

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Variação de Número de Cópias em Genes Relacionados à Resistência aos
Antimaláricos em Isolados de *Plasmodium* spp. do Brasil**

por

Gabriel Luíz Costa

Belo Horizonte

2017

Gabriel Luíz Costa

**Variação de Número de Cópias em Genes Relacionados à Resistência aos
Antimaláricos em Isolados de *Plasmodium* spp. do Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular

Orientação: Dra. Taís Nóbrega de Sousa
Coorientação: Dra. Cristiana F. Alves de Brito

Belo Horizonte

2017

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

C837v Costa, Gabriel Luíz.
2017

Variação de Número de Cópias em Genes Relacionados à Resistência aos Antimaláricos em Isolados de *Plasmodium* spp. do Brasil / Gabriel Luíz Costa. – Belo Horizonte, 2017.

xiii, 50 f.: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 46 - 63

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

1. Malária/quimioterapia 2. *Plasmodium*/efeitos de drogas 3. Resistência a Medicamentos/efeitos de drogas I. Título. II. Sousa, Taís Nóbrega de (Orientação). III. Brito, Cristiana Ferreira Alves de (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936 2

GABRIEL LUÍZ COSTA

**Variação de Número de Cópias em Genes Relacionados à Resistência aos
Antimaláricos em Isolados de *Plasmodium* spp. do Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Taís Nóbrega de Sousa (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente

Prof. Dr. Rubens Lima do Monte Neto (CPqRR/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dra. Patrícia Flávia Quaresma (UFSJ) Titular

Prof. Dr. Nilton Barnabé Rodrigues (CPqRR/FIOCRUZ) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 17/02/2017

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, por acreditarem em meus sonhos
e me ajudarem a torna-los reais.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por mostrar o caminho a ser seguido e ter descortinado os segredos de meus propósitos nesta vida. Do mesmo modo à doutrina Espírita, por ter ajudado em minha evolução pessoal e espiritual.

Aos meus amados pais André e Heliane, por terem gasto seu tempo e suas economias de uma vida toda em minha educação e ter proporcionado a realização dos meus sonhos.

À minha orientadora Dra. Taís Nóbrega de Sousa, por ter me dado esta oportunidade que me definiu como profissional, ter acreditado e ainda acreditar no meu potencial, sempre me estimulando a ir um passo à frente.

À minha coorientadora Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito, por ter contribuído da mesma maneira para meu crescimento intelectual e sempre estar disponível quando necessário.

Ao Dr. Cór Fontes pela colaboração, sem a qual seria impossível a realização desse trabalho.

À plataforma de PCR em tempo real (PDTIS/FIOCRUZ), em especial à Fernanda Barbosa por ter me auxiliado inúmeras vezes em meus experimentos e dúvidas sobre a técnica.

A todos do laboratório de malária; à Dra. Luzia Helena por ter me recebido e pelas sugestões em vários momentos, aos técnicos que nos auxiliam em nossas atividades, às minhas irmãs científicas Camila, Marina, Aracele, Lara, Denise, Ana Luiza, Ana Carolina e Sarah por todos os momentos que passamos juntos e por fazerem as dificuldades de todos esses anos serem menos pesadas. Minha companheira Laise pelo amor dado que serve de impulso em meu caminho. Agradeço aos demais membros do laboratório pela convivência e por toda aprendizagem que passamos juntos. Sem essa equipe meu crescimento seria incompleto.

Aos meus amigos e minha família, que mesmo indiretamente contribuíram enormemente para minha formação e me deram forças e motivação para seguir nesta carreira.

Ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou pelo oferecimento do curso de mestrado com ênfase em Biologia Molecular e Celular.

A todas as agências de fomento pelo apoio financeiro: CAPES, FAPEMIG, CNPq e FIOCRUZ.

RESUMO

Um dos maiores desafios do controle da malária é a resistência do parasito aos antimaláricos. A biologia molecular tem permitido a compreensão desse fenótipo com o estudo de marcadores associados a ela, tais como o Polimorfismo de Base Única (SNP) e o Polimorfismo de Variação de Número de Cópias Gênicas (CNV). Alterações gênicas atribuídas ao CNV podem levar a alterações fenotípicas no parasito, conferindo resistência ou suscetibilidade aos antimaláricos. Sua presença foi relacionada com a falha terapêutica a drogas como cloroquina (CQ) e mefloquina (MQ) em diversas regiões do mundo. Os genes *pfmdr1* e *pfgch1* de *P. falciparum* e *pvmdr1* de *P. vivax* são relacionados com resistência a diferentes fármacos. Entretanto, no Brasil poucos estudos caracterizaram esses genes quanto à presença de CNVs, sendo que sua maioria investigou a diversidade genética associada aos SNPs. O objetivo deste estudo foi investigar a presença de CNV nos genes *pfmdr1* e *pfgch1* de *P. falciparum* e *pvmdr1* e *pvcr-t-o* de *P. vivax*, assim como SNPs nos genes *pfcr-t* e *pfmdr1* de *P. falciparum*. O CNV foi determinado por qPCR utilizando sondas de hidrólise e os SNPs por PCR-RFLP. As amostras foram coletadas entre 2002 a 2012, em 3 diferentes estados brasileiros – Mato Grosso (n=31), Rondônia (n=27) e Amapá (n=10). As 31 amostras analisadas de *P. falciparum* apresentaram cópia única para *pfmdr1* e *pfgch1*, apesar do histórico de resistência do parasito a vários antimaláricos utilizados ao longo do tempo no Brasil. Entretanto, um importante SNP em *pfcr-t* (K76T), relacionado com resistência à CQ, foi identificado em todas as amostras analisadas. Nesse estudo, também foram analisados 38 isolados de *P. vivax*, sendo reportado a amplificação gênica em 7 (18%) amostras para *pvmdr1*. No sudoeste asiático altas taxas de CNV em *pvmdr1* foram reportadas (38%), sendo relatado por um único estudo no Brasil (0,9% de amplificação). Um resultado importante desse estudo foi a observação, pela primeira vez, da amplificação de *pvcr-t-o*. Embora estudos anteriores o associem com resistência e casos graves da doença, nenhum avaliou a presença de CNV em *pvcr-t-o*. Este estudo é um dos primeiros a avaliar a presença de CNV nos genes *pvmdr1*, *pvcr-t-o* e *pfgch1* no Brasil, assim como estudar a distribuição de CNV no mundo através de uma revisão sistemática.

Palavras-chave: malária; *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, resistência às drogas; variação do número de cópias gênicas

ABSTRACT

One of the greatest challenges on malaria control is the parasite resistance to antimalarials. Molecular genotyping aims to identify and to monitor genetic markers related to parasite resistance, as single nucleotide polymorphisms (SNP) and copy number variation (CNV). Genetic alterations related to CNV could lead to phenotypic alterations in parasite, conferring resistance or susceptibility to antimalarials. The presence of CNV was identified e related with therapeutic failure to drugs like chloroquine and mefloquine in different regions of the world. The *mdr1* and *gch1* genes of *P. falciparum* and *mdr1* of *P. vivax* are related with resistance, however in Brazil few studies have characterized these genes in relation to CNV, being more associated with SNPs. The objective of this project was investigate the presence of CNV in *pfmdr1* and *pfgch1* genes and *pvmdr1* and *pvcrt-o*, as well as evaluate SNP on *mdr1* and *crt* genes of *P. falciparum*. The CNV was estimated by qPCR using the *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) system and SNPs was assessed by RFLP-PCR. The samples comprise a period between 2002 to 2012 from 3 different areas of Brazil – Mato Grosso (n=31), Rondônia (n=27) and Amapá (n=10). All 31 samples analyzed to *P. falciparum* showed no amplification to *mdr1* and *gch1* genes. However, an important SNP on *crt* gene (K76T), related to chloroquine resistance, was observed. Despite the resistance history in Brazil, in this study the CNV was not present on the *P. falciparum* genes. To the 38 *P. vivax* isolates, amplification was observed in 7 samples to *mdr1* gene e 1 to *crt-o*. The change on the therapeutic scheme could be related to the reversion of the genetic amplification genotype, with the withdrawal of drug with historic of resistance, as chloroquine. High rates of CNV are observed in Southeast Asia countries (reaching 38%), but in Brazil just one study reported a low rate of amplification (0,9%). For the first time, the presence of CNV on *pvcrt-o* was reported in Brazilian samples. Other studies have associated this gene with resistance and severe cases, but none evaluated the association of CNV and this outcome. This study is one of the first to evaluate CNV on *pvmdr1*, *pvcrt-o* and *pfgch1* in Brazil, as well as to evaluate the CNV distribution in the world through a systematic review.

