por ser droga exclusivamente injetável, pode representar alternativa para o tratamento da malária grave causada por essa espécie de parasito. Preocupa, no entanto, a observação de potencial resistência cruzada entre a lumefantrina e artemisinina, uma vez que são drogas componentes do esquema de primeira linha para o tratamento da malária causada pelo *P. falciparum* no Brasil.

### Palavras-Chave:

Malária, *Plasmodium falciparum*, Tratamento, Resistência, Suscetibilidade *in vitro*.

## ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the *in vitro* efficacy of drugs used for the treatment of *P. falciparum* in Brazil and of the antibiotic tigecycline, in order to suggest this as an alternative for the treatment of severe and complicated malaria. ELISA quantification of histidine-rich protein 2 of *P. falciparum* in culture with and without the presence of drugs were performed to determine the *in vitro* susceptibility of clinical isolates and reference parasite strains (DW2 - chloroquine-resistant and 3D7 - chloroquine-sensitive) for each drug tested. The *in vitro* efficacy of each drug was evaluated by determining its EC50% which was compared to previously standardized *cut-offs*. Furthermore, analysis of correlation was made between the EC50% calculated for each drug, in order to evaluate the potential for cross-resistance between them. Chloroquine did not show *in vitro* activity for all isolates of *P. falciparum* evaluated. However, two regional clinical isolates showed evidence of *in vitro* susceptibility to *P. falciparum*, suggesting rescue of the efficacy of chloroquine against this parasite species. The quinine, mefloquine, lumefantrine, artemisinin and artesunate showed satisfactory antimalarial *in vitro* activity against clinical and reference strains of *P. falciparum*. Tigecycline was shown to be effective against all *P. falciparum* isolates. Lumefantrine has potential to develop cross-resistance to artemisinin. Our findings showed that the drug components of conventional antimalarial regimens recommended in Brazil for the treatment of *P. falciparum* exhibit good *in vitro* antimalarial activity. Since tigecycline is an exclusively injectable drug, it may represent an alternative for the treatment of severe and complicated *P. falciparum* malaria. Is of concern, however, the observation of potential cross-resistance between artemisinin and lumefantrine, since these drugs are components of the first-line schedule for the treatment of *P. falciparum* in Brazil.

Key-words:

Malaria, *Plasmodium falciparum*, Treatment, Resistance, *In vitro* susceptibility.

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1- ASPECTOS GERAIS DA DOENÇA

A malária é uma doença infecciosa causada por um protozoário do gênero *Plasmodium* e transmitida pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles*. Quatro espécies de *Plasmodium* são infectantes para o homem: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 216 milhões de pessoas se infectam anualmente pelo parasito, resultando em cerca de 650.000 mortes no ano (WHO, 2012).

No Brasil, a doença atingiu 263.323 pessoas no ano de 2011, sendo 98% deles residentes na chamada Amazônia Legal, formada pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Maranhão, Mato Grosso e Tocantins. (Ministério da Saúde, 2012).

No Estado de Mato Grosso, a transmissão da malária vem apresentando redução progressiva desde o ano de 1992, provavelmente como resultado da suspensão das atividades garimpeiras da região Norte do Estado, muito intensas nas décadas de 1970 e 1980 (Duarte & Fontes, 2002). No ano de 2010, 2165 casos foram notificados em Mato Grosso pelo Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM), os quais ocorreram predominantemente no município de Colniza, localizado no extremo noroeste do Estado (Ministério da Saúde, 2011).

## 1.2- ASPECTOS GERAIS SOBRE A MALÁRIA

A infecção por *Plasmodium* se inicia quando a fêmea do mosquito vetor inocula, no homem, as formas infectantes, chamadas esporozoítos, presentes em sua

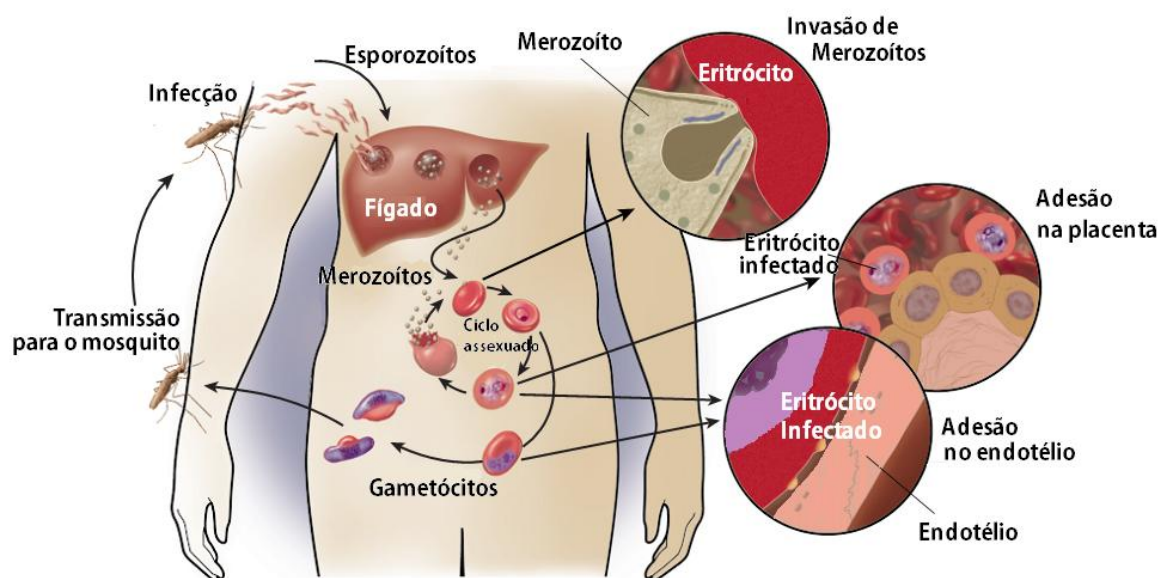
glândula salivar. O número de esporozoítos que são depositados sob a pele do hospedeiro varia, mas há uma estimativa aproximada de 15 a 200 esporozoítos (Vanderbeg, 1977). A partir da derme, os esporozoítos alcançam um vaso sanguíneo e migram para o fígado, onde atravessam a camada celular sinusoidal que separa o sangue e o parênquima hepático, resultando em infecção dos hepatócitos (Mota & Rodrigues, 2004).

Os esporozoítos intracelulares se diferenciam e, por esquizogonia, geram novas formas invasivas e móveis do parasito, os merozoítos teciduais, que irão posteriormente invadir os eritrócitos. Para alcançar os eritrócitos, os merozoítos devem atingir o lúmen sinusoidal hepático, através dos espaços de Disse (Sturm et.al, 2006). Após a invasão do eritrócito, o merozoíto se diferencia em trofozoíto amebóide uninuclear, que começa a ingerir o citoplasma da célula hospedeira, e da ingestão da hemoglobina forma-se a hemozoína (pigmento malárico). O trofozoíto cresce em tamanho e aumenta o seu núcleo, transformando-se em esquizonte, que origina a formação de um número substancial de novos merozoítos. Esses irão invadir outros eritrócitos, repetindo o ciclo esquizogônico assexuado ou então se diferenciando em estágios sexuais, os gametócitos, que irão infectar a fêmea do mosquito vetor, por ocasião de um novo repasto sanguíneo (Figura 1).

### **1.3- MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E TRATAMENTO DA MALÁRIA**

O período de incubação da malária varia de acordo com a espécie de plasmódio, sendo de 9 a 14 dias para *P. falciparum*, 12 a 17 dias para *P. vivax* e 18 a 40 dias para *P. malariae*. Esse período é influenciado pela imunidade, por uso de

quimioprofilaxia ou por uso prévio de droga com sabida ação antimalárica. O ataque paroxístico agudo, coincidente com a ruptura das hemácias ao final da esquizogonia sanguínea, é geralmente acompanhado de calafrio, sudorese, palidez e cianose labial. Após um período de 2 a 6 horas, ocorre defervescência da febre e o paciente apresenta sudorese profusa e fraqueza. Esse ataque paroxístico clássico é mais comum na malária causada pelo *P. vivax* e *P. ovale*, do que pelo *P. falciparum* e *P. malariae*. Após a fase inicial, a febre assume um caráter intermitente relacionado ao tempo de ruptura de uma quantidade suficiente de hemácias contendo esquizontes maduros. A periodicidade dos sintomas está na dependência do tempo de duração dos ciclos eritrocíticos de cada espécie de plasmódio: 48 horas para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* e 72 horas para *P. malariae* ( Parasitologia Rey, 4ª ed., 2008).



Fonte: Miller et al. (2002)

Figura 1 - Representação esquemática do ciclo biológico do *Plasmodium* sp.

Adultos que já ainda não possuem imunidade contra a malária, bem como crianças e gestantes quando infectados pelo *P. falciparum*, podem apresentar manifestações mais graves da infecção, que pode ser letal em cerca de 1% dos casos. Infecções por *P. vivax* têm sido cada vez mais relatadas como causadora de morte, evoluindo com as mesmas complicações observadas para o *P. falciparum*. O aparecimento de convulsões, anemia intensa, dispneia, vômitos repetidos, hipotensão arterial, oligúria, icterícia e distúrbio da consciência constituem os sinais clínicos de alerta para a gravidade, que surge em consequência de uma ou mais das seguintes complicações da malária: insuficiência renal aguda, edema agudo de pulmão, insuficiência hepática, insuficiência cerebral, coagulação intravascular disseminada ou insuficiência circulatória (WHO, 2010b).

O tratamento da malária tem como objetivo: i) interromper a esquizogonia sanguínea, responsável pelas manifestações clínicas da infecção; ii) destruir as formas latentes (hipnozoítos) do parasito, quando a espécie causadora é o *P. vivax* ou o *P. ovale*; iii) interromper a transmissão da doença, pelo uso de gametocitocidas. Para atingir esses objetivos, diversas drogas são utilizadas, cada uma delas agindo de forma específica, tentando impedir o desenvolvimento do parasito no hospedeiro (WHO, 2010b).

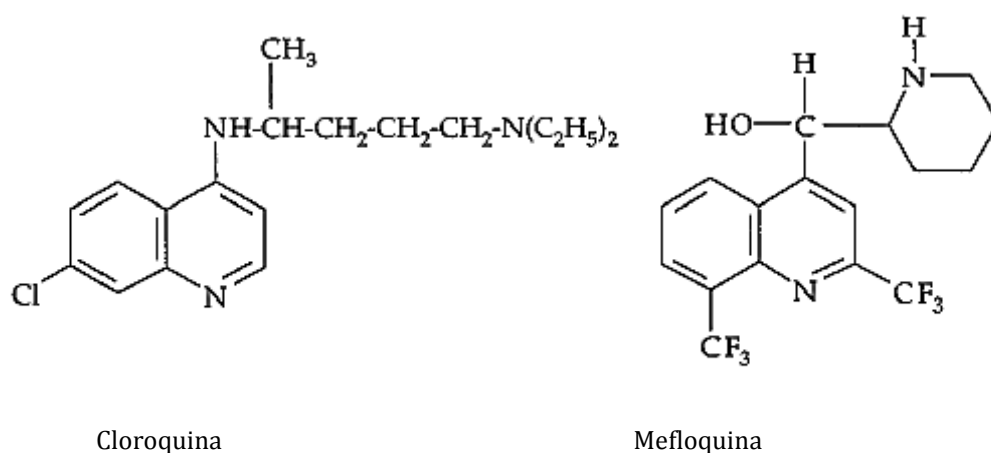
O Programa Nacional de Controle da Malária estabelece a política de tratamento da infecção no Brasil, recomendando os esquemas de antimaláricos a serem utilizados pelos serviços de saúde. Seguindo orientação da OMS, o tratamento do *P. falciparum* é feito com esquemas de combinação de drogas, incluindo um derivado da artemisinina (ACT). São preconizados, como esquemas de primeira linha, o artemeter associado à lumefantrina ou o artesunato associado à mefloquina. E, como esquema de segunda linha, a quinina associada à doxiciclina (WHO, 2010b).

### 1.3.1- Drogas recomendadas para o tratamento da malária no Brasil.

Os fármacos hoje disponíveis para o tratamento da malária no Brasil são classificados de acordo com seu grupo químico em arilaminoálcoois (quinina, mefloquina, halofantrina e lumefantrina), 4-aminoquinolinas (cloroquina e amodiaquina), 8-aminoquinolinas (primaquina), peróxido de lactona sesquiterpênica (derivados de artemisinina), naftoquinonas (atovaquona), biguanidas (proguanil) e antibióticos (tetraciclina, doxiciclina, clindamicina). Essas drogas agem por diferentes mecanismos, muitos deles ainda não completamente esclarecidos. São destacadas a inibição do metabolismo heme e sua ligação à ferriprotoporfirina IX, inibindo a sua polimerização; a inibição do transporte de elétrons, interrompendo o metabolismo das mitocôndrias e inibição da tradução, ou seja, da síntese de proteínas (Golan, 2009).

Após a II Guerra Mundial, a cloroquina (Figura 2), originalmente sintetizada na Alemanha em 1930, foi a principal droga recomendada para o tratamento e para a profilaxia de todas as espécies de *Plasmodium* até os anos 80, quando surgiu a resistência do *P. falciparum*, e hoje disseminada por várias partes do mundo, inclusive no Brasil (Wellems & Plowe, 2001). Por ser uma base fraca, acumula-se no vacúolo digestivo ácido, na fase intra-eritrocítica do parasito, aumentando seu pH (Yayon *et al.*, 1985). Ao acumular-se ela se liga à ferriprotoporfirina IX e inibe a sua metabolização, que normalmente é realizada pela heme-polimerase. A ferriprotoporfirina não polimerizada leva à lesão oxidativa da membrana, sendo tóxica para o parasito (Fitch, 1998).

Estudos sobre a eficácia da cloroquina foram realizados em 30 países, entre 2000 e 2009, e mostraram falha de tratamento em proporções extremamente altas (19,8 a 100%) em todos os países, exceto Honduras, Malawi e Nicarágua (0-1,3%). Segundo a OMS, a droga permanece eficaz somente na América Central, onde estudos clínicos confirmam 100% de sua eficácia em Honduras e Nicarágua (WHO, 2010a).