Keywords: malaria; *Plasmodium vivax*; *Plasmodium falciparum*; drug resistance; copy number variation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2014.....	14
Figura 2. Distribuição das espécies de <i>Plasmodium</i> no mundo.....	14
Figura 3. Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	16
Figura 4. Data da introdução das drogas antimaláricas e da observação e relato da resistência.....	18
Figura 5. Via <i>de novo</i> do folato de <i>P. falciparum</i>	20
Figura 6. Desenho esquemático da proteína PfCRT.....	22
Figura 7. Topologia e função de PfMDR1.....	23
Figura 8. Perfil de CNV para os genes <i>pfmdr1</i> e <i>pfgch1</i>	32
Figura 9. Digestão das amostras por PCR-RFLP para os genes <i>pfcr1</i> e <i>pfmdr1</i>	33
Figura 10. Resultado da quantificação de CNV para o gene <i>pvmdr1</i> e <i>pvcr1-o</i>	34
Figura 11. Distribuição dos estudos relatando CNV em <i>P. falciparum</i>	36
Figura 12. Distribuição dos estudos relatando CNV em <i>P. vivax</i>	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pacientes incluídos no estudo de acordo com o estado de origem e período.....	29
Tabela 2. Sequência dos iniciadores e sonda para o gene <i>pvcr1-o</i>	29
Tabela 3. Perfil de clivagem dos genes <i>pfmdr1</i> e <i>pfcr1</i> da PCR-RFLP.....	30
Tabela 4. Concentrações para a padronização da qPCR para o gene <i>pvcr1-o</i>	31
Tabela 5. Relação dos artigos obtidos por banco de dados.....	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AB	Applied Biosystems
ACT	Tratamento baseado em derivados da artemisinina
AQ	Amodiaquina
ART	Artemisinina
AS	Artesunato
ATP	Adenosina trifosfato
CNV	<i>Copy Number Variation</i>
DHFR	<i>Dihydropteroate reductase</i>
DHPS	<i>Dihydropteroate synthase</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HF	Halofantrina
<i>Mdr1</i>	<i>Multidrug resistance</i>
MQ	Mefloquina
CQ	Cloroquina
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-americana de Saúde
<i>Pfcr1</i>	<i>Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter</i>
<i>Pfdhfr</i>	<i>Plasmodium falciparum dihydropteroate reductase</i>
<i>Pfdhps</i>	<i>Plasmodium falciparum dihydropteroate synthase</i>
<i>Pfgch1</i>	<i>Plasmodium falciparum GTP-cyclohydrolase 1</i>
<i>Pfmdr1</i>	<i>Plasmodium falciparum multidrug-resistance 1 gene</i>
<i>Pvcrt-o</i>	<i>Plasmodium vivax chloroquine resistance transporter orthologue</i>
<i>Pvmdr1</i>	<i>Plasmodium vivax multidrug-resistance 1 gene</i>
Pgh1	P-glicoproteína 1
PQ	Primaquina
QN	Quinina
qPCR	PCR quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP	Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismos por restrição de fragmentos

SF	Sulfadoxina-pirimetamina
SNP	Polimorfismos de Base Única
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 Introdução.....	14
1.1 Aspectos gerais da malária.....	14
1.2 Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i>	15
1.3 Tratamento e resistência aos antimaláricos.....	17
1.4 Modo de ação das drogas antimaláricas.....	19
1.5 Mediadores da resistência aos antimaláricos.....	22
1.6 Marcadores moleculares de parasitos resistentes aos antimaláricos.....	26
2 Justificativa.....	28
3 Objetivos	28
3.1 Objetivos específicos.....	28
4 Metodologia.....	29
4.1 Pacientes e obtenção de amostras.....	29
4.2 Estimativa do número de cópias dos genes de <i>Plasmodium</i> spp.....	29
4.3 Detecção de Polimorfismo de Base Única nos genes <i>pfmdr1</i> e <i>pfcr1</i>	31
4.4 Revisão sistemática da literatura.....	31
5 Resultados.....	32
5.1 Padronização da PCR em tempo real para o gene <i>pvcr1-o</i>	32
5.2 Estimativa de Variação de Número de Cópias em <i>pfmdr1</i> e <i>pfgh1</i>	32
5.3 Análise de Polimorfismo de Base Única em <i>pfcr1</i> e <i>pfmdr1</i>	33
5.4 Variação do Número de Cópias em <i>pvmdr1</i> e <i>pvcr1-o</i>	34
5.5 Variação do Número de Cópias em <i>Plasmodium</i> spp.: revisão sistemática da literatura.....	35
6 Discussão.....	39
7 Conclusão.....	45
Referências.....	46

1 Introdução

1.1 Aspectos gerais da malária

Conhecida como a doença parasitária de maior letalidade, a malária é prevalente em diversas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2015 aproximadamente 3,2 bilhões de pessoas estavam sob o risco de infecção em 97 países e territórios (WHO, 2015). A malária é causada por parasitos do gênero *Plasmodium*, sendo cinco espécies causadoras da doença no humano: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*, transmitidos pela picada da fêmea do mosquito vetor do gênero *Anopheles* spp. (WHO, 2015).

No Brasil, as espécies endêmicas são *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, ocorrendo principalmente na Região da Amazônia Legal. Essa região é composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (Figura 1) (SVS/MS, 2015). Porém, um processo de migração de pessoas a partir região Amazônica e de outros países endêmicos para regiões extra-amazônicas é um dos principais fatores responsáveis pela ocorrência da doença também nessas áreas (Lorenz et al., 2015).

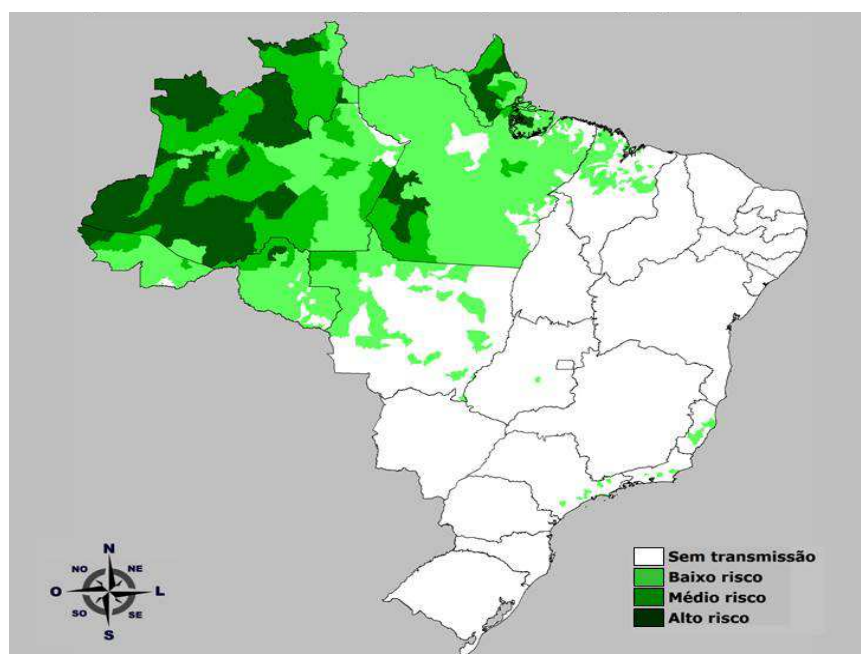


Figura 1: Mapa de risco de infecção da malária por município, Brasil, 2014. Sinan/SVS/MS e Sivep-Malária/SVS/MS

Plasmodium falciparum é a espécie mais prevalente no continente Africano e é responsável por grande parte dos casos graves e óbitos de malária, enquanto *P. vivax* possui a maior distribuição geográfica fora deste continente (Figura 2). No Brasil, *P. vivax* é responsável por 85% dos casos notificados de malária e *P. falciparum* por 15% do número total de casos notificados em 2012 (SVS/MS, 2015). Embora por longo tempo tenha sido considerada uma doença benigna e, por isso, negligenciada, nos últimos anos o número de relatos de casos graves causados por *P. vivax* têm aumentado em diferentes áreas endêmicas no mundo, inclusive no Brasil (Anstey et al., 2009; Fernández-Becerra et al., 2009; Genton et al., 2008; Melo et al., 2014; Tjitra et al., 2008).