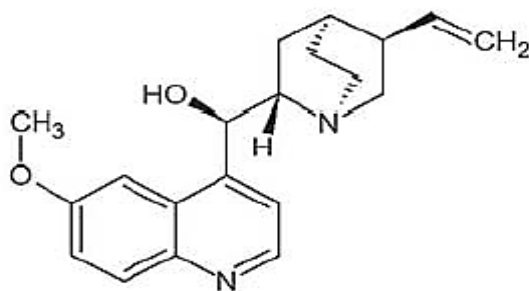


Fonte: Basco *et al.*, 1998.

Figura 2: Estrutura molecular da cloroquina e da mefloquina

A mefloquina (Figura 2) é um esquizotocida sanguíneo de ação prolongada, com ação parasitária associada à inibição da enzima hemepolimerase. Foi desenvolvida como alternativa para o tratamento da malária, quando do surgimento de cepas de *P. falciparum* cloroquino-resistentes. Alguns estudos sugerem que a mefloquina inibe a endocitose da hemoglobina para o vacúolo, causando assim a morte do parasito (Hoppe *et al.*, 2004). Relatos de resistência do *P. falciparum* à mefloquina no Brasil têm sido publicados logo após o início de seu uso no país, seja em avaliação *in vitro* (Cerutti *et al.*, 1999; Calvosa *et al.*, 2001) ou *in vivo* (Alecrim *et al.*, 1999; Noronha *et al.*, 2000).

A quinina (Figura 3) é um alcalóide natural extraído da casca da Cinchona, planta originária da América do Sul. Assim como a cloroquina, seu mecanismo de ação está associado à inibição da enzima hemepolimerase do parasito e à capacidade de se ligar ao DNA do parasito, com conseqüente separação das suas fitas, pelo rompimento das pontes de hidrogênio e impedimento da transcrição e tradução desse DNA (Tilley *et al.*, 1998). A resistência do *P. falciparum* a quinina foi originalmente descrita no Brasil no início do século XX (Neiva, 1910). No entanto, somente no final do mesmo século é que o fenômeno da resistência *in vivo* a essa droga volta a ser reportado no Brasil (Boulos *et al.*, 1986), na Ásia (Björkman & Phillips-Howard, 1990) e em Senegal (Pradines *et al.*, 2010).

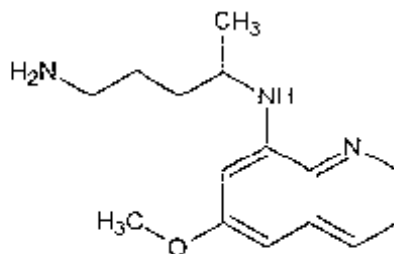


Fonte: Sá, 2011.

Figura 3: Estrutura molecular da quinina

Também durante a segunda guerra mundial, a primaquina (Figura 4), principal representante do grupo das 8-aminoquinolinas, tornou-se disponível para o tratamento da malária (Peters *et al.*, 1984). Tem efeito hipnozoiticida, atuando também contra os estágios assexuados sanguíneos, embora somente em doses elevadas. Por ser gametocitocida é indicada no tratamento das infecções por *P.*

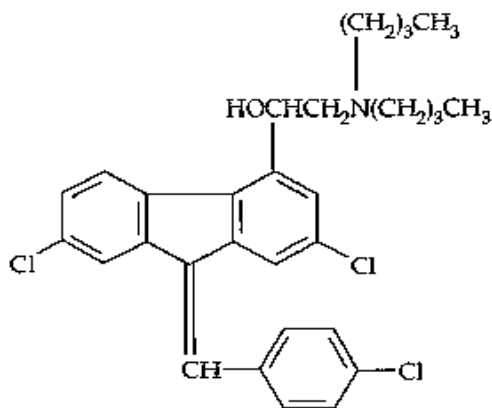
*falciparum*, objetivando o bloqueio da transmissão do parasito ao vetor (Baird *et al.*, 2004).



Fonte: Sá, 2011.

Figura 4: Estrutura molecular da primaquina.

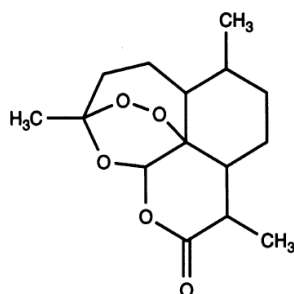
A lumefantrina (Figura 5), sintetizada em 1970 na Academia Militar de Ciências Médica de Beijing, China, tem atividade esquizonticida sanguínea contra todos as espécies de *Plasmodium*. Combinada com o  $\beta$ -artemether, um derivado sintético da artemisinina, resulta em efeito antimalárico sinérgico e representa hoje a principal combinação ACT para tratamento do *P. falciparum* em nosso meio (Hassan *et al.*, 1999). Vários estudos mostram que a lumefantrina e o artemeter combinados ainda podem ser utilizados como droga de primeira linha no tratamento da malária , pois não houve diminuição da suscetibilidade nestas análises (Kinfu *et al.*, 2012; Mayxay *et al.*, 2012).



Fonte: Basco *et al.*, 1998.

Figura 5: Estrutura molecular da lumefantrina.

A artemisinina (Figura 6) e seus derivados artemeter e artesunato são uma lactona sesquiterpênica extraída da planta *Artemisia annua L.*, usada pelos chineses há mais de 2000 anos. Possui em sua estrutura química um grupo peróxido como ponte de ligação. Apresentam ação antimalárica muito rápida, tanto para matar os parasitos como para inibir o seu principal processo metabólico (ter Kuile *et al.*, 1993). Estudos clínicos sugeriram alterações na susceptibilidade do *P. falciparum* à classe das artemisininas. Em Dezembro de 2008, Noedl e colaboradores apresentaram evidência de *P. falciparum* genuinamente resistente às artemisininas (Noedl *et al.*, 2008).



Fonte: Olliaro & Trigg, 1995.

Figura 6: Estrutura molecular da artemisinina.

As tetraciclina são antimicrobianos de amplo espectro e com ação potente, porém lenta, contra as fases sanguíneas assexuadas dos plasmódios. As combinações de quinina com tetraciclina e, mais recentemente, com a doxiciclina, administrada durante 5-7 dias, ainda são altamente eficazes para tratamento desta espécie no Brasil, onde já existe resistência a múltiplos medicamentos. O único inconveniente dessas associações é o tempo prolongado de tratamento, dificultando a adesão (Ministério da Saúde, 2001). A tigeciclina, o único membro do grupo das glicilciclina, uma classe de antibióticos derivada da tetraciclina, tem conhecida atividade antimicrobiana através inibição da tradução proteica, ligando-se à subunidade ribossômica 30S e bloqueando a entrada de moléculas aminoacil-tRNA no sítio A do ribossomo. Consegue atuar nos dois principais mecanismos de resistência às tetraciclina, isto é, a proteção ribossomal e o efluxo (Olson *et al.*, 2006). Uma das propriedades a mais da tigeciclina é bem tolerada e tem uma meia-vida relativamente longa de 37 a 67 horas (Muralidharan *et al.*, 2005), mais que a tetraciclina (6 a 10 horas) e a doxiciclina (12 a 25 horas) (Agwuh *et al.*, 2006). Starzengruber *et al.* (2009) avaliaram a atividade antimalárica *in vitro* da tigeciclina contra o *P. falciparum* e concluíram que ela é uma candidata a ser melhor explorada quanto à sua eficácia clínica. Por ser antibiótico de uso exclusivamente injetável, a sua indicação no tratamento da malária será reservada a pacientes graves e sempre em combinação com antimaláricos de ação rápida, haja vista a sua moderada e lenta ação esquizonticida sanguínea do *P. falciparum* (Held *et al.*, 2010a).

#### **1.4- RESISTÊNCIA *IN VITRO* DO *P. falciparum* AOS ANTIMALÁRICOS**

Em 1967, a OMS definiu “resistência” como a capacidade de uma cepa parasitária de sobreviver ou multiplicar, apesar da administração e absorção de uma droga administrada em doses iguais ou maiores que aquelas normalmente recomendadas. Esta definição foi posteriormente modificada para incluir a frase: “A droga deve ser capaz de obter acesso ao parasito ou ao eritrócito infectado, com duração de tempo necessário para sua ação normal” (WHO, 2010a). Há vários fatores que influenciam o surgimento e disseminação de parasitos resistentes às drogas, a saber: i) a frequência intrínseca com que as alterações genéticas ocorrem; ii) o grau de resistência atribuída pela mudança genética; iii) a porcentagem de todos os agentes infecciosos transmissíveis expostos ao fármaco (pressão seletiva); iv) o número de parasitos expostos à droga; v) a concentração da droga à qual o parasito é exposto; vi) a farmacocinética e a farmacodinâmica do antimalárico (dosagem, duração, aderência); vii) a qualidade, disponibilidade e distribuição droga usada; viii) o perfil da imunidade da população e do indivíduo; ix) a presença simultânea de outros fármacos ou substâncias no sangue ao qual o parasito não é resistente; x) a intensidade da transmissão (White *et al.*, 2003). Como consequência de um ou vários desses fatores, surge à resistência do parasito à droga, que pode ser constatada por marcadores moleculares, em avaliação *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

Como exemplos de marcadores moleculares de resistência, já foram identificadas mutações em vários genes do *P. falciparum*, tais como o gene *pfmdr 1* (resistência à cloroquina) (Peel, 2001; Von Seidlein *et al.* 1997, Duraisingh *et al.*, 2000) o gene *pfcr1* (resistência à cloroquina), (Fidock *et al.*, 2000) o gene *dhfr*

(resistência a pirimetamina) (Basco *et al.*, 1995) e no gene *dhps*, que conferem resistência à sulfadoxina (Triglia *et al.*, 1997; Triglia *et al.*, 1998).

Desde o surgimento da resistência do *P. falciparum* à cloroquina na década de 60 e sua subsequente disseminação para diversas áreas endêmicas do mundo, várias estratégias têm sido propostas para monitorar a eficácia das drogas antimaláricas e para monitorar o desenvolvimento da resistência do *P. falciparum* ao tratamento. Esse monitoramento justifica-se e é relevante, pois proporciona informação precoce do surgimento da resistência e, conseqüentemente, orienta as autoridades de saúde para a adequação da política de controle da doença (Basco, 2007).

Estudos clínicos, com avaliação *in vivo* da resposta ao tratamento antimalárico representam a melhor forma de se fazer esse monitoramento. Porém, na prática, tais estudos são difíceis de serem conduzidos, haja vista o seu custo, duração e dificuldades operacionais. Além disso, a análise da resposta terapêutica no paciente infectado é complexa, uma vez que vários fatores contribuem simultaneamente para o desfecho do tratamento, tais como a interação com outra droga associada, a resposta imune do paciente e a farmacocinética da droga sob análise (WHO, 2003; Page *et al.*, 1999).

Os desafios associados com o estudo da resistência dos parasitos aos antimaláricos são significativos e, se não forem enfrentados, eles continuarão a impedir a frequência e a qualidade do monitoramento da eficácia do tratamento da malária na área endêmica. Assim, o acompanhamento regular da eficácia terapêutica deve ser considerado uma prioridade nos países endêmicos (WHO, 2010a). Um aumento no nível da EC50% de uma droga é considerado indicador importante para a identificação da tendência da suscetibilidade através do tempo e para a comparação da situação entre regiões. Por outro lado, a constatação de correlação positiva entre

os valores de EC50% de duas drogas tem sido considerada indicador de potencial resistência cruzada entre elas (Ringwald *et al.*, 1998). Por essa razão, metodologias padronizadas de avaliação devem ser aplicadas periodicamente, como recurso de vigilância sentinela do desenvolvimento da resistência do *Plasmodium* às drogas (Wongsrichanalai *et al.*, 2002).

## **1.5 - TESTES PARA AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* DO *P. falciparum* AOS ANTIMALÁRICOS**

Existem três abordagens essenciais para a avaliação da suscetibilidade do parasito ao tratamento antimalárico: ensaios *in vivo*, ensaios *in vitro* e ensaios *ex vivo*. Embora os testes *in vitro* ofereçam vantagens inquestionáveis, os ensaios *in vivo* são indispensáveis, uma vez que permitem a avaliação da resposta clínica, juntamente com a resposta biológica do parasito à presença da droga. Assim sendo, a avaliação conjunta da resistência, por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* em paralelo, seria a ideal (Noedl *et al.*, 2003).

Existem vários testes *in vitro* padronizados atualmente para avaliar a suscetibilidade do *P. falciparum* aos antimaláricos. Eles podem ser agrupados de acordo com a técnica empregada para quantificar o crescimento do parasito em relação à concentração da droga: i) Contagem dos estágios do parasito por microscopia; ii) Incorporação de radioisótopos em precursores metabólicos do parasito; iii) Detecção de antígenos produzidos pelo parasito em cultura por anticorpos específicos; iv) Contagem automatizada de células infectadas.

### **1.5.1- Contagem dos estágios do parasito por microscopia**

Uma das primeiras tentativas de avaliar a suscetibilidade *in vitro* do *P. falciparum* às drogas foi feita por Nguyen-Dinh & Trager (1978), no chamado “teste 48 horas”, também conhecido como “teste de re-invasão *in vitro* em 48 horas”, no qual uma cepa do parasito adaptada em cultura é exposta, em placas de Petri, a varias concentrações de droga e mantidas em dessecador com chama de vela por 48 horas. Após 24 horas de incubação o meio de cultura é renovado. A análise da suscetibilidade é feita pela comparação do crescimento do parasito nas culturas com e sem drogas (Rieckmann & Lopes-Antuñano, 1971). Com o passar dos anos, surgiram variantes desse método, tal como o “teste 48 horas-Modificado”, no qual não se renova o meio após 24 horas de incubação (Nguyen-Dinh & Trager, 1980). Assim, Rieckmann *et al.* (1978) inseriram nova modificação, passando a cultura a ser realizada em placas de 96 poços. Esse novo método ganhou aceitação, por ser mais simples de realização, utilizar menor volume dos reagentes e da cultura e, conseqüentemente, menor custo. Apresenta a única desvantagem de ser mais laborioso, pela confecção dos esfregaços a partir dos pequenos poços da placa, para a análise final de seus resultados (Rieckmann *et al.*, 1978).