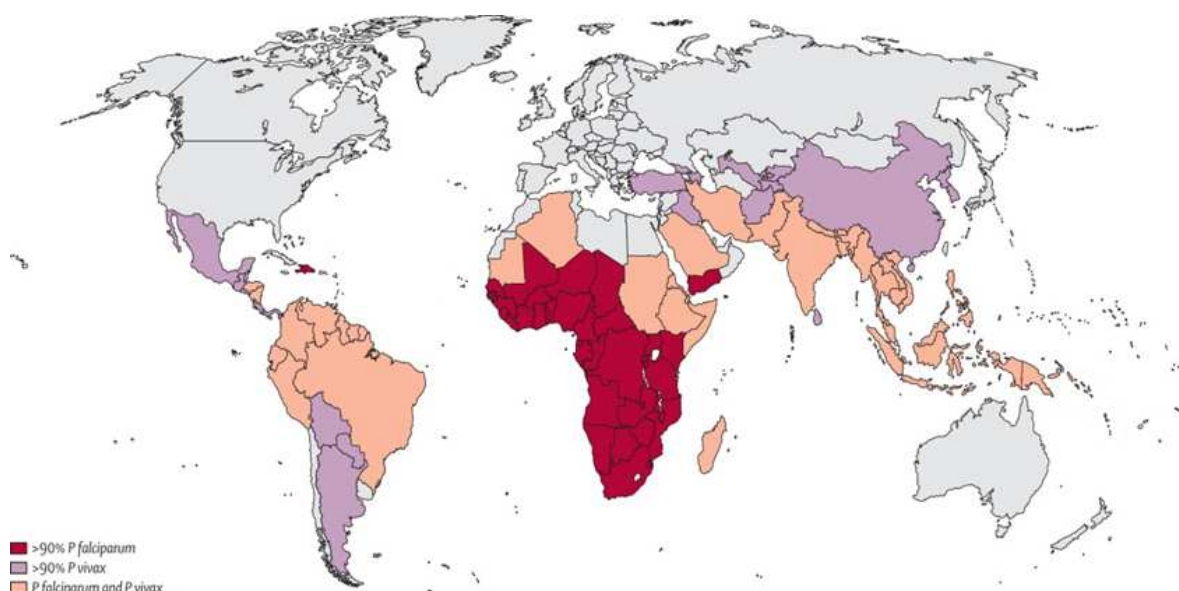


Figura 2: Distribuição das espécies *P. falciparum* e *P. vivax* no mundo. Feachem et al., 2010.

1.2 Ciclo biológico do *Plasmodium*

O ciclo biológico do *Plasmodium* inicia-se pela inoculação de esporozoítos na pele durante a picada do mosquito vetor (Figura 3). Recentemente foi descoberto que aproximadamente 50% destes esporozoítos podem permanecer na pele do hospedeiro (Menard et al., 2013) e cerca de 10% podem se desenvolver na epiderme, derme e folículos pilosos, podendo sobreviver durante semanas (Gueirard et al., 2010). Antes destas descobertas, pensava-se que estas formas atingiam os vasos sanguíneos ou linfáticos a partir do local da picada e migravam para o fígado. Neste órgão, ocorre uma migração através de várias células, processo importante para seu ciclo de vida, tornando o parasito mais apto à

invasão. Nesse processo, o vacúolo parasitóforo é formado, onde o parasito se desenvolve antes de invadirem os hepatócitos, nos quais irão se diferenciar (Mota et al., 2001). Após o desenvolvimento intra-hepático por esquizogonia, ocorre a liberação de merozoítos capazes de infectar eritrócitos maduros, ou sua forma jovem, o reticulócito. Esses merozoítos são liberados diretamente na corrente sanguínea no interior de vesículas denominadas merossomos (Sturm et al., 2006).

A invasão dos eritrócitos começa pelo reconhecimento e ligação dos merozoítos a essas células. No vacúolo parasitóforo, o parasito passa pelas fases de anel, trofozoíto e esquizonte. A partir dos esquizontes, novos merozoítos são formados e liberados com a lise dos eritrócitos, e em seguida infectando novas células (Bannister and Mitchell, 2003). Alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos masculino e feminino, que ao serem ingeridos pelo mosquito vetor durante o repasto sanguíneo, se diferenciam nos gametas masculino e feminino. Uma vez no intestino do mosquito, o parasito passa por uma série de transformações, culminando no desenvolvimento dos esporozoítos, que ao invadirem as glândulas salivares, poderão ser inoculados em outro hospedeiro (Mueller et al., 2009).

Plasmodium vivax possui características particulares em seu ciclo de vida que o difere das demais espécies: (1) o aparecimento precoce de gametócitos na circulação sanguínea, tornando a transmissão possível antes mesmo do aparecimento dos sintomas clínicos (White, 2017); (2) baixas parasitemias e infecções assintomáticas favorecendo um grande número de reservatórios do parasito (Imwong et al., 2016); (3) a capacidade de desenvolver formas latentes no fígado, chamadas de hipnozoítos, que permanecem dormentes por intervalo de tempo variável e podem levar a recaídas da doença (Mueller et al., 2009); e (4) preferência dos merozoítos pela invasão dos reticulócitos (Galinski et al., 1992).