### **1.5.2 - Incorporação de radioisótopos em precursores metabólicos do parasito**

Desjardins *et al.* (1979) aperfeiçoaram o microteste de Rieckmann, tornando desnecessário o uso do microscópio. Obtiveram resultados rápidos e de alta

sensibilidade com um método semi-automatizado que se baseia na inibição da incorporação da hipoxantina tritiada pelo parasito, em consequência ao efeito da droga. (Desjardins *et al.*, 1979). A inibição do desenvolvimento do parasito em contato com a droga é atestada pela contagem de radiação gama, em contador apropriado de radioatividade. Por envolver radioisótopo, requer alta densidade parasitária e a disponibilidade de equipamentos específicos, impossibilitando o seu uso em campo e em locais onde a infraestrutura laboratorial é precária (Noedl *et al.*, 2003).

### **1.5.3- Detecção de antígenos produzidos pelo parasito em cultura**

Durante mais de 20 anos, os testes tradicionais de microscopia 48 horas (Rieckmann *et al.*, 1978) e o ensaio isotópico de incorporação da hipoxantina (Desjardins *et al.*, 1979) foram utilizados como referência para a avaliação da suscetibilidade *in vitro* do *P. falciparum* às drogas (Noedl *et al.*, 2003). Suas citadas limitações motivaram a implementação, na última década, dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Este método tem a vantagem de fornecer medidas sensíveis do crescimento parasitário (Desakorn V *et al.*, 1997), uma vez que possibilitam a quantificação da produção de biomoléculas produzidas durante o desenvolvimento do parasito *in vitro* (Noedl *et al.*, 2002a; Martin *et al.*, 2009).

A proteína 2 rica em histidina (HRP2) do *P. falciparum* é secretada dentro das hemácias e dos compartimentos extracelulares onde o desenvolvimento do parasito se processa, isto é, no plasma ou meio de cultura (Rock *et al.*, 1987). Acredita-se que essa proteína seja secretada mais ativamente entre os estágios de anel e trofozoítos

(Desakorn V *et al.*, 2005). Sua quantificação pode ser feita pelo ELISA-HRP2, que permite avaliar a inibição do crescimento do parasito na presença de droga antimalárica e, conseqüente, sua eficácia. O método baseia-se na captura da HRP2 por anticorpos monoclonais específicos (Noedl *et al.*, 2005) e é considerado muito sensível, rápido, altamente reprodutível e de fácil realização (Noedl H *et al.*, 2002b).

A atividade enzimática da desidrogenase láctica do *Plasmodium* sp (pLDH) reflete a atividade metabólica geral dos parasitos viáveis (Basco, 2007). Assim, o aumento do nível de pLDH no plasma ou no meio de cultura é uma função do número de parasitos sobreviventes naquele ambiente. Quanto mais expostos a concentrações cada vez maiores de droga antimalárica, maior será o número de parasitos mortos e, conseqüentemente, a quantidade de pLDH diminui (Basco, 2007). Desta forma, a quantificação do nível de pLDH em ELISA passou também a ser utilizada na avaliação da sensibilidade do *P. falciparum* às drogas antimaláricas. O método é baseado na captura da Pf-LDH, usando dois anticorpos monoclonais que reconhecem dois diferentes sítios da enzima (Druilhe *et al.*, 2001). Pela sua praticidade e possibilidade de realização em campo, o ELISA-HRP2 e o ELISA-pLDH têm sido recomendados pela OMS para a monitorização do desenvolvimento da resistência do *P. falciparum* às drogas, em substituição ao ensaio microscópico (Basco, 2007).

Durante o crescimento do *P. falciparum*, níveis cada vez maiores de pigmento malárico (hemozoína) são produzidos e estão presente no sobrenadante da cultura. A quantificação dessa substância por técnica colorimétrica foi recentemente padronizada como método de avaliação da suscetibilidade do *P. falciparum* aos antimaláricos (Men *et al.*, 2012). Contudo, sua utilização como modelo de avaliação da suscetibilidade *in vitro* do parasito às drogas ainda não está difundido.

#### 1.5.4. Contagem automatizada de células infectadas

Com o avanço da tecnologia da citometria de fluxo, tornou-se possível detectar e contar hemácias infectadas por *Plasmodium* sp por meio de anticorpos monoclonais, desde que marcadas com uma substância que se liga ao DNA e é fluorescente. Com esse método é possível diferenciar os estágios de desenvolvimento assexuado do parasito, ou seja, a intensidade de fluorescência aumenta em proporção direta quando os trofozoítos se desenvolvem em esquizontes. O teste é rápido, preciso, altamente sensível, automatizado e não-radioativo. No entanto, requer um técnico altamente especializado para a manutenção e operação do equipamento, sendo muito sofisticado para a aplicação de rotina no campo. Além disso, o equipamento não está adaptado para ser instalado num clima tropical, a menos que o laboratório seja bem equipado com ar condicionado, o que não é a realidade dos países endêmicos (Basco, 2007).

Recentemente, um isolado transgênico do *P. falciparum* foi desenvolvido com a capacidade de expressar uma proteína recombinante marcada com fluoresceína verde (GFP) em todos os estágios do parasito. Por meio da citometria de fluxo, esses estágios marcados do parasito podem ser quantificados a partir de amostras de pacientes (ensaio *ex vivo*) ou cultura (ensaio *in vitro*), após contato com diferentes concentrações de drogas antimaláricas (Sanchez *et al.*, 2004).

A contagem de células infectadas pode ser feita também pelo ensaio fluorométrico com contador de células ativadas por fluorescência – FACS (*fluorescence activated cell sorting*). Nesse caso, o DNA é marcado por substâncias fluorocrômicas, tal como o brometo de etídio ou SYBR-Green<sup>®</sup> I. Assim como a citometria

de fluxo, esse método requer equipamentos caros e profissionais altamente qualificados para a sua realização (Basco, 2007).

Evidências obtidas com os Programas de Controle a Malária ao redor do mundo têm mostrado que testes *in vitro* de suscetibilidade do parasito a drogas antimaláricas não podem substituir as observações *in vivo* na terapia da malária. No entanto, os testes *in vitro* representam ferramenta útil para fornecer informação de linha de base e monitoramento do desenvolvimento da resistência do parasito às drogas. Juntamente com avaliações periódicas *in vivo*, os testes *in vitro* têm sido importantes para orientar a política de controle da malária em muitos países endêmicos (WHO, 2001).

Considerando a escassa informação disponível sobre a situação da eficácia das drogas antimaláricas preconizadas pelo PNCM no Brasil, assim como a necessidade de se registrar a linha de base do perfil de suscetibilidade *in vitro* do *P. falciparum* a essas drogas, delineou-se o presente estudo que teve como objetivo avaliar a suscetibilidade de isolados regionais de *P. falciparum* aos fármacos utilizados em esquemas convencionais de tratamento da malária em nosso meio. Como objetivo secundário, procurou-se também avaliar a atividade antimalárica *in vitro* da tigeciclina contra esses mesmos isolados, com vistas a incluir esse novo antibiótico no arsenal terapêutico da malária grave causada pelo *P. falciparum*.

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1. Objetivo geral

Implantar metodologia de estudo da suscetibilidade *in vitro* do *P. falciparum* aos antimaláricos e avaliar a eficácia *in vitro* das drogas utilizadas em esquemas convencionais e do antibiótico tigeclina contra isolados clínicos regionais e de referência dessa espécie de *Plasmodium*.

## 2.2. Objetivos específicos

- Implantar a cultura *in vitro* do *P. falciparum* no Laboratório de Malária do Hospital Universitário Júlio Müller.
- Adaptar isolados clínicos de *P. falciparum* da região Amazônica em cultura *in vitro*.
- Implantar as técnicas de microscopia e do ELISA para avaliação da produção da HRP2 em cultura para estudo da suscetibilidade *in vitro* do *P. falciparum* às drogas antimaláricas.
- Avaliar a atividade antimalárica *in vitro* de drogas utilizadas em esquemas convencionais e do antibiótico tigeclina contra isolados clínicos regionais e de referência do *P. falciparum*.
- Avaliar o potencial de resistência cruzada do *P. falciparum* entre as drogas antimaláricas convencionais e entre essas e a tigeclina.

### **3. MATERIAL E MÉTODO**

### 3.1 - LOCAL DE ESTUDO

O estudo foi realizado no Laboratório de Malária do Hospital Universitário Júlio Müller, da Universidade Federal de Mato Grosso, onde funciona o Ambulatório de Referência para Diagnóstico e Tratamento da Malária para a região metropolitana do município de Cuiabá (MT).

### 3.2 - ISOLADOS DE *P. falciparum* AVALIADOS

Todo paciente portador de mono-infecção por *P. falciparum* da demanda do Ambulatório acima referido durante o período de 2010-2012 foi elegível para este estudo. Foram incluídos apenas pacientes com parasitemia superior a 250 parasitos  $\mu\text{l}$  e que não tivessem feito uso de medicamentos com conhecida ação antimalárica, no mínimo, a 30 dias antes. Após entrevista individual e consentimento formal de participação no estudo, uma amostra de 4,5 mL de sangue foi colhida em tubo a vácuo com heparina, por punção venosa cubital. Essa amostra de sangue foi devidamente processada num intervalo menor que 30 minutos após a colheita, para garantir a adaptação do parasito em cultura contínua, conforme detalhamento abaixo.

Isolados de referência do *P. falciparum*, sabidamente as cepas 3D7 (sensível à cloroquina) e DW2 (resistente à cloroquina), já adaptadas em cultura contínua *in vitro* por longo tempo, foram cedidas gentilmente pela equipe de pesquisadores do Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ-MG). Esses isolados foram constantemente mantidos em cultura contínua, após a implantação da técnica no Laboratório de Malária do Hospital Universitário Júlio Müller.

### **3.3 - PREPARAÇÃO DAS HEMÁCIAS PARASITADAS PARA CULTURA CONTÍNUA DO *P. falciparum***

Após a coleta, centrifugou-se o sangue heparinizado e retiraram-se o plasma e a camada leucocitária. Em seguida, o concentrado de hemácias foi processado conforme descrito por Trager & Jensen (1976). A amostra foi lavada por três vezes consecutivas em meio RPMI 1640 (Sigma® -USA) e suplementada com 25 mM de bicarbonato de sódio, 25 mM de tampão HEPES (Sigma®-USA), 2 mM de L- glutamina (Sigma®-USA), 40 mg de gentamicina (Sigma®-USA), 0,36 mM de hipoxantina (Sigma®-USA), 10 mM de glicose, 10% de plasma humano do grupo sanguíneo A. A solução final do meio de cultura completo foi ajustada para pH 7,2 - 7,4 com bicarbonato de sódio 8,4%, antes do procedimento de lavagem das hemácias.

### **3.4 - Cultura contínua do *P. falciparum***

A cultura dos isolados do *P. falciparum* foi feita de acordo com Trager & Jensen (1976). A suspensão de hemácias parasitadas em meio RPMI completo (adição do plasma) foi inicialmente diluída para hematócrito final de 5% e, em seguida, distribuída em placas de Petri (Corning® -USA) de 100x15 mm (Figura 7). As placas foram colocadas em dessecador de vidro com chama de vela e em um recipiente hermeticamente fechado do tipo Tupperware® (Figuras 8 e 9). Neste último estabeleceu-se uma atmosfera de dióxido de carbono a 5%, oxigênio a 5% e nitrogênio a 90%, a partir de mistura de gás previamente preparada (White Martins Praxair Inc., São Paulo). Em seguida, o dessecador e o recipiente com as placas foram incubados em estufa de BOD regulada a 37°C e monitorada diariamente.

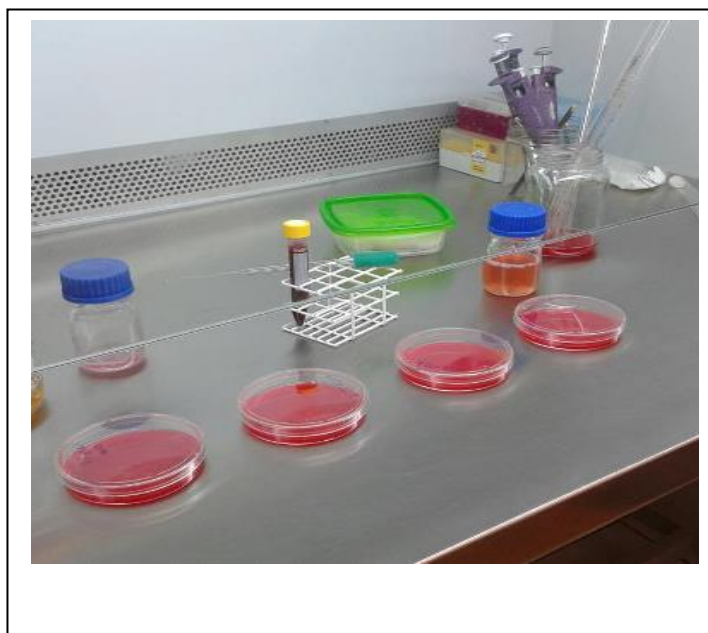


Figura 7 – Amostras de culturas *in vitro* do *P. falciparum* em placas de Petri, em um momento da troca diária do meio de cultura.

(Fonte: A autora)



Figura 8 – Dessecador com chama de vela utilizado para a cultura do *P. falciparum*.

(Fonte: A autora)



Figura 9 – Recipiente hermeticamente fechado, do tipo Tupperware®, adaptado com sistema de válvulas para a introdução da mistura de gás necessária à cultura *in vitro* do *Plasmodium falciparum*.

(Fonte: A autora)

A cada 24 horas, as culturas foram examinadas para avaliação da parasitemia em esfregaços sanguíneos delgados, bem como para a troca do meio de cultura completo. Uma vez detectada parasitemia elevada (>10%), as culturas eram diluídas com hemácias (grupo sanguíneo A) não infectadas, devidamente lavadas em meio RPMI incompleto. Periodicamente, uma alíquota da cultura, com mais de 60% de trofozoítos, foi criopreservada em nitrogênio líquido (temperatura de -173°C), segundo a técnica descrita por Meryman & Hornblower (1972). Para tanto, a amostra de sangue parasitado foi ressuspensa em solução com alta concentração de glicerol (Glycerolyte®, Fenwal Inc-USA), com pH de 6,8.

Os esfregaços delgados foram confeccionados em lâminas de vidro, fixados por álcool metílico e corados com Giemsa. O desenvolvimento do parasito na cultura foi

avaliado pela observação dos diferentes estágios evolutivos do *P. falciparum* e sua contagem em 200 campos microscópicos, tendo cada um cerca de 200 hemácias. A densidade parasitária foi calculada em percentagem de hemácias parasitadas.

### **3.5 - SINCRONIZAÇÃO DA CULTURA DE *P. falciparum* PARA TESTES DE SUSCETIBILIDADE *IN VITRO***

É tradicionalmente recomendado que os testes de suscetibilidade do *P. falciparum* às drogas sejam feitos a partir de cultura que se iniciou com os estágios mais jovens do parasito. Para se obter um predomínio de formas jovens (Figura 10) na cultura foi utilizado o protocolo de sincronização previamente descrito, utilizando D-sorbitol (Sigma®-USA) (Lambros & Vanderberg, 1979). Inicialmente, foram confeccionados esfregaços sanguíneos das placas de cultura para se determinar o estágio de amadurecimento dos parasitos. A cultura selecionada (contendo aproximadamente 1% de anéis) foi centrifugada (112,6 xg por 10 minutos à temperatura ambiente), sendo o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspensionado em solução de D-sorbitol a 5% por 10 minutos. Passado esse tempo, a suspensão de hemácias com o D-sorbitol foi novamente centrifugada e o sobrenadante desprezado. As hemácias foram ressuspensionadas em meio de cultura completo, para hematócrito de 5%. As hemácias em meio completo foram novamente colocadas em cultura, contendo apenas as formas jovens do *P. falciparum*.

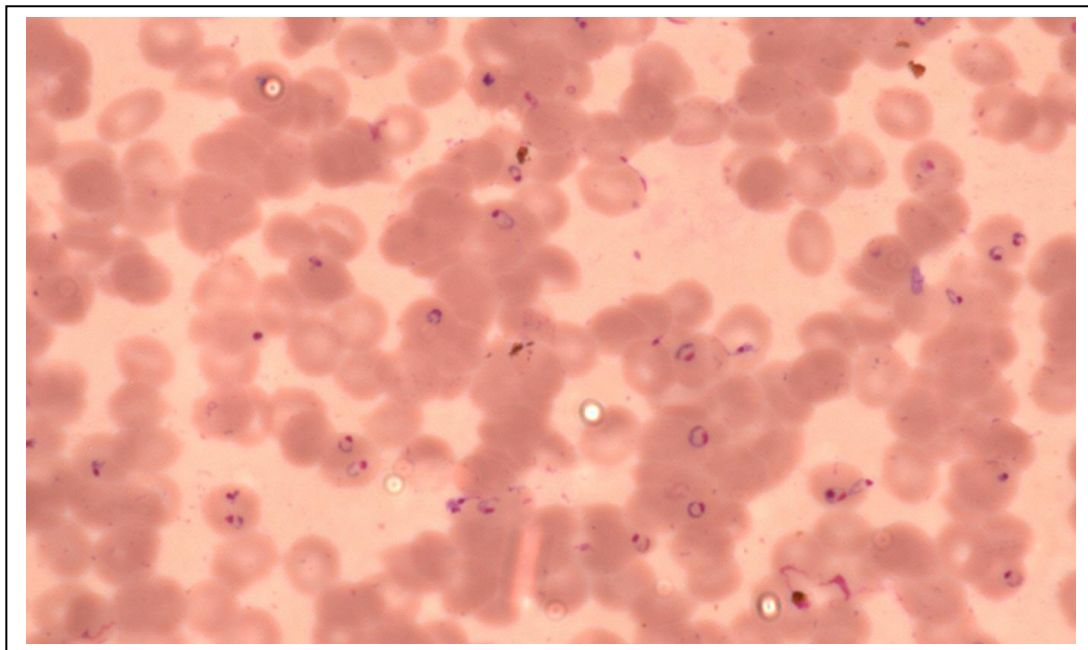


Figura 10- Esfregaço obtido de cultura sincronizada de *Plasmodium falciparum* mostrando hemácias infectadas com predomínio de trofozoítos jovens.

(Fonte: A autora)

### **3.6 - DROGAS TESTADAS PARA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* CONTRA O *P. falciparum***

Foram selecionadas para a análise da atividade antimalárica *in vitro* os seguintes esquizontocidas sanguíneos: cloroquina, mefloquina, quinina, lumefantrina, artemisinina e artesunato. Essa opção foi motivada por serem essas drogas componentes dos esquemas de antimaláricos mais utilizados no mundo e preconizados pelo Programa Nacional de Controle da Malária no Brasil (WHO, 2010b; Ministério da Saúde, 2010). Uma nova droga com potencial antimalárico, análoga das tetraciclina e derivada da minociclina (Greer, 2006) também foi incluída na presente

avaliação, por de uso exclusivamente injetável, podendo ser útil no tratamento de pacientes com malária grave e complicada pelo *P. falciparum*.

### **3.7 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* DAS DROGAS**

As drogas estocadas a -20°C, na concentração de 1mg/mL, foram diluídas com seus respectivos solventes, nas concentrações preconizadas pela OMS (Basco, 2007). A cloroquina (Sigma®, P.M.= 515.9) foi diluída em água, a quinina (Sigma®, P.M.= 360.9) e a mefloquina (Sigma®, P.M.=414.8) em metanol, a lumefantrina (Sigma®, P.M.= 528.95) em uma mistura (1:1:1) de etanol + ácido linoleico + Tween 80 (Hassan *et al.*, 1999), a artemisinina (Sigma®, P.M.= 282,3) e o artesunato (Sigma®, P.M.= 384,4) também em metanol. As concentrações máximas de cloroquina, mefloquina, quinina, lumefantrina, artemisinina e artesunato para a análise de suas atividades antimaláricas foram de 1600nM, 3200nM, 160nM, 80nM, 16nM e 16nM respectivamente. A tigeciclina (Laboratório Wyeth, P.M.= 585.65) foi diluída em PBS pH 7.2, com concentração máxima para o ensaio de 21250nM. As soluções com as concentrações máximas das drogas, em volume de 25 µL cada, foram distribuídas em triplicatas na extremidade inferior da placa. Sete diluições seriadas (1:2) foram feitas verticalmente na placa, usando água bidestilada estéril como solvente. Para todas as drogas foram reservados poços contendo apenas o seu solvente na maior concentração e apenas a água bidestilada, representando, respectivamente, os controles de solvente e sem droga.

### 3.8 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* POR CONTAGEM DE HEMÁCIAS PARASITADA ATRAVÉS DA MICROSCOPIA - TESTE 48 HORAS-MODIFICADO

Em cada poço das placas (Figura 11), anteriormente pré-doseadas com as drogas, foram adicionadas 175  $\mu$ L de solução de hemácias parasitadas a 1% de parasitemia e hematócrito em 1,5%. As placas foram colocadas em ambiente de cultura por 48 horas a 37°C, após o qual foram confeccionados esfregaços sanguíneos delgados de cada poço da placa (Figura 12), para avaliação microscópica do número de hemácias parasitadas. Para análise da atividade antimalárica, os números médios observados em cada triplicata com as diferentes concentrações das drogas foram comparados com os mesmos números observados entre os poços controle (Nguyen-Dinh & Trager , 1980).

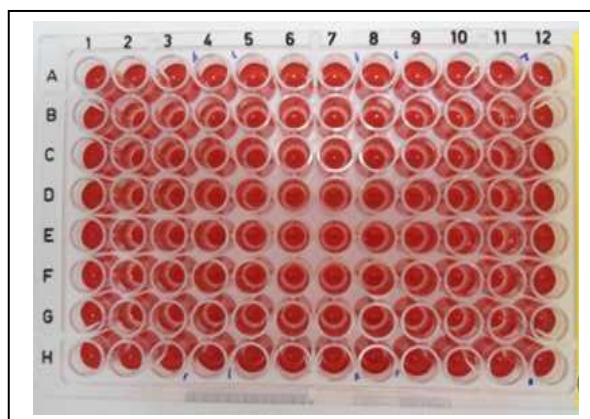


Figura 11 – Placa pré-doseada com as drogas e com hemácias parasitadas. (Fonte: A autora)



Figura 12 – Esfregaços delgados confeccionados de cada poço da placa de cultura.

(Fonte: A autora)

### **3.9 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* PELA ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE HRP2 EM ELISA.**

Seguiu-se rigorosamente as orientações propostas por Noedl *et al.* (2005). Primeiramente a parasitemia da cultura foi ajustada para 0,05% e hematócrito de 1%. Foi retirada uma alíquota de 1 mL dessas hemácias parasitadas, que foi congelada a -20°C, para servir de controle basal da produção de HRP2, a ser deduzida dos resultados observados ao final do teste. Na sequência, 175 µL das hemácias com parasitemia ajustada foram adicionados a cada poço da placa pré-doseada, que foi incubada por 72 horas. Ao término da incubação, essas culturas foram lisadas por congelamento/descongelamento a -20°C por três vezes, num intervalo de 12 horas.

Para a avaliação da produção de HRP2 as placas de 96 poços (Corning®, USA) foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-HRP2 (MPFM-55 A – ICLLAB-USA), diluído a uma concentração de 1,0µg/mL em PBS, pH=7,2. Em cada poço foram adicionados 100 µL da solução contendo Anticorpo Monoclonal anti-HRP2, após que a placa foi incubada durante a noite, a 4°C. No dia seguinte, o sobrenadante foi

descartado por inversão da placa e o anticorpo monoclonal adsorvido foi bloqueado com solução de soro-albumina bovina 2% (Sigma®) em PBS, por 2 horas. Ao final do bloqueio, a placa foi lavada por três vezes com uma solução 0,05% de Tween-20 em PBS e, em seguida, 100 µL do lisado de hemácias obtido das placas com drogas foram acrescentados aos poços da placa de ELISA-HRP2. Após incubação por uma hora à temperatura ambiente, a placa foi novamente lavada e incubada, por mais uma hora em câmara úmida à temperatura ambiente, com 100µL do conjugado IgG monoclonal anti-MPFG-55P (ICLLAB-USA), diluído em soro de albumina bovina a 2%, Tween-20 a 1% e PBS, numa concentração final de 0,05 µg/ml. Após incubação, a placa novamente foi lavada e, em seguida, adicionou-se 100 µl do substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (Sigma®-solução única) em cada poço. Após 5 min em ambiente escuro, a reação foi interrompida com 50 µL de ácido sulfúrico a 1 M. A leitura da absorbância foi medida em filtro de 450nm, usando leitora de ELISA (IMark Microplate Absorbance Reader, Bio-Rad's Life Science Group-USA).

### **3.11 – PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE DOS RESULTADOS**

Cada teste realizado para a análise da atividade antimalárica para uma droga ou para uma cepa (ou isolado clínico) produziu 21 valores de resultados, relativos às sete diferentes concentrações avaliadas em triplicatas para cada medicamento. Para cada droga testada, um máximo de sete valores médios foram calculados e utilizados para a avaliação da atividade antimalárica, a saber:

a) No teste microscópico 48 horas-Modificado, a média da parasitemia nos poços controles sem droga foi calculada e utilizada na avaliação da taxa do crescimento do parasito nos poços com as drogas testes. A atividade da droga foi expressa pela percentagem de redução da parasitemia causada pela respectiva concentração da droga, em relação aos controles sem drogas. A média das triplicatas das concentrações da droga em teste que inibi 50% e 99% do crescimento do parasito foi definida como sua EC50% e EC99%, respectivamente.

b) Para o ELISA-HRP2, utilizou-se o *software* HN-NonLin (disponível em <http://www.malaria.farch.net>), que foi desenhado em uma planilha de cálculo Excel® e realiza uma análise de regressão não linear baseada em um modelo de regressão polinomial. O programa analisa a atividade antimalárica a partir da média geométrica das absorbâncias produzidas nos poços controles sem droga e nos poços com as drogas testes, em suas diferentes concentrações. A análise da concentração inibitória (EC50% e EC99%) dos antimaláricos, nesse programa, é determinada pelos valores logaritmicamente transformados em curvas dose-respostas (Noedl *et al.*, 2005).

Para validar o ELISA-HRP2 como método de avaliação da atividade antimalárica *in vitro* no presente estudo, inicialmente os resultados de absorbância produzidos nos poços controles, foram prescritos, de acordo com a recomendação da Organização Mundial de Saúde (Basco, 2007). Posteriormente, os níveis de EC50% e EC99% obtidos com essa técnica foram comparados àqueles produzidos pela técnica tradicional de microscopia, utilizando o teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney, considerando o nível de significância de 95%.

Para classificar os isolados clínicos como sensíveis ou resistentes às diferentes drogas antimaláricas, as médias de EC50% de cada droga, obtidas de isolados

cloroquina-sensíveis e cloroquina-resistentes, foram comparadas pelo teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney. Posteriormente, as EC50% de cada droga foram analisadas pelos pontos de corte de sensibilidade/resistência conhecidos para as mesmas, quais sejam: cloroquina: 100 nM; mefloquina: 30 nM; quinina: 500 nM; lumefantrina: 10,0 nM; artesunato: 10,0 nM; dihidroartemisinina: 10,0 nM (Ringwald & Basco, 1999). Para avaliar o potencial de resistência cruzada entre as drogas testadas, determinou-se o nível de correlação entre as EC50% de todos os antimaláricos testados, calculando-se os coeficientes de correlação de Pearson e de Spearman, considerando o nível de significância de 95%.

Por se tratar de droga de desenvolvimento recente e ainda não largamente testada como antimalárico, a tigeciclina não possui informação sobre o ponto de corte de EC50% para avaliação de sua eficácia antimalárica. Portanto, os resultados das EC50% e EC99% obtidos neste estudo foram comparados com aqueles observados pelo único estudo disponível (Garrison *et al.*, 2005) e correlacionados com esses mesmos parâmetros obtidos das demais drogas.