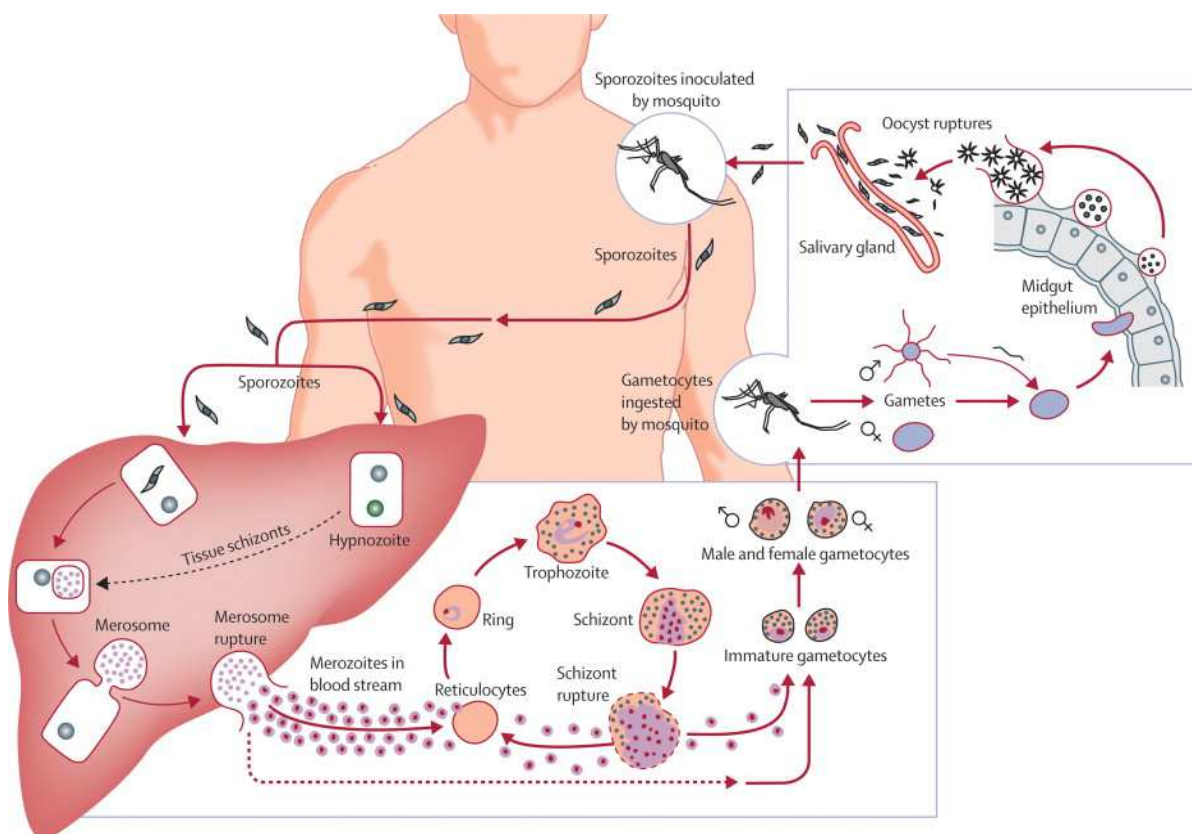


Figura 3: Ciclo de vida do *Plasmodium* spp. Adaptado de Mueller et al., 2009.

1.3 Tratamento e Resistência aos antimaláricos

Como ainda não existe uma vacina para prevenção da malária, seu tratamento e profilaxia são feitos por meio de drogas antimaláricas. Entretanto, um dos maiores desafios no controle da doença é o desenvolvimento da resistência pelo *Plasmodium* às diferentes classes de drogas disponíveis para o tratamento (Figura 4). Atualmente, este é um problema em praticamente todas as áreas endêmicas ao redor do mundo.

A primeira droga antimalárica a ser usada foi a quinina (QN) durante o século XVIII, introduzida na Europa pelos jesuítas, tornando-se a droga de uso para o tratamento de doenças febris (Foley and Tilley, 1998). Posteriormente, a primaquina (PQ) e cloroquina (CQ) foram utilizadas nos períodos da Primeira e Segunda Guerra Mundiais, respectivamente. A CQ foi amplamente utilizada durante os anos 1950 em todo o mundo, na campanha da Erradicação da Malária empregada pela OMS (Hay et al., 2004).

A primeira menção sobre a resistência à QN surgiu em 1910 no jornal *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* (Neiva, 1910), enquanto a resistência à CQ começou a ser relatada na Ásia nos anos 1950 (Harinasuta et al., 1965). Nas décadas seguintes, estes relatos se estenderam ao continente Africano e Americano (Ambroise-Thomas and Rossignol, 1986; Moore and Lanier, 1961). Com a disseminação da resistência à CQ, a sulfadoxina-pirimetamina (SP) passou a ser utilizada como primeira linha de tratamento em diversas regiões endêmicas. Entretanto a resistência à essa droga foi relatada poucos anos depois de seu emprego (Travassos and Laufer, 2009). Nos anos 1980, a droga mefloquina (MQ) passou a ser utilizada para o tratamento da malária, mas semelhante às outras drogas, a resistência apareceu rapidamente (Severini and Menegon, 2015). O tratamento baseado em derivados da artemisinina (ACT), especificamente a combinação de MQ com artemeter (ART), começou a ser usado nos anos 1990 (Looareesuwan et al., 1992) e teve grande impacto na redução dos casos de *P. falciparum* (Nosten et al., 2000; Price et al., 1996). Embora uma redução *in vitro* da sensibilidade à droga e um aumento na persistência da parasitemia tenham sido reportados na Guiana Francesa, Senegal e sudeste asiático (Das et al., 2009; Gama et al., 2011; Jambou et al., 2005; Phyo et al., 2012), a terapia com ACT continua sendo o tratamento mais efetivo para malária não grave.

No Brasil, vários estudos já reportaram resistência de *P. falciparum* à CQ, SP, MQ, QN e amodiaquina (AQ) (De Souza, 1992; de Souza, 1983; Noronha et al., 2000; Zalis et al., 1998). No final da década de 1980 registraram-se níveis tão elevados quanto 90% e 100% de falha no tratamento com SP e CQ, respectivamente (De Souza, 1992; Zalis et al., 1998). Atualmente, a OMS preconiza a utilização do ACT para o tratamento de malária não complicada por *P. falciparum*. Até o momento, não houve registro de falha no tratamento utilizando estas combinações de drogas no Brasil (Gama et al., 2011).

O primeiro relato de resistência de *P. vivax* à CQ surgiu no final dos anos 1990 na Indonésia e Papua Nova Guiné (Baird et al., 1991; Rieckmann et al., 1989). No Brasil, os primeiros casos de resistência de *P. vivax* à CQ e PQ foram descritos na década de 1990 em Manaus (Alecrim et al., 1999; Brasil et al., 1999). Nesta mesma região, estudos mais recentes têm reportado uma taxa de até 10% de falha terapêutica por CQ (de Santana Filho et al., 2007; Chehuan et al., 2013;

Marques et al., 2014). Por sua vez, um segundo estudo realizado fora da área de transmissão de malária demonstrou uma elevada taxa de resistência (24,5%) de *P. vivax* à PQ (Boulos et al., 1991). Diversos fatores dificultam o estudo molecular em *P. vivax* como a dificuldade de se estabelecer um protocolo efetivo e reprodutível de cultura *in vitro* contínuo (Gonçalves et al., 2014) e a possibilidade de recidiva devido aos hipnozoítos (recaída). Desta forma, define-se a recidiva devido à falha no tratamento (recrudescência) quando há parasitos na corrente sanguínea durante os primeiros 28 dias após o início do tratamento com CQ (Baird et al., 1997). Neste período, quando a droga está presente em níveis terapêuticos, nenhum parasito deve ser encontrado na corrente sanguínea. A fim de se descartar a possibilidade de falha terapêutica, a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) recomenda a dosagem dentro de um período de 28 dias dos níveis plasmáticos da cloroquina e de seu metabólito ativo, a desetilcloroquina (OPAS).

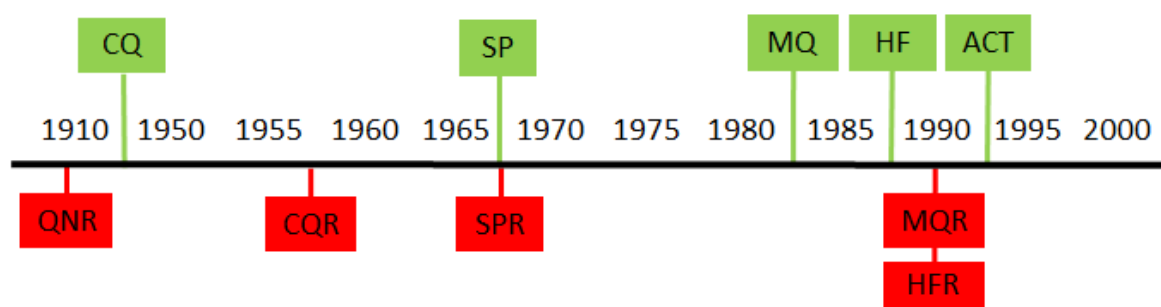


Figura 4. Esquema indicando o período aproximado de introdução das drogas antimaláricas (caixas em verde) e de notificação da resistência aos antimaláricos (caixas em vermelho). QNR, resistência à quinina; CQ, cloroquina; CQR, resistência à cloroquina; SP, sulfadoxina-pirimetamina; SPR, resistência à sulfadoxina-pirimetamina; MQ, mefloquina; HF, Halofantrina; MQR, resistência à mefloquina; HFR, resistência à Halofantrina; ACT, terapia baseada em derivados de artemisinina.