### **3.12 – Considerações éticas**

Todos os pacientes incluídos no presente estudo concordaram voluntariamente em participar do mesmo, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1). O presente estudo foi analisado e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas em Medicina Tropical de Rondônia e do Hospital Universitário Júlio Müller, conforme Pareceres nº 003/CEP/CEPEM-064/08 e 004/CEP/HUJM/99, respectivamente (Anexos 2 e 3).

#### **4. RESULTADOS**

#### **4.1. RESULTADO DA IMPLANTAÇÃO DA CULTURA E DAS TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DO *P. falciparum* NO LABORATÓRIO DE MALÁRIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JÚLIO MÜLLER**

A observação sistemática e diária das tentativas iniciais de culturas em dessecador com chama de vela mostrou crescimento insatisfatório do *P. falciparum* na maioria das placas cultivadas. Em geral, nessa condição, as culturas apresentavam um crescimento progressivo da parasitemia apenas na primeira semana, a partir da qual os parasitos mostravam-se vacuolizados e surgiam as formas sexuadas, ou seja, os gametócitos. Com a implantação do sistema de cultura com mistura de gás e incubação em recipiente plástico com tampa de fechamento hermeticamente fechado, as culturas mostraram desenvolvimento satisfatório, com parasitemias progressivamente mais altas. O tempo de esquizogonia sanguínea observado com esse sistema foi menor, com produção mais precoce de esquizontes maduros e rosáceas.

Durante o período de março de 2010 a março de 2012, 16 pacientes foram diagnosticados com malária causada pelo *P. falciparum* no Ambulatório de Infectologia do Hospital Universitário Júlio Müller. Apenas 10 desses pacientes preencheram os critérios de inclusão e deles foi possível obter isolados clínicos para tentativa de adaptação em cultura.

Dos 10 isolados submetidos à tentativa de cultura *in vitro*, apenas três (30,0%) apresentaram em adaptação adequada na cultura contínua. Esses isolados foram obtidos de pacientes procedentes do Estado de Rondônia e que demandaram assistência médica no Hospital Universitário Júlio Müller, sendo identificados como HUJM1, HUJM2 e HUJM3. Os isolados de referência de *P. falciparum*, isto é, 3D7

(cloroquina-sensível) e DW2 (cloroquina-resistente), mantiveram-se em cultura contínua durante todo o período do estudo.

Os resultados constatados pelas técnicas de microscopia (Teste 48 horas-Modificado) e da produção de HRP2 (ELISA-HRP2), medidos em percentagem de inibição do crescimento da parasitemia e em densidade ótica da concentração de HRP2 na cultura, resultaram níveis de atividade antimalárica *in vitro* comparáveis para cada droga, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os valores de EC50% e EC99% calculadas para os dois testes (Tabela 1). Além disso, observou-se alta correlação entre os valores de EC50% e EC99% dos resultados dos testes 48 horas-Modificado e ELISA-HRP2 (Figura 13).

**Tabela 1** – Comparação das médias das concentrações de drogas antimaláricas convencionais que induziram metade 50% (EC50%) ou 99% (EC99%) da atividade máxima *in vitro* contra isolados de *P. falciparum* sensíveis e resistentes à cloroquina, avaliada por microscopia 48 horas e ELISA-HRP2.

Droga (nM)	<b>Microscopia</b> (teste 48-h modificado)		<b>ELISA - HRP2</b>	
	EC50%	EC99%	EC50%	EC99%
Cloroquina	95,1	874,2	86,0	1017,1
Quinina	161,1	1899,1	188,7	2129,7
Mefloquina	4,5	118,1	4,8	114,0
Lumefantrina	1,8	68,4	3,0	61,6
Artemisinina	0,4	4,7	0,4	9,8
Artesunato	0,3	1,5	0,3	6,9

Obs: Nenhuma das diferenças observadas entre as EC50% e EC99% dos dois testes foi estatisticamente significativa (Teste U de Wilcoxon-Man-Whitney).

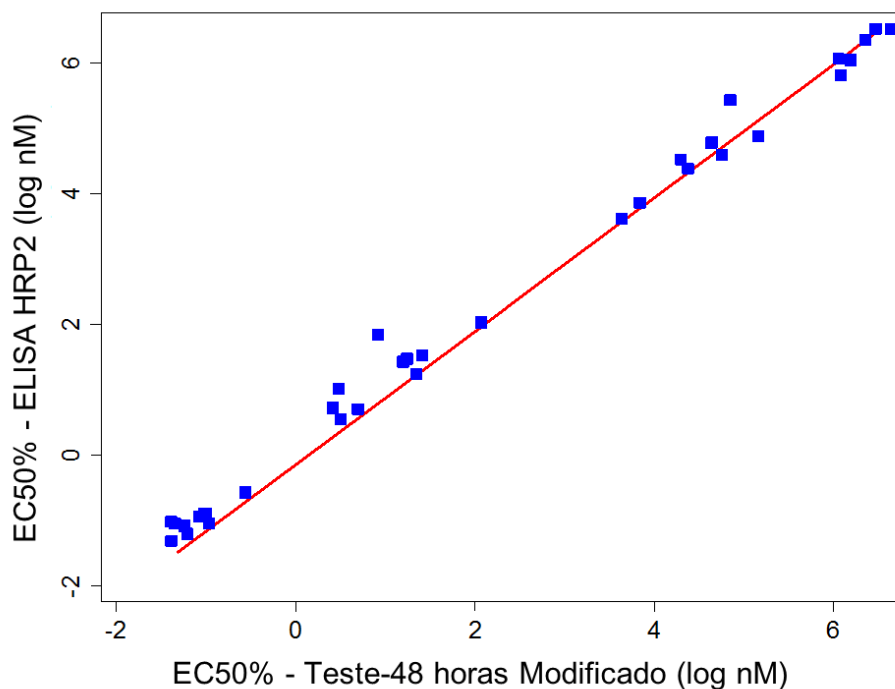


Figura 13 – Correlação entre os logaritmos das médias das concentrações de drogas antimaláricas convencionais que induziram metade (EC50%) da atividade máxima *in vitro* contra isolados de *P. falciparum* sensíveis e resistentes à cloroquina, determinada por microscopia 48 horas e ELISA-HRP2 ( $r = 0,984$ ;  $p < 0,0001$ ). [ $n = 35$ , sendo 5 isolados e 7 drogas].

Diante do bom desempenho e alta concordância dos resultados preliminares do teste ELISA-HRP2 com o teste 48 horas-Modificado, optou-se pela utilização do primeiro método para a avaliação da suscetibilidade do *P. falciparum* às drogas previstas neste estudo.

#### **4.2. ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* DAS DROGAS CONVENCIONAIS CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS REGIONAIS E DE REFERÊNCIA DO *P. falciparum*.**

As atividades antimaláricas *in vitro* das diferentes drogas testadas contra isolados clínicos regionais e de referência do *P. falciparum* são apresentadas na Tabela 2. Comparando os níveis de EC50% calculados para cada droga com os pontos de corte conhecidos para as mesmas (RignWald & Basco, 1999) observa-se que apenas o isolado clínico HUJM1 apresentou nível superior ao de referência para a cloroquina (100 nM), sugerindo ser resistente à esta droga. Destaca-se o alto valor da EC50% calculado para a cloroquina contra o isolado de referência DW2, confirmando a sua conhecida resistência à mesma. Um outro aspecto interessante foram as maiores EC50% calculadas para a lumefantrina, mefloquina e quinina contra esse isolado. O isolado clínico HUJM2 mostrou-se sensível a todas as drogas testadas, com baixos de níveis de EC50%. O isolado clínico HUJM3, embora sensível, apresentou níveis de EC50% muito próximos do pontos de corte da EC50% considerada resistente para a cloroquina (Tabela 2). As médias (IC95%) das concentrações das diferentes drogas antimaláricas convencionais que induziram metade (EC50%) da atividade máxima *in vitro* contra isolados de *P. falciparum* cloroquina-sensíveis e cloroquina-resistentes são mostradas na Tabela 3.

Tabela 2 - Concentrações de diferentes drogas antimaláricas convencionais que induziram metade (EC50%) da atividade máxima *in vitro* contra *P. falciparum* cloroquina-sensível (3D7), cloroquina-resistente (DW2) e isolados da Amazônia brasileira.

Isolados	ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DAS DROGAS (ELISA-HRP2)					
	(EC50% - nM)					
	Cloroquina	Quinina	Mefloquina	Lumefantrina	Artemisinina	Artesunato
<b>DW2</b>	130,80	426,00	7,60	6,30	0,60	0,30
<b>3D7</b>	47,4	91,2	4,4	2,0	0,40	0,40
<b>HUJM1</b>	116,5	118,2	4,5	2,8	0,40	0,40
<b>HUJM3</b>	98,5	228,0	3,4	2,0	0,40	0,30
<b>HUJM2</b>	36,9	80,3	4,1	1,7	0,30	0,40

Tabela 3 – Comparação das EC50% médias obtidas de diferentes drogas antimaláricas convencionais quando testadas contra isolados de *P. falciparum* cloroquina-sensíveis e cloroquina-resistente.

Droga	Isolados cloroquina-sensível (n=3)		Isolados cloroquina-resistentes (n=2)		p*
	EC50% média (nM)	Desvio- Padrão (nM)	EC50% média (nM)	Desvio- Padrão (nM)	
Cloroquina	60,91	32,95	123,60	10,10	0,044
Quinina	133,20	82,30	272,10	217,62	0,182
Mefloquina	3,98	0,46	6,05	2,13	0,088
Lumefantrina	1,92	0,18	1,54	2,52	0,072
Artesunato	0,34	0,03	0,34	0,10	0,486
Artemisinina	0,36	0,02	0,48	0,11	0,068

\* Teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney

#### 4.3. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE RESISTÊNCIA CRUZADA DO *P. falciparum* ENTRE AS DROGAS ANTIMALÁRICAS CONVENCIONAIS.

Com o objetivo de avaliar o potencial de resistência cruzada entre os antimaláricos que compõem os esquemas convencionais de tratamento da malária no Brasil, analisou-se a correlação entre as efetividades *in vitro* de cada par de drogas. Observou-se correlação positiva e estatisticamente significante entre as EC50% dos pares artemisinina x lumefantrina ( $r^2=0,980$ ;  $p=0,004$ ), artemisinina x mefloquina ( $r^2=0,966$ ;  $p=0,007$ ) e mefloquina x lumefantrina ( $r^2=0,930$ ;  $p=0,022$ ). A quinina apresentou EC50% fortemente correlacionada com a da cloroquina, porém sem significância estatística. Nenhuma outra droga mostrou correlação positiva com a cloroquina, que é a única droga do estudo que tem baixa eficácia contra o *P. falciparum* (Tabela 4).

Tabela 4 – Correlação entre as concentrações de diferentes drogas antimaláricas convencionais que induziram metade (EC50%) da atividade máxima *in vitro* contra *P. falciparum* cloroquina-sensível (3D7), cloroquina-resistente (DW2) e isolados clínicos da Amazônia brasileira.

<b>DROGAS</b>	<b>Cloroquina</b> r <sup>2</sup> (valor de p)	<b>Lumefantrina</b> r <sup>2</sup> (valor de p)	<b>Mefloquina</b> r <sup>2</sup> (valor de p)	<b>Quinina</b> r <sup>2</sup> (valor de p)	<b>Artemisinina</b> r <sup>2</sup> (valor de p)
<b>Artesunato</b>	-0,360 (0,552)	-0,556 (0,330)	-0,447 (0,450)	-0,848 (0,069)	-0,486 (0,406)
<b>Artemisinina</b>	0,615 (0,270)	0,980 (0,004)*	0,966 (0,007)*	0,750 (0,169)	
<b>Quinina</b>	0,800 (0,110)	0,820 (0,100)	0,606 (0,280)		
<b>Mefloquina</b>	0,441 (0,456)	0,930 (0,022)*			
<b>Lumefantrina</b>	0,730 (0,162)				

Obs: EC50% em nM;

\*: estatisticamente significativa

r<sup>2</sup>: coeficiente de correlação de Pearson

#### 4.4. ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* DO ANTIBIÓTICO TIGECICLINA.

As concentrações de tigeciclina que induziram metade (EC50%), 90% (EC90%) e 99% (EC99%) da atividade antimalárica máxima *in vitro* contra o *P. falciparum* variaram de 332,0 nM a 678,6 nM, 1264,7 nM a 12026,4 nM e 13095,3 nM a 22426,2 nM, respectivamente. Os menores valores de EC50% da tigeciclina foram observados contra os isolados sabidamente sensíveis à cloroquina. As médias (IC95%) das EC50% e EC99% calculadas para o conjunto de isolados (sensíveis e resistentes) foram de 535,5 (344,3-726,8) nM e 18452,3 (14261,0-22643,6) nM, respectivamente (Tabela 5). Nenhuma correlação positiva foi observada entre as EC50% da tigeciclina e das demais drogas convencionais, embora alto coeficiente (porém não estatisticamente significativo) tenha sido observado entre as EC50% da tigeciclina e da cloroquina (Tabela 6 e Figura 14).

Tabela 5 - Concentrações de tigeciclina que induziram metade (EC50%) e 99% (EC99%) da atividade máxima *in vitro* contra *P. falciparum* cloroquina-sensível (3D7), cloroquina-resistente (DW2) e isolados da Amazônia brasileira.

Isolados	Atividade antimalárica em ELISA-HRP2	
	(nM)	
	EC50%	EC99%
DW2	568,9	13.095,3
3D7	332,0	19.459,5
HUJM1	674,6	22.426,2
HUJM3	678,6	18.675,3
HUJM2	423,4	18.605,2
Média (IC95%)	535,5 (344,3-726,8)	18.452,3 (14.261,0-22.643,6)

Tabela 6 – Correlação entre as concentrações médias de tigeciclina e das drogas antimaláricas convencionais que induziram metade (EC50%) da atividade máxima *in vitro* contra *P.falciparum* cloroquina-sensível, cloroquina-resistente e isolados clínicos da Amazônia brasileira.