1.4 Modo de ação das drogas antimaláricas

Classe das quinolonas

Essa classe inclui os antimaláricos mais comuns: tipo 1 (as 4-aminoquinolona cloroquina e amodiaquina) e tipo 2 (as arilaminas álcool QN, MF e halofantrina) (Olliaro, 2001). As drogas do tipo 1 são bases fracas, desprotonadas e hidrofílicas em pH neutro, enquanto as do tipo 2 são bases ainda mais fracas e lipossolúveis em pH neutro (Warhurst, 1987). Apesar de não totalmente compreendidos, alguns mecanismos de ação para estas classes são propostos. Alguns deles são: inibição da síntese proteica (Surolia and Padmanaban, 1991), inibição da síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA)

(Meshnick, 1990) e inibição da proteinase aspártica (Vancer Jagt et al., 1986). Entretanto, para que estas drogas apresentassem tais mecanismos seriam necessárias altas concentrações das mesmas no organismo humano. No vacúolo parasitóforo é realizada a degradação da hemoglobina onde o grupo heme, o qual é tóxico para o parasito, é convertido em um produto não tóxico chamado hemozoína (Jani et al., 2008). O mecanismo de ação mais aceito é a interferência no metabolismo do grupo heme, já demonstrada em diferentes estudos (Bray et al., 1998; Mungthin et al., 1998), resultando na produção de compostos altamente tóxicos. Em pH neutro, a CQ se difunde através de diversas membranas, entretanto em pH ácido (por exemplo, no vacúolo digestivo) ela se torna impermeável, se acumulando nesta organela (Ginsburg and Geary, 1987).

Classe dos antifolatos

Esta classe resulta na inibição das enzimas da via do folato, reduzindo a síntese de bases pirimidínicas, e, conseqüentemente, a produção de DNA. Além disso, os antifolatos interferem na formação dos aminoácidos serina e metionina (Olliaro, 2001). A droga pirimetamina afeta a atividade da enzima diidrofolato redutase de *P. falciparum* (*pfdhfr*), enquanto a sulfadoxina impede a atividade da diidropeteroato sintase (*pfdhps*) (Figura 5) (Severini and Menegon, 2015). O desenvolvimento da resistência resultou do acúmulo de polimorfismos nestes genes, diminuindo a afinidade das drogas pelos seus alvos e levando a altos índices de falha terapêutica pelo parasito *in vivo* na Ásia, América do sul e África (Heinberg and Kirkman, 2015).

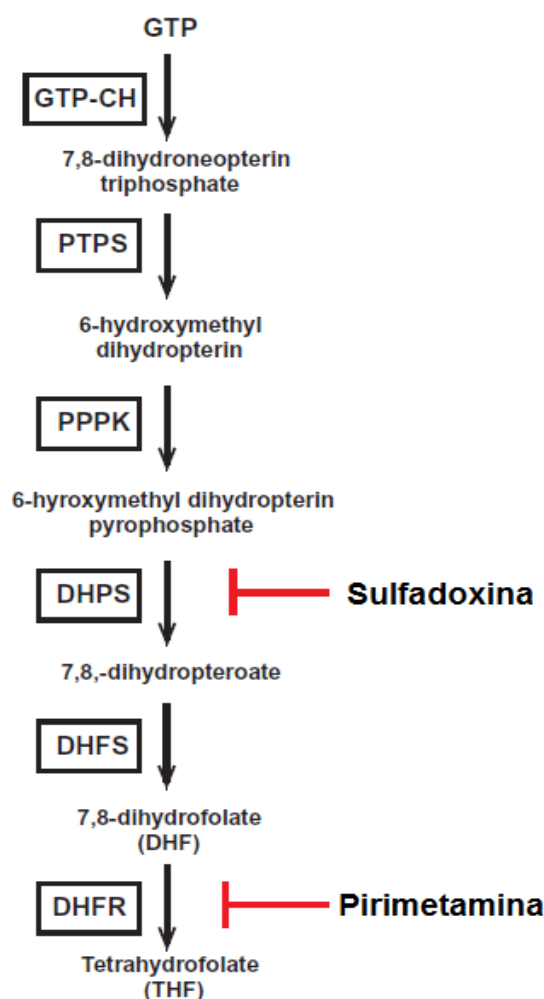


Figura 5. Via de novo do folato de *P. falciparum*. GTP-ciclohidrolase é a primeira enzima desta via. As demais enzimas estão indicadas nas caixas pretas, seguidas de seus respectivos substratos. As setas vermelhas indicam os inibidores da via do folato. Adaptado de Heinberg et al., 2013.

Classe dos derivados de artemisinina (ART)

Os compostos derivados de ART podem ser extratos naturais da planta *Artemisia annua* (Alesaeidi and Miraj, 2016) ou compostos sintéticos como a dihidroartemisinina, artesunato (AS), artemeter e arteeter (Olliaro, 2001). Estes compostos conseguem reduzir maiores taxas de parasitemias por ciclo do que as demais classes de antimaláricos e são utilizadas para casos de malária grave e não complicada (White, 1997). Porém, por possuírem um tempo de meia-vida curto, é recomendado seu uso em combinação com drogas com tempo de meia-vida longo para garantir sua eficácia (WHO, 2001). Seu mecanismo de ação não é compreendido totalmente, mas a hipótese mais aceita é que a ponte endoperoxídica, comum aos derivados da artemisinina, é reduzida pelo grupo heme ou pelo ferro iônico ou a protonação da ponte endoperoxídica levará a produção de radicais livres de oxigênio, levando à morte do parasito (Bray et al.,

2005; Olliaro et al., 2001). Porém, alguns estudos mostram que somente esta ponte endoperoxídica não é suficiente para a atividade antimalárica (Golenser et al., 2006; White, 2008), sendo outros mecanismos de ação também propostos, como a despolarização da membrana mitocondrial (Krishna et al., 2006) e inibição da enzima retículo-endoplasmático Ca^{2+} ATPase, codificado pelo gene *pfatp6* (Eckstein-Ludwig et al., 2003).

1.5 Mediadores da resistência aos antimaláricos

PfCRT* – Transportador de resistência à cloroquina de *Plasmodium falciparum

Esta proteína possui 45 kDa, compreendendo 10 domínios transmembrana inseridos na membrana do vacúolo digestivo (Cooper et al., 2002). O vacúolo digestivo é alvo de diversos antimaláricos, como a CQ e QN (Figura 6) (Fitch, 2004). Uma menor concentração de CQ é encontrada no vacúolo digestivo de parasitos resistentes quando comparados àqueles sensíveis. Portanto, aparentemente este transportador reduz a quantidade de droga localizada na organela (Cabrera et al., 2009). Uma vez que os polimorfismos encontrados em *PfCRT* estão associados com a redução do acúmulo de CQ, é levantada a hipótese de que a proteína mutada regule o acesso da CQ ao seu alvo (Bray et al., 1998).

O *PfCRT* foi identificado a partir da análise de um cruzamento genético entre um clone resistente de *P. falciparum* e outro sensível à CQ. No estudo de Fidock et al. (2000), a presença de diversos polimorfismos (Figura 6) foi associada com o aumento da acidificação do vacúolo parasitóforo, refletindo uma alteração no fluxo de CQ ou redução de sua ligação com o grupo heme. Além disso, a comparação da sequência de *PfCRT* de isolados sensíveis e resistentes evidenciou a presença de tais polimorfismos nos isolados resistentes (Fidock et al., 2000). Posteriormente, o papel deste gene na resistência à CQ foi confirmado através de experimentos onde o alelo selvagem foi substituído pelo alelo mutado, conferindo o fenótipo de resistência (Sidhu et al., 2002). Uma substituição de treonina pela lisina na posição 76 parece ter importante papel na resistência à CQ, sendo conservada em diferentes isolados com este fenótipo. Tais resultados são consistentes tanto em análises *in vitro*, quanto em achados *in vivo*, permitindo que este polimorfismo seja um bom marcador molecular de resistência à CQ (Hyde, 2005; Wongsrichanalai et al., 2002).

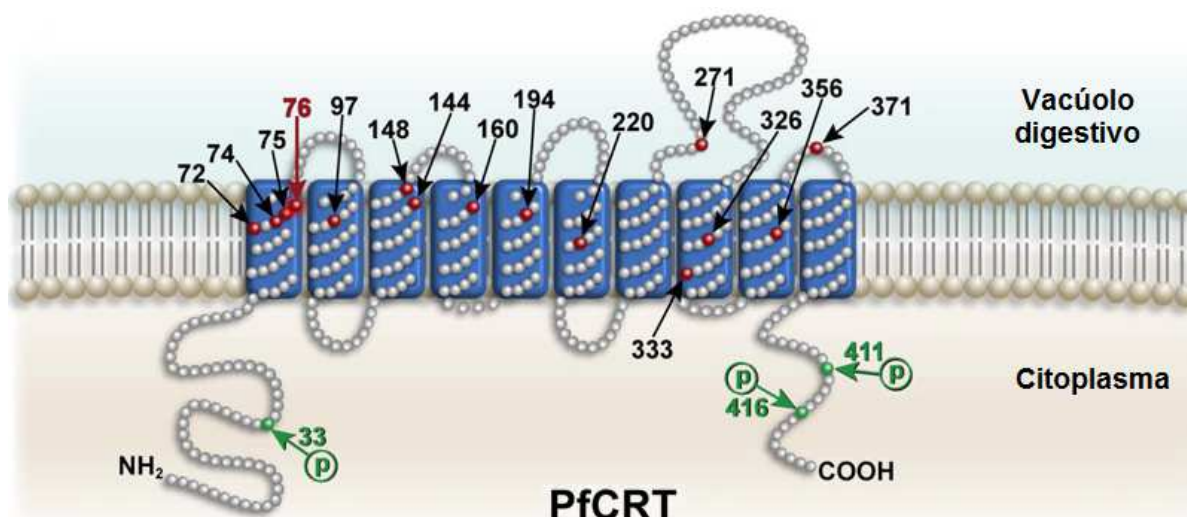


Figura 6. Topologia de *PfCRT*. As setas pretas indicam aminoácidos polimórficos. A substituição de lisina para treonina na posição 76, conservada em parasitos resistentes à CQ, está indicada pela seta em vermelho. Os resíduos que podem ser fosforilados são indicados em verde. Adaptado de Sanchez et al., 2010.

Pfmdr1* – Gene da multirresistência em *Plasmodium falciparum

A resistência a múltiplas drogas é um fenótipo comum em células cancerígenas e frequentemente associada à uma proteína chamada P-glicoproteína, codificada pelo gene *mdr1* (*multidrug resistance 1*). A P-glicoproteína é um transportador da família ABC, capaz de transportar diferentes classes de drogas (Higgins, 2007). As similaridades entre a multirresistência das células cancerígenas com a resistência à CQ em *P. falciparum* levaram ao estudo de seu homólogo, a P-glicoproteína 1 (Pgh-1) (Foote et al., 1989). Esta proteína possui 162 kDa e está localizada na membrana do vacúolo digestivo (Duraisingh and Cowman, 2005).

Polimorfismos nos aminoácidos 86, 184, 1034, 1042 e 1246 podem alterar a susceptibilidade *in vitro* a diversos antimaláricos como QN, HF, MQ e artemisinina (ART) (Figura 7) (Pickard et al., 2003; Reed et al., 2000; Sidhu et al., 2005). As substituições de asparagina para ácido aspártico na posição 1042 e asparagina para tirosina na posição 86 têm um papel fundamental na resistência à QN e CQ, respectivamente (Duraisingh and Cowman, 2005; Sidhu et al., 2005). Diversos estudos mostraram que a Pgh-1 funciona como uma bomba de efluxo, transportando substâncias do citoplasma para o vacúolo digestivo (Higgins, 2007; Karcz et al., 1993; Rohrbach et al., 2006; van Es et al., 1994). Desse modo, se o alvo de determinado antimalárico, como CQ e QN, está presente no vacúolo

digestivo, um menor efluxo pela Pgh-1 é vantajosa para o parasito (Fitch, 2004). De forma similar, se o alvo se encontra no citoplasma, o transporte destas drogas para um compartimento onde elas não serão prejudiciais ao parasito é igualmente vantajoso (Eckstein-Ludwig et al., 2003; Rubio and Cowman, 1996).

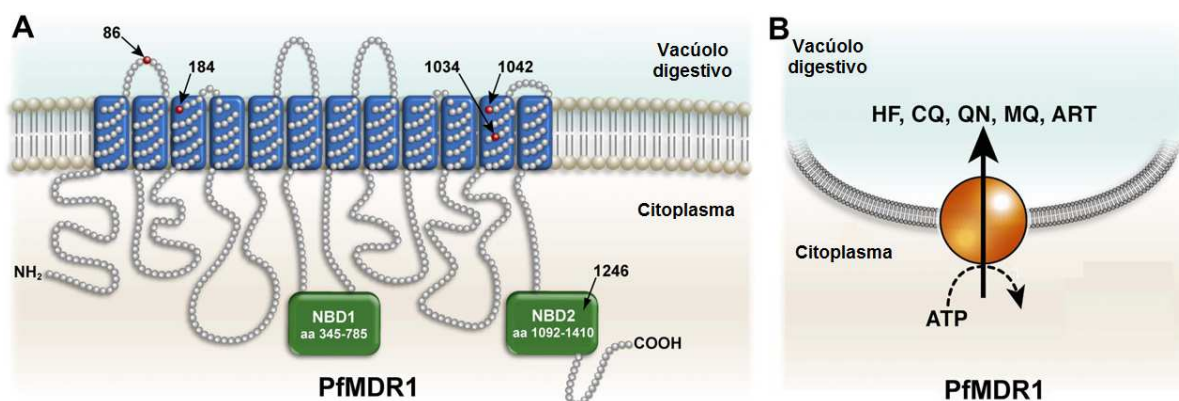


Figura 7. Topologia e função de *PfMDR1*. (A) As setas pretas indicam posições de aminoácidos polimórficos (destacados em vermelho) associadas com a alteração da resposta a diferentes antimaláricos. NBD, domínio de ligação a nucleotídeos. (B) A Pgh-1 parece atuar como bomba de efluxo de diversos antimaláricos para dentro do vacúolo digestivo. Adaptado de Sanchez et al., 2010.

Pfgch1* – GTP-ciclohidrolase 1 de *Plasmodium falciparum

O gene *pfgch1* codifica a primeira enzima da via do folato, tendo grande importância na síntese de ácidos nucleicos (Dittrich et al., 2008; Kapatos et al., 1999). As drogas antifolato têm como alvo duas enzimas desta mesma via, DHPS (diidropeteroato sintase) e DHFR (diidrofolato redutase), agindo como competidores de seu substrato, o ácido 4-aminobenzoico ou PABA. Polimorfismos nessas enzimas resultam em altos níveis de resistência (Peterson et al., 1988; Triglia and Cowman, 1994), além de reduzirem a estabilidade destas enzimas e, consequentemente, sua eficiência (Fohl and Roos, 2003; Sirawaraporn et al., 1997). Dessa forma, um aumento na expressão de GTP-ciclohidrolase 1, associado à amplificação deste gene, agiria como um mecanismo compensatório, aumentando a eficiência desta via ao disponibilizar uma maior quantidade de enzimas, contribuindo para a manutenção destas populações resistentes aos antifolatos (Heinberg et al., 2013; Kidgell et al., 2006).

Marcadores moleculares de resistência aos antimaláricos em *P. vivax*

Diferente da compreensão sobre os mecanismos de resistência aos antimaláricos em *P. falciparum*, esse entendimento ainda é limitado para *P. vivax*. Ainda que modelos biológicos, como o de macacos do gênero *Aotus*, tenham permitido avanços na compreensão dos mecanismos de resistência desta espécie, a maioria dos dados disponíveis atualmente vem da investigação de genes ortólogos de *P. falciparum* (Khim et al., 2014). Entretanto, essa extrapolação pode não refletir o real mecanismo de resistência devido a diferenças biológicas intrínsecas entre estas espécies. Diversos fatores dificultam o estudo molecular em *P. vivax* como a dificuldade de estabelecer um protocolo de cultura *in vitro* contínuo (Gonçalves et al., 2014) e de diferenciar uma recrudescência devido a falha terapêutica de uma recaída ou nova infecção.