Drogas	TIGECICLINA (nM)	
	EC50% r <sup>2</sup> (valor de p)	EC99% r <sup>2</sup> (valor de p)
Cloroquina	0,831 (0,080)	-0,776 (0,122)
Mefloquina	0,035 (0,954)	-0,977 (0,004)
Quinina	0,567 (0,318)	-0,338 (0,577)
Lumefantrina	0,354 (0,558)	-0,980 (0,003)
Artemisinina	0,163 (0,792)	-0,527 (0,361)
Artesunato	-0,212 (0,731)	-0,422 (0,479)

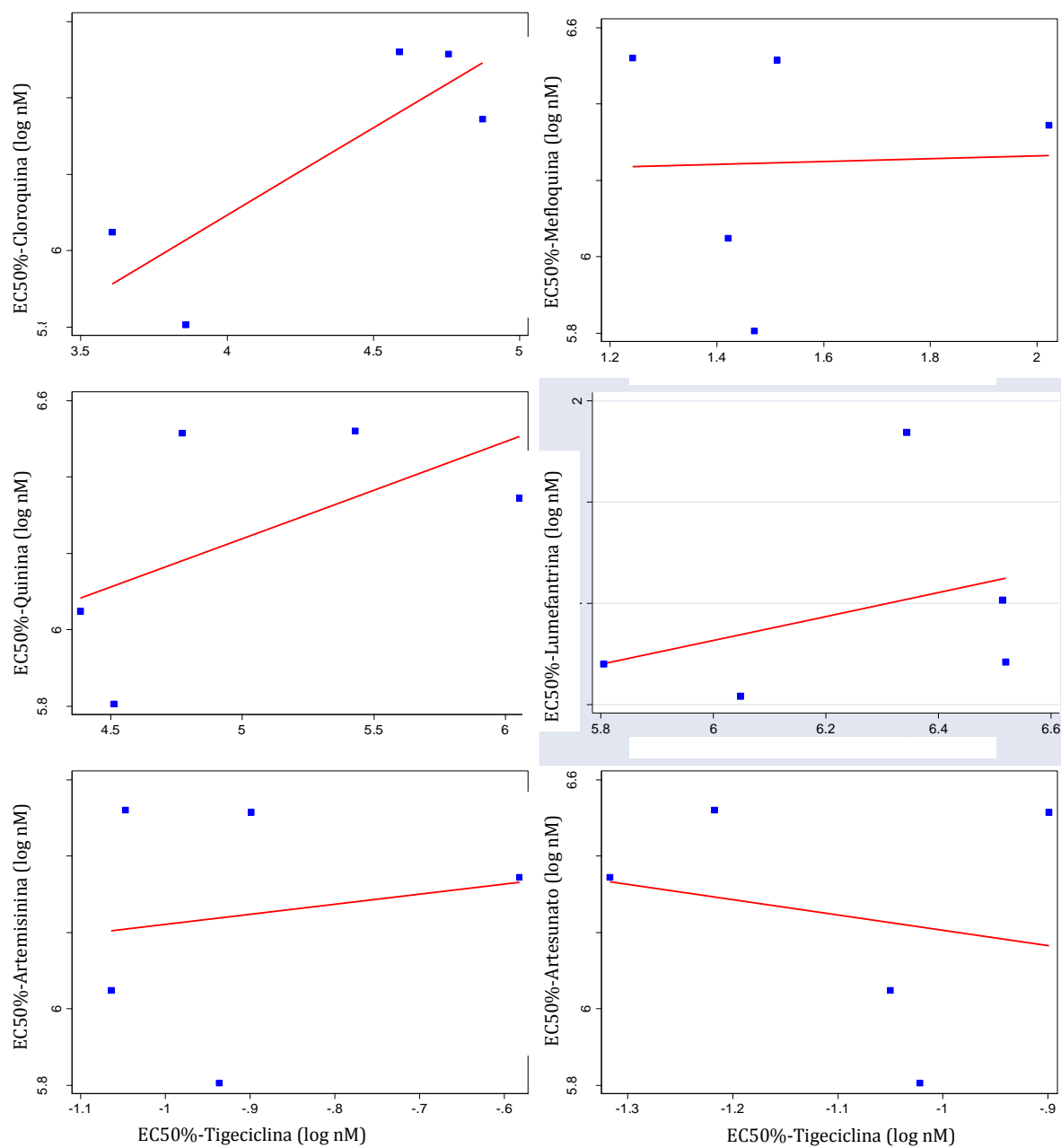


Figura 14 - Correlação entre os logaritmos das médias das concentrações de tigeciclina e de drogas antimaláricas convencionais que induziram metade (EC50%) da atividade máxima *in vitro* contra isolados de *P. falciparum* sensíveis e resistentes à cloroquina.

## **5. DISCUSSÃO**

### **5.1. IMPLANTAÇÃO DA CULTURA *IN VITRO* DO *P. falciparum* NO LABORATÓRIO DE MALÁRIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JÚLIO MÜLLER**

A cultura do *P. falciparum* é uma importante ferramenta para a compreensão da biologia parasitária, bioquímica, biologia molecular, imunologia e farmacologia da malária. Uma importante aplicação desta cultura é possibilitar o ensaio *in vitro* de sensibilidade aos medicamentos, que é uma ferramenta importante para a triagem de potenciais medicamentos para a malária, o monitoramento da eficácia da droga e para a detecção de padrões de resistência cruzada do parasito entre as drogas (Ringwald., 1996; Wernsdorfer, 1994). Embora várias modificações tenham sido inseridas no decorrer do tempo, o método tradicional de cultura *in vitro* das fases eritrocitárias de *P. falciparum* permanece essencialmente o mesmo, descrito originalmente por Trager & Jensen (1976). Nessa técnica padrão, os seguintes componentes são necessários: eritrócitos humanos infectados com *P. falciparum*, RPMI 1640 tamponado e soro humano. Os eritrócitos parasitados são incubados a 37°C, numa atmosfera de baixa tensão de oxigênio, que pode ser conseguida pela queima de velas em dessecador de vidro ou por um sistema de mistura de gases previamente preparada. A grande vantagem do sistema de dessecador com chama de vela é a sua portabilidade e possibilidade de utilização em campo. Contudo, tem a desvantagem de requerer troca diária do meio de cultura e parasitemias mais altas no inóculo inicial (Trigg, 1985).

No presente estudo, a utilização de mistura de gases (O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) previamente preparada e inoculada em recipiente hermeticamente fechado, em

vez de ambientação de um dessecador de vidro com gases produzidos pela chama de velas, resultou em melhor desenvolvimento do *P. falciparum* em cultura *in vitro*. Embora vários estudos tenham mostrado desenvolvimento semelhante do parasito nesses dois sistemas (Butcher, 1979; Warhurst *et al.*, 1985; He *et al.*, 2000), é esperado que a obtenção de nível sustentado de oxigênio em concentração adequada para o parasito tenha sido garantida no sistema com mistura de gases. O mesmo pode não ocorrer no ambiente obtido com chama de vela, uma vez que não é possível precisar as concentrações de gases nesse sistema. De fato, a presença do oxigênio e dióxido de carbono no ambiente da cultura é item essencial para o bom desenvolvimento do parasito, principalmente quando suas concentrações são mantidas em 5%-10% e 5%, respectivamente (Butcher, 1979; Basco, 2007; Trigg, 1985). Já se conhece que concentrações de oxigênio inferiores a 5% ou superiores a 10% são inibitórias para o crescimento do parasito (Butcher, 1979), podendo interferir nos resultados dos ensaios de suscetibilidade *in vitro* do *P. falciparum* à drogas (Haruki *et al.*, 1997), embora esse tema seja ainda controverso (He *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 1999). Na possibilidade dessa interferência, o sistema de mistura de gases pode ser considerado vantajoso em relação ao dessecador com chama de velas, uma vez que a manutenção da concentração dos gases é possível de ser assegurada (Warhurst *et al.*, 1985).

## **5.2. IMPLANTAÇÃO DAS TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DO *P. falciparum* ÀS DROGAS ANTIMALÁRICAS NO LABORATÓRIO DE MALÁRIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JÚLIO MÜLLER**

Durante muitos anos, a avaliação da suscetibilidade *in vitro* do *P. falciparum* às drogas antimaláricas foi feita pela observação microscópica da inibição do

crescimento do parasito em cultura *in vitro* (Noedl *et al.*, 2004). Embora simples, de baixo custo e reprodutível, essa técnica tem a desvantagem de ser extremamente trabalhosa, principalmente quando se pretende avaliar um número maior de drogas e/ou de isolados do *P. falciparum* (Noedl *et al.*, 2004). O surgimento do ensaio automatizado de incorporação da hipoxantina tritiada pelo parasito em cultura, trouxe a vantagem de ser de realização mais rápida e menos trabalhosa, porém com a desvantagem de utilizar radioisótopos e equipamento de alto custo (Basco, 2007).

A descoberta de proteínas altamente específicas e conservadas do *P. falciparum*, que são produzidas em cultura contínua, tais como HRP2 e a LDH, permitiu o desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos para a sua detecção, posteriormente propostos para a avaliação da atividade antimalárica *in vitro* de drogas (Basco, 2007). Por ser de realização simples e de custo mais baixo, esses ensaios têm sido cada vez mais utilizados na monitorização da resistência do *P. falciparum* às drogas antimaláricas convencionais (Aponte *et al.*, 2011; Tyner *et al.*, 2012; Parker *et al.*, 2012) e no estudo inicial de compostos com potencial atividade antimalárica (Krettli *et al.*, 2009; Held *et al.*, 2010b).

Os estudos iniciais do ELISA-HRP2 para avaliação da atividade antimalárica de drogas mostraram alta concordância de seus resultados de EC50% com aqueles obtidos pela técnica de incorporação da hipoxantina tritiada (Noedl *et al.*, 2002), pelo teste-48 horas-Modificado (Noedl *et al.*, 2004) e pela microscopia de avaliação de maturação do parasito para esquizontes (Kurth *et al.*, 2009). Alta concordância também foi observada neste estudo, entre os níveis de EC50% e EC99% de diferentes drogas, obtidos pelo teste-48 horas-Modificado e pelo ELISA-HRP2, após respectivas culturas *in vitro*. Esse resultado atesta o sucesso da implantação desses

ensaios no Laboratório de Malária do Hospital Universitário Júlio Müller. Esse sucesso permitiu, não apenas o prosseguimento da presente pesquisa, mas também a possibilidade de consolidação dessa importante linha de pesquisa em nossa realidade.

### **5.3. ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* DAS DROGAS CONVENCIONAIS CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS REGIONAIS E DE REFERÊNCIA DO *P. falciparum***

A utilização de ensaios *in vitro* para a vigilância do desenvolvimento da resistência do parasito da malária ao tratamento tem a inquestionável vantagem de se poder avaliar, simultaneamente, um grande número de drogas, podendo, inclusive, praticá-los no campo. Os resultados desses ensaios permitem a constatação precoce de mudanças intrínsecas no perfil de resposta do parasito às drogas, orientando a necessidade de futuras avaliações em ensaios *in vivo*.

A cloroquina mostrou-se eficaz para dois dos três isolados clínicos regionais de *P. falciparum* obtidos neste estudo. Nível de EC50% compatível com resistência à cloroquina foi detectado em apenas um dos três isolados. Apesar do pequeno número de isolados analisados e da avaliação exclusivamente transversal do presente estudo, esse achado sugere um perfil otimista de resgate da eficácia da cloroquina na Amazônia brasileira, uma vez que a magnitude da resistência do *P. falciparum* a essa droga tem sido considerada alta desde os anos 1980, quando houve mudança na política de tratamento dessa espécie de *Plasmodium* (Loiola *et al.*, 2002). Essa observação também já foi feita em estudos realizados no Sudeste Asiático, onde a resistência do *P. falciparum* provocou a exclusão da cloroquina na política de controle do *P. falciparum* desde 1974. Os autores desses estudos

apontam esse período de baixa pressão da droga como responsável pela recuperação de sua eficácia (Suwanddittakul *et al.*, 2009; Pickard *et al.*, 2003; Chaijaroenkul *et al.*, 2005). Porém, o mesmo não ocorreu na Amazônia colombiana, como mostra estudo recente de Aponte *et al.* (2011), que constataram alta (96,3%) prevalência de parasitos resistentes à cloroquina, em avaliação *in vitro*. É possível que prevalências também altas de resistência sejam encontradas na Amazônia brasileira, em estudos com maior número de isolados clínicos, como consequência da pressão continuada da cloroquina, largamente empregada para o tratamento do *P. vivax* em nosso meio.

Todos os isolados testados, incluindo os de referência, mostraram-se sensíveis a quinina, com valores de EC50% variando de 80,3 nM a 426,0 nM. Essa ausência de resistência *in vitro* a quinina não é surpreendente, uma vez que essa droga não é utilizada no Brasil em monoterapia há mais de 20 anos e, atualmente, compõe o arsenal terapêutico da malária apenas em um esquema de segunda linha, em associação com a doxiciclina. A restrição de seu uso em larga escala certamente contribuiu para a prevenção do desenvolvimento da resistência, conforme preconizam outros autores (Wongsrichanalai *et al.*, 2002). Contudo, chama a atenção a maior EC50% da quinina ocorrendo com o isolado DW2, de referência cloroquino-resistente. Além disto, observou-se correlação positiva (embora não estatisticamente significativa) entre as EC50% de quinina e cloroquina, como também já foi observado na Tailândia (Chaijaroenkul *et al.*, 2005). Essas duas observações nesse estudo podem ser explicadas pelo fato de que tanto a cloroquina quanto a quinina são antimaláricos aminoquinolínicos e, portanto, podem ser alvos de resistência cruzada do *P. falciparum* (Dinio *et al.*, 2012).