As principais evidências dos mecanismos de resistência em *P. vivax* são provenientes de experimentos com o gene *pvcr-t-o*. Este gene foi transfectado em *P. falciparum* e *Dictyoselium discoideum*, onde foi observado que sua superexpressão era responsável por uma diminuição na susceptibilidade à CQ, sugerindo que *PvCRT-O* poderia modular o acúmulo de CQ em *P. vivax* (Sá et al., 2006). Além disso, o aumento da expressão deste gene já foi relacionado com a resistência à CQ, porém o estudo avaliou somente o aumento na quantidade de RNAm (Fernández-Becerra et al., 2009).

Outro importante gene em *P. vivax* que pode apresentar relação com resistência é o *pvm-dr1*. Uma correlação entre resistência à CQ e polimorfismos neste gene já foi demonstrada em amostras da Papua Nova Guiné (Suwanarusk et al., 2007). Entretanto, como a resistência à CQ foi descrita frequentemente em isolados do parasito que não apresentavam mutação em *pvm-dr1* (Kim et al., 2011; Sá et al., 2005), tais polimorfismos não são considerados bons marcadores de resistência para *P. vivax*.

Diante deste cenário, apesar das evidências clínicas de falha do tratamento *in vivo*, a associação entre polimorfismos nos genes *pvcr-t-o* e *pvm-dr1* e resistência ainda não é bem estabelecida e são necessários mais estudos para sua compreensão (Nomura et al., 2001; Orjuela-Sanchez et al., 2009; Suwanarusk et al., 2007).

1.6 Marcadores moleculares de resistência aos antimaláricos

Uma abordagem importante utilizada no monitoramento e estudo da resistência é a genotipagem de marcadores associados com este fenótipo. Comumente, estes marcadores são polimorfismo de base única (SNP) e variação no número de cópias gênicas (CNV). O SNP é o polimorfismo mais amplamente estudado e vários deles em genes de *P. falciparum* e *P. vivax* foram associados à resistência aos antimaláricos, como descrito anteriormente. Por outro lado, o estudo de CNVs em *Plasmodium* é recente, sendo a maioria em *P. falciparum*. Os CNVs são observados nos genomas de eucariotos em geral e estima-se que entre 0,3 a 1,0% do genoma de *P. falciparum* difira em número de cópias gênicas entre isolados do parasito (Jiang et al., 2008; Kidgell et al., 2006; Ribacke et al., 2007). Como estes polimorfismos alteram a dosagem gênica, espera-se que o nível de expressão gênica e o fenótipo também sejam alterados.

As bases moleculares da resistência aos diferentes antimaláricos não é totalmente compreendida, mas CNVs em diferentes genes de *P. falciparum* já foram associados à resistência, tais como no gene *pfmdr1* (múltiplas drogas – QN, CQ, MQ e HF) e *pfgch1* (SP) (Mita et al., 2009; Nair et al., 2008). O *pfmdr1* está localizado no cromossomo 5 (Cowman et al., 1991; Foote et al., 1989) e para este gene, tanto SNPs quanto alterações no nível de expressão de Pgh-1 podem afetar o fenótipo de resistência à CQ (Barnes et al., 1992; Foote et al., 1990; Sidhu et al., 2005). Desta forma, a redução no nível de expressão de Pgh-1 como consequência da diminuição do número de cópias gênicas de *pfmdr1* está associada à maior resistência à CQ (Barnes et al., 1992). A alteração no número de cópias deste gene também está associada à resistência a MQ, AS, QN e HF. Porém ao contrário do que ocorre com a CQ, a resistência a estas drogas se deve ao aumento no número de cópias de *pfmdr1* (Cowman et al., 1994; Peel et al., 1994; Pickard et al., 2003; R. Price et al., 2004).

O gene *pfgch1* está localizado no cromossomo 12 e também está associado ao fenótipo de resistência em *P. falciparum* (Bzik et al., 1987; Dittrich et al., 2008; Triglia and Cowman, 1994). Este gene é caracterizado por apresentar CNV, porém não está claro como o tratamento com os antifolatos seleciona um maior número de cópias de *pfgch1*. As duas possíveis explicações são: (1) a amplificação gênica

pode ser diretamente selecionada pelas drogas ou (2) a amplificação de *pfgch1* pode ter um efeito compensatório sobre a redução da eficácia das enzimas *pfdhfr* e/ou *pfdhps* mutadas (Kidgell et al., 2006; Nair et al., 2008).

Para *P. vivax*, a principal abordagem utilizada no estudo da resistência é a genotipagem de *pvm-dr1* e *pvcr-t-o* (Brega et al., 2005; Nomura et al., 2001).

Até o momento, poucos estudos envolvendo amostras apenas do sudeste asiático investigaram a relação entre os CNVs e resistência em *P. vivax*, onde foi observada a amplificação do gene *pvm-dr1* (Imwong et al., 2008; Lu et al., 2011; Suwanarusk et al., 2008). Estes resultados são intrigantes, uma vez que em *P. falciparum* o aumento do número de cópias gênicas de *pfm-dr1* está associado a maior resistência a drogas como MQ, AR, QN e HF. Porém estas drogas não são as comumente utilizadas no tratamento da malária por *P. vivax* nas regiões estudadas. Uma possível explicação dada por Suwanarusk et al. (2008) para o aumento do número de cópias de *pvm-dr1* em isolados da Tailândia é que o diagnóstico frequentemente errado das infecções por *P. vivax* resulta na quimioterapia com drogas utilizadas no tratamento de infecção por *P. falciparum*, como a MQ.

Em relação ao gene *pvcr-t-o*, estudos sugerem uma associação entre gravidade clínica e aumento da expressão deste gene (Fernández-Becerra et al., 2009; Melo et al., 2014), assim como para o gene *pvm-dr1* (Melo et al., 2014). Entretanto, nestes estudos não foi avaliado se o aumento observado na expressão destes genes correlacionava-se com o aumento no número de cópias gênicas. Como já foi evidenciada uma associação entre malária grave e a presença de isolados de *P. vivax* resistente a drogas antimaláricas (Melo et al., 2014; Tjitra et al., 2008), os estudos de Fernández-Becerra et al. (2009) e Melo et al. (2014) podem indicar uma associação entre resistência e amplificação de *pvcr-t-o* e *pvm-dr1*.

2 Justificativa

Muitas questões permanecem pouco esclarecidos sobre as bases genéticas da resistência em *P. falciparum* e *P. vivax*. A maioria dos estudos busca estabelecer associações entre polimorfismos de base única e a resistência aos antimaláricos. Entretanto, é evidente que outros mecanismos também estão envolvidos na resistência do *Plasmodium*. O papel do CNV tem sido avaliado nos últimos anos em diferentes países, indicando a importância deste polimorfismo no fenótipo de resistência do parasito. Entretanto, no Brasil as informações sobre a presença e distribuição do CNV se limitam a poucos estudos, tornando necessária a realização de uma investigação que abranja outros genes relacionados à resistência, assim como um maior número de isolados que representem diferentes populações do parasito. Assim, esse estudo tem como objetivo definir o perfil genético dos isolados de *P. falciparum* e *P. vivax* de diferentes regiões da Amazônia brasileira, fornecendo uma linha de base para o monitoramento molecular da resistência aos antimaláricos na região da Amazônia brasileira. De importância, este estudo foi o primeiro a avaliar a presença de CNV em genes relacionados com resistência aos antimaláricos (*pfgch1* e *pvcrt-o*) no país. Paralelamente, este trabalho teve como objetivo mapear o CNV ao redor do mundo por meio de uma revisão sistemática, a fim de entender sua presença em diferentes áreas endêmicas.

3 Objetivos

Avaliar a variabilidade no número de cópias em genes associados à resistência aos antimaláricos em isolados de *P. falciparum* e *P. vivax* da região amazônica brasileira.