Nenhum dos isolados testados neste estudo apresentou evidência de resistência *in vitro* do *P. falciparum* à mefloquina. Há mais de 30 anos, Lopez Antuñano & Wernsdorfer (1979) demonstraram que a mefloquina era muito mais ativa *in vitro* contra o *P. falciparum* do que a cloroquina. Até a década de 80, estimava-se que a EC50% da mefloquina na Tailândia era de 2,86 ng/mL (Childs *et al.*, 1987). De forma similar, a resistência do *P. falciparum* à mefloquina foi bastante documentada na região endêmica da Amazônia até o ano 2000 (Mockenhaupt, 1995) e também tem apresentado declínio na última década (Aponte *et al.*, 2011). Entre 1991 e 1994, a média geométrica da EC50% dessa droga aumentou para 27,6 (IC95%: 21,0 – 36,0) ng/mL na mesma área estudada por esses autores. Na mesma época, a resistência *in vivo* a essa droga já era registrada para o *P. falciparum* naquele país. O declínio da eficácia da mefloquina evoluiu no decorrer dos anos, atingindo o máximo em 1995, quando a média (IC95%) da EC50% passou para 47,2 (34,0 – 65,0) ng/mL. Após esse ano e em paralelo à utilização de esquemas de combinação com derivados de artemisinina, a resistência do *P. falciparum* à mefloquina tem decrescido progressivamente naquele país, provavelmente pela suspensão de seu uso em monoterapia (Nosten *et al.*, 2000).

A lumefantrina, inicialmente estudada como antimalárico na China, teve a sua eficácia *in vivo* confirmada tanto em uso isolado quanto em combinação com o artemeter (WHO, 1990). Com a recomendação de priorizar a utilização da terapia em combinação com derivados da artemisinina para o tratamento do *P. falciparum*, feita pela OMS na década de 2000, o esquema de artemeter + lumefantrina passou a ser empregado em diversos países (WHO, 2006). No Brasil, a lumefantrina passou a fazer parte do arsenal terapêutico da malária a partir de

2006, com a decisão, pelo PNCM, de substituir a associação quinina + doxiciclina pelo esquema de artemeter + lumefantrina, como primeira linha de tratamento das infecções por *P. falciparum* (Ministério da Saúde, 2010). O nível de EC50% observado para a lumefantrina para os isolados deste estudo foi inferior ao *cutt-off* previamente preconizado (Ringwald & Basco, 1999), sugerindo ser droga ainda eficaz em nosso meio. De fato, a resistência *in vitro* do *P. falciparum* a essa droga ainda não foi definitivamente constatada. Na Amazônia, apenas um estudo demonstrou níveis de EC50% mais altos para a droga, em avaliação *in vitro* (Legrand *et al.*, 2008), embora o mesmo não tenha sido observado em outro estudo feito na Colômbia (Aponte *et al.*, 2011).

Preocupante foi a observação de alta correlação entre as EC50% da lumefantrina com a artemisinina, sugerindo potencial de desenvolvimento de resistência cruzada do parasito a ambas as drogas. Relatos de resistência a essas drogas, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, têm sido cada vez mais publicados nos últimos anos (Nzila *et al.*, 2012; Tyner *et al.*, 2012).

Como era esperado, os compostos de artemisinina aqui estudados (artemisina e artesunato) apresentaram excelente eficácia *in vitro* contra o *P. falciparum*. Em uso isolado, a eficácia dos derivados da artemisinina nunca é 100% em avaliações *in vivo*, isto é, a taxa de recrudescência tardia é, em geral, alta (Rehwagen, 2006). Devida a sua rapidez de ação e alto impacto sobre a grande massa de parasitos circulantes, sua eficácia foi avaliada em combinação com outros antimaláricos, o que resultou em ótimo sinergismo (Santelli *et al.*, 2012). Por essa razão, as drogas do grupo das artemisininas passaram a compor os atuais esquemas de combinação de antimaláricos, chamados ACT, que são considerados de escolha para o tratamento do *P. falciparum* nas diferentes áreas endêmicas do mundo (WHO, 2010b). Embora existam, poucas são as

evidências de desenvolvimento de resistência do *P. falciparum* a esses ACT, em avaliações *in vivo* (Borrmann *et al.*, 2011). Na Amazônia brasileira, os esquemas ACT têm sido empregados nos últimos anos e sua eficácia ainda é alta, tanto *in vivo* (Gutman, 2009) quanto *in vitro* (Ferreira *et al.*, 2008). O impacto da introdução do ACT na política de controle da malária no Brasil é atestado pela constatação, nos últimos, de declínio progressivo da proporção de casos de malária causada pelo *P. falciparum* (Santelli *et al.*, 2012).

#### **5.4. ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* DO ANTIBIÓTICO TIGECICLINA**

Antibióticos tais como a clindamicina e as tetraciclina têm sido largamente utilizados há muitos anos em combinação com outros esquizotocidas sanguíneos, potencializando o seu efeito terapêutico contra o *P. falciparum* (WHO, 2010b). No Brasil e em outros países da América do Sul, a combinação da quinina com tetraciclina, doxiciclina ou clindamicina tem feito parte da política de tratamento dessa espécie por vários anos (Ministério da Saúde, 2010; Padilla & Montoya, 2011). O efeito sinérgico desses antibióticos e de outros, tais como as quinolonas e a azitromicina, sobre a ação das 4-aminoquinolinas ou dos derivados da artemisinina é inquestionável (Duarte *et al.*, 1996; WHO, 2010a).

A tigeciclina, na avaliação *in vitro* realizada no presente estudo, mostrou-se eficaz contra todos os isolados de *P. falciparum* testados, considerando como referência os valores de EC50% previamente observados para essa droga (Helder *et al.*, 2010a; Starzengruber *et al.*, 2009). Pacientes com malária grave causada pelo *P. falciparum* recebem, na maioria das vezes, derivados de artemisinina em administração injetável, em virtude de sua rápida ação terapêutica. Recomenda-se, nesses casos, administrar um

antibiótico injetável (tal como a clindamicina), com o intuito de potencializar a ação esquizotocida sanguínea (Ministério da Saúde, 2010; WHO, 2006). A tigeciclina, por ser de administração exclusivamente parenteral e por ser análoga da tetraciclina, pode ser um potencial substituto da clindamicina nessa situação. Preocupa, no entanto, a observação de provável correlação entre as EC50% da tigeciclina e da cloroquina, sugerindo potencial de resistência cruzada do *P. falciparum* as essas drogas, não observada na avaliação feita por Starzengruber *et al.*, 2009.

## **6. CONCLUSÕES**

- O ensaio imunoenzimático (ELISA) para avaliação da produção da HRP2 em cultura é um método válido e factível em nossa realidade para estudo da suscetibilidade *in vitro* do *P. falciparum* às drogas antimaláricas.
  
- A cloroquina foi o único antimalárico que não apresentou atividade *in vitro* para todos os isolados de *P. falciparum* avaliados.
  
- A quinina, a mefloquina, a lumefantrina, a artemisinina e o artesunato, que são drogas componentes dos esquemas convencionais de antimaláricos preconizados no Brasil, apresentaram satisfatória atividade antimalárica *in vitro* contra os isolados regionais e de referência do *P. falciparum* avaliados.
  
- A lumefantrina, que é droga componente do esquema de primeira linha para o tratamento da malária causada pelo *P. falciparum* no Brasil, apresentou potencial de desenvolver resistência cruzada com a artemisinina.
  
- O antibiótico tigeciclina mostrou-se eficaz contra isolados clínicos regionais e de referência do *P. falciparum* em avaliação *in vitro*, podendo representar droga alternativa para o tratamento da malária grave causada por essa espécie de parasito.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Agwuh KN, Macgowan A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 58(2):256-65.

Alecrim MC, Alecrim W, Macedo V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999; 32:67-8.

Aponte SL, Díaz G, Pava Z, Echeverry DF, Iburguen D, Rios M, Murcia LM, Quelal C, Murillo C, Gil P, Björkman A, Osorio L. Sentinel network for monitoring *in vitro* susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in Colombia: a proof of concept. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011; 106(Suppl. I):123-9.

Baird JK, Hoffman SL. Primaquine therapy for malaria. *Clin Infect Dis.* 2004; 39(9):1336-45.

Basco LK, Eldin de Pecoulas P, Wilson CM, Le Bras J, Mazabraud A. Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and pyrimethamine and cycloguanil resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 1995; 69(1):135-8.

Basco LK, Bickii J, Ringwald P. *In vitro* activity of lumefantrine (benflumetol) against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in Yaoundé, Cameroon. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(9):2347-51.

Basco LK. Field application of *in vitro* assays for the sensitivity of human malaria parasites to antimalarial drugs. Geneva WHO. 2007. 202p.

Björkman A, Phillips-Howard PA. The epidemiology of drug-resistant malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1990; 84(2):177-80.

Borrmann S, Sasi P, Mwai L, Bashraheil M, Abdallah A, Muriithi S, Frühauf H, Schaub B, Pfeil J, [Peshu J](#), Hanpithakpong W, [Rippert A](#), Juma E, Tsofa B, Mosobo M, Lowe B, [Osier F](#), [Fegan G](#), Lindegårdh N, Nzila A, Peshu N, Mackinnon M, Marsh K. Declining responsiveness of *Plasmodium falciparum* infections to

artemisinin-based combination treatments on the Kenyan Coast. PLoS One. 2011; 6(11):e26005.

Boulos M, Di Santi SM, Barata LCB, Segurado AAC, Dutra PA, Neves VLFC. Some aspects of treatment, prophylaxis and chemoresistance of *Plasmodium falciparum* malaria. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1986; 81(Suppl. 2):255-7.

Butcher GA. Factors affecting the *in vitro* culture of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium knowlesi*. Bull World Health Organ. 1979; 57(Suppl. 1):17-26.

Calvosa VS, Adagu IS, Póvoa MM. *Plasmodium falciparum*: emerging mefloquine resistance *in vitro* in Para State, north Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001; 95(3):330-1.

Cerutti C Jr, Durlacher RR, de Alencar FE, Segurado AA, Pang LW. *In vivo* efficacy of mefloquine for the treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in Brazil. J Infect Dis. 1999; 180(6):2077-80.

Chaijaroenkul W, Bangchang KN, Mungthin M, Ward SA. *In vitro* antimalarial drug susceptibility in Thai border areas from 1998-2003. Malar J. 2005; 4:37.

Childs GE, Pang L, Wimonwattrawatee T, Pooyindee N, Nanakorn A, Limchitree S, Webster HK. *In vitro* mefloquine resistance of *Plasmodium falciparum* isolated from the Burmese border region of Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1987; 18(4):438-43.

Desakorn V, Silamut K, Angus B, Sahassananda D, Chotivanich K, Suntharasamai P, Simpson J, White NJ. Semi-quantitative measurement of *Plasmodium falciparum* antigen PfHRP2 in blood and plasma. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1997; 91(4):479-83.

Desakorn V, Dondorp AM, Silamut K, Pongtavornpinyo W, Sahassananda D, Chotivanich K, Pitisuttithum P, Smithyman AM, Day NP, White NJ. Stage-dependent production and release of histidine-rich protein 2 by *Plasmodium falciparum*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2005; 99(7):517-24.

Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979; 16(6):7108.

Dinio T, Gorka AP, McGinniss A, Roepe PD, Morgan JB. Investigating the activity of quinine analogues versus chloroquine resistant *Plasmodium falciparum*. *Bioorg Med Chem.* 2012; 20(10):3292-7.

Druilhe P, Moreno A, Blanc C, Brasseur PH, Jacquier P. A colorimetric in vitro drug sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 64(5-6):233-41.

Duarte EC, Fontes CJ, Gyorkos TW, Abrahamowicz A. Randomized controlled trial of artesunate plus tetracycline versus standard treatment (quinine plus tetracycline) for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 54:197-202.

Duarte EC, Fontes CJ. Associação entre a produção anual de ouro em garimpos e incidência de malária em Mato Grosso-Brasil, 1985-1996. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002; 35(6):665-8.

Duraisingh MT, Jones P, Sambou I, von Seidlen L, Pinder M, Warhurst DC. The tyrosine-86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* is associated with increased sensitivity to the antimalarials mefloquine and artemisinin. *Mol Biochem Parasitol.* 2000; 108(1):13-23.

Fairlamb HA, Warhurst DC, Peters W. An improved technique for the cultivation of *Plasmodium falciparum in vitro* without daily medium change. *Ann Trop Med Parasitol.* 1985; 79(4):379-84.

Ferreira ID, Martinelli A, Rodrigues LA, Carmo EL, Rosario VE, Povoá MM, Cravo P. *Plasmodium falciparum* from Para (Brazil) shows satisfactory *in vitro* response to artemisinin derivatives and absence of the S769N mutation in the SERCA-type PfATPase6. *Trop Med Int Health.* 2008; 13(2):199-207.

Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, Ursos LM, Sidhu AB, Naudé B, Deitsch KW, Su XZ, Wootton JC, Roepe PD, Wellems TE. Mutations in the *Plasmodium falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in Chloroquine resistance. *Mol Cell*. 2000; 6(4):861-71.

Fitch CD. Involvement of heme in the antimalarial action of chloroquine. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 1998; 109: 97-105.

Foley M, Tilley L. Quinoline Antimalaria: Mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. *Pharmacol Ther*. 1998; 79(1):55-87.

Garrison MW, Neumiller JJ, Setter SM. Tigecycline: an investigational glycylicycline antimicrobial with activity against resistant gram-positive organisms. *Clin Ther*. 2005; 27(1):12-22.

Golan DE, Tashjian AH, Armstrong EJ, Armstrong AW. Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2009; cap. 35, 590-8. 914p.

Greer ND. Tigecycline (Tygacil): the first in the glycylicycline class of antibiotics. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2006; 19(2):155-61.

Gutman J, Green M, Durand S, Rojas OV, Ganguly B, Quezada WM, Utz GC, Slutsker L, Ruebush TK 2nd, Bacon DJ. Malar J. Mefloquine pharmacokinetics and mefloquine-artesunate effectiveness in Peruvian patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J*. 2009; 8:58.

Haruki K, Kobayashi F, Fujino T, Matsui T, Tsuji M. Evaluation of AnaeroPack series to determine drug sensitivity of *P. falciparum*. *Japanese J Trop Med*. 1997; 25(Suppl):87.

Hassan AM, Björkman A, Wernsdorfer WH. Synergism of benflumetol and artemether in *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*. 1999; 61(3):439-45.

He S, Saito-Ito A, Tanabe K, Matsumura T. *Plasmodium falciparum*: effective use of the CO<sub>2</sub>-NaHCO<sub>3</sub> buffer system for evaluating chloroquine resistance. *Exp Parasitol*. 2000; 94(2):121-4.

Held J, Zanger P, Issifou S, Kremsner PG, Mordmüller B. *In vitro* activity of tigecycline in *Plasmodium falciparum* culture-adapted strains and clinical isolates from Gabon. *Int J Antimicrob Agents*. 2010a; 35(6):587-9.

Held J, Westerman R, Kremsner PG, Mordmüller B. *In vitro* activity of mirincamycin (U24729A) against *Plasmodium falciparum* isolates from Gabon. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010b; 54(1):540-2.

Hoppe HC, van Schalkwyk DA, Wiehart UI, Meredith SA, Egan J, Weber BW. Antimalarial Quinolines and Artemisinin Inhibit Endocytosis in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(7):2370-8.

Kinfu G, Gebre-Selassie S, Fikrie N. Therapeutic Efficacy of Artemether-Lumefantrine for the Treatment of Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria in Northern Ethiopia. *Malar Res Treat*. 2012 ; 2012:548710.

Krettli AU, Adebayo JO, Krettli LG. Testing of natural products and synthetic molecules aiming at new antimalarials. *Curr Drug Targets*. 2009; 10(3):261-70.

Kurth F, Pongratz P, B elard S, Mordm uller B, Kremsner PG, Ramharter M. *In vitro* activity of pyronaridine against *Plasmodium falciparum* and comparative evaluation of anti-malarial drug susceptibility assays. *Malar J*. 2009; 8:79.

Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*. 1979; 65(3):418-20.

Legrand E, Volney B, Meynard JB, Mercereau-Puijalon O, Esterre P. *In vitro* monitoring of *Plasmodium falciparum* drug resistance in French Guiana: a synopsis of continuous assessment from 1994 to 2005. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(1):288-98.

Lin Q, Onda T, Kano S, Masuda G, Suzuki M. *In vitro* drug susceptibility test of *Plasmodium falciparum* using a portable thermostat and CO<sub>2</sub> gas generator. Jpn Assoc Inf Dis. 1999; 73(11):1099-103.

Loiola CCP, Silva CJM, Tauil PL. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. Rev Panam Salud Publica. 2002; 11(4):235-44.

López Antuñano FJ, Wernsdorfer WH. *In vitro* response of chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* to mefloquine. Bull World Health Organ. 1979; 57(4):663-5.

Martin SK, Rajasekariah GH, Awinda G, Waitumbi J, Kifude C. Unified parasite lactate dehydrogenase and histidine-rich protein ELISA for quantification of *Plasmodium falciparum*. Am J Trop Med Hyg. 2009; 80(4):516-22.

Mayxay M, Khanthavong M, Chanthongthip O, Imwong M, Pongvongsa T, Hongvanthong B, Phompida S, Vanisaveth V, White NJ, Newton PN. Efficacy of artemether-lumefantrine, the nationally-recommended artemisinin combination for the treatment of uncomplicated falciparum malaria, in southern Laos. Malar J. 2012 Jun 8; 11(1):184.

Men TT, Huy NT, Trang DT, Shuaibu MN, Hirayama K, Kamei K. A simple and inexpensive haemozoin-based colorimetric method to evaluate antimalarial drug activity. Malar J. 2012; 11(1):272.

Meryman HT, Hornblower M. A method for freezing and washing red blood cells using a high glycerol concentration. Transfusion. 1972; 12(3): 145-56.

Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. Nature. 2002; 415(6872):673-9.

Ministério da Saúde (Brasil). Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária. Série A: Normas e Manuais Técnicos, 2ª ed. Brasília: Ministério da Saúde. 2009; 2:20-43.

Ministério da Saúde (Brasil). Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Série A: Normas e Manuais Técnicos, 1ª ed. Brasília: Ministério da Saúde. 2010.

Ministério da Saúde (Brasil). Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. Relatório de Situação, Mato Grosso. Série C: Projetos, Programas e Relatórios. 5ª ed. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde. 2011.

Ministério da Saúde (Brasil). Dados epidemiológicos de malária, por estado. Amazônia Legal, jan a dez de 2010 e 2011. Portal da Saúde. 2012. [www.portal.saude.gov.br](http://www.portal.saude.gov.br)

Mockenhaupt FP. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum*. Parasitol Today. 1995; 11(7):248-53.

Mota MM, Rodriguez A. Migration through host cells: the first steps of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. Cell Microbiol. 2004; 6(12):1113-8.

Muralidharan G, Fruncillo RJ, Micalizzi M, Raible DG, Troy SM. Effects of age and sexo single-dose pharmacokinetics of tigecycline in healthy subjects. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(4):1656-9.

Neiva A. Formação de raça de hematozoário do impaludismo resistente à quinina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1910; 2(1):131-40.

Nguyen-Dinh P, Trager W. Chloroquine resistance produced in vitro in an African strain of human malaria. Science. 1978; 200(4348):1397-8.

Nguyen-Dinh P, Trager W. *Plasmodium falciparum* in vitro: determination of chloroquine sensitivity of three new strains by a modified 48-hour test. Am J Trop Med Hyg. 1980; 29(3):339-42.

Noedl H, Wongsrichanalai C, Miller RS, Myint KS, Looareesuwan S, Sukthana Y, Wongchotigul V, Kollaritsch H, Wiedermann G, Wernsdorfer WH. *Plasmodium falciparum*: effect of anti-malarial drugs on the production and secretion characteristics of histidine-rich protein II. Exp Parasitol. 2002a; 102(3-4):157-

Noedl H, Wernsdorfer WH, Miller RS, Wongsrichanalai C. Histidine-rich protein II: a novel approach to malaria drug sensitivity testing. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2002b; 46(6):1658-64.

Noedl H, Wongsrichanalai C, Wernsdorfer WH. Malaria drug-sensitivity testing: assays, new perspectives. *Trends Parasitol.* 2003; 19(4):175-81.

Noedl H, Bronnert J, Yingyuen K, Attlmayr B, Kollaritsch H, Fukuda M. Simple histidine-rich protein 2 double-site sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for use in malaria drug sensitivity testing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(8):3575-7.

Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med.* 2008; 359(24):2619-20.

Noronha E, Alecrim MG, Romero GA, Macêdo V. RIII mefloquine resistance in children with falciparum malaria in Manaus, AM, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000; 33(2):201-5.

Nosten F, van Vugt M, Price RN, Luxemburger C, Thway KL, Brockman A, McGready R, ter Kulle F, Looareesuwan S, White NJ. Effects of artesunate-mefloquine combination on incidence of *Plasmodium falciparum* malaria and mefloquine resistance in western Thailand: a prospective study. *Lancet.* 2000; 356(9226):297-302.

Nzila A, Okombo J, Ohuma E, Al-Thukair A. Update on the *in vivo* tolerance and *in vitro* reduced susceptibility to the antimalarial lumefantrine. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67(10):2309-15.

Olliaro PL, Trigg PI. Status of antimalarial drugs under development. *Bull World Health Organ.* 1995; 73(5):565-71.

Olson MW, Ruzin A, Feyfant E, Rush TS 3rd, O'Connell J, Bradford PA. Functional, biophysical, and structural bases for antibacterial activity of tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(6):2156-66.

Page, CP, Curtis MJ, Sutter MC, et al. Infecções Parasitárias. In Farmacologia Integrada. São Paulo Manole. 1999; cap. 25:461-66. 670p.

Parker D, Lerdprom R, Srisatjarak W, Yan G, Sattabongkot J, Wood J, Sirichaisinthop J, Cui L. Longitudinal *in vitro* surveillance of *Plasmodium falciparum* sensitivity to common anti-malarials in Thailand between 1994 and 2010. Malar J. 2012; 11(1):290.

Peel SA. The ABC transporter genes of *Plasmodium falciparum* in drug resistance. Drug Resist Updat. 2001; 4(1):66-74.

Peters W, Richards WHG (editors). Antimalarial drugs. II. Current antimalarials and new drug developments. Springer-Verlag. 1984; 83-121, 520p.

Pickard AL, Wongsrichanalai C, Purfield A, Kamwendo D, Emery K, Zalewski C, Kawamoto F, Miller RS, Meshnick SR. Resistance to antimalarials in Southeast Asia and genetic polymorphisms in *pfmdr 1*. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(8): 2418-23.

Pradines B, Pistone T, Ezzedine K, Briolant S, Bertaux L, Receveur MC, Parzy D, Millet P, Rogier C, Malvy D. Quinine-resistant malaria in traveler returning from Senegal, 2007. Emerg Infect Dis. 2010; 16(3):546-8.

Rehwagen C. WHO ultimatum on artemisinin monotherapy is showing results. BMJ. 2006; 332(7551):1176.

Rieckmann KH, López-Antuñano FJ. Chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* in Brazil detected by a simple *in vitro* method. Bull World Health Organ. 1971; 45(2): 157-67.

Rieckmann KH, Campbell GH, Sax LJ, Mrema JE. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An *in vitro* microtechnique. Lancet. 1978; 1(8054):22-3.

Ringwald P, Bickii J, Basco LK. *In vitro* activity of antimalarials against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in Yaoundé, Cameroon. Am J Trop Med Hyg. 1996; 55(3):254-8.

Ringwald P, Basco LK. Comparison of *in vivo* and *in vitro* tests of resistance in patients treated with chloroquine in Yaoundé Cameroon. Bull World Health Organ. 1999; 77(1):34-43.

Rock EP, Marsh K, Saul AJ, Wellemes TE, Taylor DW, Maloy WL, Howard RJ. Comparative analysis of the *Plasmodium falciparum* histidine rich proteins HRP-I, HRP-II and HRP-III in malaria parasites of diverse origin. Parasitology. 1987; 95(2):209-27.

Rodríguez JCP, Uribe GÁ, Araújo RM, Narváez PC, Valencia SH. Epidemiology and control of malaria in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011; 106(Suppl. 1):114-22.

Sá IM. A resistência à cloroquina e a busca de antimaláricas entre as décadas de 1960 e 1980. Hist Cienc Saude Manguinhos. 2011; 18(2):407-30.

Sanchez BA, Mota MM, Sultan AA, Carvalho LH. *Plasmodium berghei* parasite transformed with green fluorescent protein for screening blood schizontocidal agents. Int J Parasitol. 2004; 34(4):485-90.

Santelli AC, Ribeiro I, Daher A, Boulos M, Marchesini PB, La Corte Dos Santos R, Lucena MB, Magalhães I, Leon AP, Junger W, Ladislau JL. Effect of artesunate-mefloquine fixed-dose combination in malaria transmission in amazon basin communities. Malar J. 2012; 11(1):286.

Starzengruber P, Thriemer K, Haque R, Khan WA, Fuehrer HP, Siedl A, [Hofecker V](#), [Ley B](#), [Wernsdorfer WH](#), [Noedl H](#). Antimalarial activity of tigecycline, a novel glycylicycline antibiotic. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(9):4040-2.

Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. Science. 2006; 313(5791): 1287-90.

Suwandittakul N, Chaijaroenkul W, Harnyuttankorn P, Mungthin M, Bangchang K. Drug resistance and *in vitro* susceptibility of *Plasmodium falciparum* in Thailand during 1988-2003. *Korean J Parasitol.* 2009; 47(2):139-44.

ter Kuile F, White NJ, Holloway PA, Pasvol G, Krishna S. *Plasmodium falciparum*: *in vitro* studies of the pharmacodynamic properties of antimalarials used for the treatment of severe malaria. *Exp Parasitol.* 1993; 76(1):85-95.

Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* 1976; 193(4254):673-5.

Trigg PI. Recent advances in malaria parasite cultivation and their application to studies on host-parasite relationship: a review. *Bull World Healthy Organ.* 1985; 63(2):387-98.

Triglia T, Menting JG, Wilson C, Cowman AF. Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94(25):13944-9.

Triglia T, Wang P, Sims PF, Hyde JE, Cowman AF. Allelic exchange at the endogenous genomic locus in *Plasmodium falciparum* proves the role of dihydropteroate synthase in sulfadoxine-resistance malaria. *Embo J.* 1998; 17(14):3807-15.

Tyner SD, Lon C, Se Y, Bethell D, Socheat D, Noedl H, et al. Ex vivo drug sensitivity profiles of *Plasmodium falciparum* field isolates from Cambodia and Thailand, 2005 to 2010, determined by a histidine-rich protein-2 assay. *Malar J.* 2012; 11:198.

Vanderberg J.P. *Plasmodium berghei*: quantitation of sporozoites injected by mosquitoes feeding on a rodent host. *Exp Parasitol.* 1977; 42(1):169-181.

von Seidlein L, Duraisingh MT, Drakeley CJ, Bailey R, Greenwood BM, Pinder M. Polymorphism of the *pfmdr1* gene and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* in the Gambia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997; 91(4):450-3.

Wellems TE, Plowe CV. Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis.* 2001; 184(6):770-6.

Wernsdorfer WH. Epidemiology of drug resistance in malaria. *Acta Trop.* 1994; 56(2-3):143-56.

White NJ, Pongtavornpinyo W. The de novo selection of drug-resistant malaria parasites. *Proc Biol Sci.* 2003; 270(1514):545-54.

WHO. World Health Organization., Practical chemotherapy of malaria. WHO Tech Rep Ser. 1990; 805:1-141.

WHO. World Health Organization. The use of antimalarial drugs. Report of an informal consultation. Geneva 2001, 141p.

WHO. World Health Organization. Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated falciparum malaria. Geneva, 2003, 67p.

WHO. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. Geneva 1st ed. 2006, 266p.

WHO. World Health Organization. Global Report on antimalarial drug efficacy and drug resistance 2000-2010. Geneva 2010a, 121p.

WHO. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria, 2010b; 2:18-9.

WHO. World Health Organization. Q&A on malaria mortality estimates. Feb 2012.

Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2(4):209-18.

Yayon A, Cabantchik ZI, Ginsburg H. Susceptibility of human malaria parasites to chloroquine is pH dependent. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985; 82(9), 2784-8.

## **8. ANEXOS**

## **Apêndice 1 – Termo de Consentimento livre e esclarecido**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:**

## Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