3.1 Objetivos específicos

Investigar a presença da variação do número de cópias nos genes *pfmdr1* e *pfgch-1* de *P. falciparum* e *pvmr1* e *pvcrt-o* de *P. vivax*.

Genotipar os polimorfismos de base única nos genes *pfcr1* e *pfmdr1* de *P. falciparum*.

Realizar uma revisão sistemática acerca da distribuição nos vários países do mundo de CNV nos genes *pfmdr1* e *pfgch-1* de *P. falciparum* e *pvmdr1* e *pvcrt-o* de *P. vivax*.

4 Metodologia

4.1 Pacientes e obtenção de amostras

Cento e doze amostras de sangue de pacientes infectados pelo *P. vivax* ou *P. falciparum* de três diferentes estados brasileiros (65 de Mato Grosso, 37 de Rondônia e 10 do Amapá) foram incluídas neste estudo (Tabela 1). A confirmação da infecção de *Plasmodium spp.* foi baseada na gota espessa corada por solução de Giemsa, analisada por microscopistas treinados, de acordo com o manual de diagnóstico da malária do Ministério da Saúde Brasileiro (Ministério da Saúde, 2010). As amostras de DNA foram extraídas do sangue periférico coletados em tubos contendo EDTA utilizando o sistema QIAamp DNA (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA). As coletas foram realizadas entre agosto de 2002 e maio de 2012 pelo nosso grupo de pesquisa ou pelo colaborador Dr. Cor Jesus Fontes (Universidade Federal de Mato Grosso/ MT).

Tabela 1. Característica dos pacientes incluídos no estudo.

Região (N) ¹	Período	Gênero (masculino, %)	Média de Idade, anos (intervalo) ²
<i>P. falciparum</i>			
Amapá (10)	2004	70	35 (11-62)
Rondônia (4)	2008	75	41 (31-52)
Mato Grosso (17)	2002-2012	82	37 (15-64)
<i>P. vivax</i>			
Rondônia (23)	2008	74	36 (12-60)
Mato Grosso (14)	2005-2012	86	34 (10-54)

¹ Estado da coleta da amostra e número de isolados analisados.

² Intervalo, mínimo e máximo.

4.2 Estimativa do número de cópias dos genes de *Plasmodium spp.*

O CNV em genes de *Plasmodium* foi determinado pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real usando sondas de hidrólise e iniciadores específicos para cada gene. Sondas e iniciadores descritos na literatura foram usados para amplificação do gene *pfmdr1* e *pftubulin* (R. Price et al., 2004), *pfgch1*

(Nair et al., 2008) e *pvmdr1* e *pvtubulin* (Imwong et al., 2008). Os iniciadores e sonda do gene *pvcr1-o* foram desenhados para este estudo (Tabela 2).

Tabela 2. Sequência dos iniciadores e sonda utilizados neste estudo.

Gene	Sequência	
<i>pfmdr1</i> (R. N. Price et al., 2004)	Iniciador senso	5' - TGC ATC TAT AAA ACG ATC AGA CAA A
	Iniciador anti-senso	5' - TCG TGT GTT CCA TGT GAC TGT
	Sonda	5' - TTT AAT AAC CCT GAT CGA AAT GGA ACC TTT G
<i>pfgch1</i> (Nair et al., 2008)	Iniciador senso	5' - CCT TTT GAA GGT ACA TGT GAT ATT GAG T
	Iniciador anti-senso	5' - GCG TTA CAA ATA TCG TTA GTT AAA TCT TCT
	Sonda	5' - CTT GAA AAT TTA GAT AAC CCG A
<i>Pftubulin</i> (R. N. Price et al., 2004)	Iniciador senso	5' - TGA TGT GCG CAA GTG ATC C
	Iniciador anti-senso	5' - TCC TTT GTG GAC ATT CTT CCT C
	Sonda	5' - TAG CAC ATG CCG TTA AAT ATC TTC CAT GTC T
<i>pvcr1-o</i>	Iniciador senso	5' - AAC GCA GGA GGA GAA TTC CA
	Iniciador anti-senso	5' - GGG TCG CCA AAT CCT ACA ATC
	Sonda	5' - TGT TTA ACC TCG TGT TGA TTG CCT CGC
<i>pvmdr1</i> (Imwong et al., 2008)	Iniciador senso	5' - CAG CCT GAA AGA TTT AGA AGC CTT
	Iniciador anti-senso	5' - CGG CTG TTG GAA TCA CTT TGA
	Sonda	5' - CGG AGG AGT CGA ACG AAG ATG GTT TTT CTT
<i>Pvtubulin</i> (Imwong et al., 2008)	Iniciador senso	5' - TCG CTT AAC GAC GTC CCC
	Iniciador anti-senso	5' - TGG AAT GTC ACA AAC GCT GG
	Sonda	5' - TTC CGC TTC CCC CTC CAC AGG

As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 10 µL na presença de 5 µL de Taqman® Universal PCR Master MIX 2x (Applied Biosystems, AB, Foster City, CA, USA), 1 µL de DNA (~100-200 ng), 900 nM (*pfmdr1*, *pfgch1* e *pvmdr1*) ou 300 nM (*pftubulin*, *pvtubulin* e *pvcr1-o*) para os iniciadores senso, 900 nM dos iniciadores anti-senso para todos os genes, e 200 nM (*pfmdr1*, *pfgch1*, *pvmdr1* e *pvcr1-o*) ou 250 nM (*pftubulin* e *pvtubulin*) para as sondas. Os parâmetros de ciclagem para a PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C. A PCR foi realizada em triplicada no sistema Applied Biosystems Viia7 real-time PCR (AB) em placas de 384 poços. O gene contendo cópia única, β-tubulina, foi usado como referência (normalizador) (Imwong et al., 2008; R. Price et al., 2004) e uma amostra de campo com uma única cópia do gene alvo foi usado como calibrador. O método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ foi usado para estimar o número de cópias dos genes *pfmdr1*, *pvmdr1* e *pvcr1-o* em relação a o gene calibrador beta-tubulina (cópia única no genoma de *Plasmodium*). Para o gene *pfgch1*, uma curva de calibração foi usada com plasmídeos contendo o inserto do mesmo gene devido à diferença de

eficiência das reações de amplificação do gene alvo e do normalizador. As amostras foram consideradas como cópia única quando o valor estimado do número de cópias foi de 0,5 a 1,5, enquanto valores acima de 1,5 foram definidos como amplificação gênica. Somente amostras com CT - *cycle threshold* (definido como o número do ciclo da reação no qual a fluorescência gerada supera o limiar de fluorescência) < 32 ou desvio padrão das triplicatas < 0,3 foram consideradas nas análises. Cada experimento foi desenvolvido em triplicata e a amplificação gênica foi confirmada por três experimentos independentes.

4.3 Detecção de Polimorfismo de Base Única nos genes *pfmdr1* e *pfcr1*

PCR seguida por análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) foi realizada para identificar SNPs nos códons 76 do gene *pfcr1* e 86 em *pfmdr1*, de acordo com o protocolo de Durand et al. (2002) e Lopes et al. (2002), respectivamente. De acordo com essa técnica, após a amplificação das sequências específicas de cada gene, o produto foi submetido à digestão com uma enzima que reconhece como sítio de restrição o polimorfismo na sequência a ser analisada. Nesse estudo, o amplicon foi submetido à digestão enzimática com *ApoI* (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) durante 2 horas a 50° C, seguido pela inativação enzimática por 2 minutos a 80° C. Os fragmentos de restrição foram visualizados em um gel de poliacrilamida 12% corado com prata. A cepa 3D7 de *P. falciparum* foi usada como controle (possui ambos os códons não mutados que são clivados em dois fragmentos para ambos os genes).

Tabela 3. Perfil da digestão enzimática dos genes *pfmdr1* e *pfcr1*.

	Amplicon (pares de bases)	Produto da digestão (pares de bases)
<i>pfmdr1</i>	504	255 e 249
<i>pfcr1</i>	199	126 e 73

4.4 Revisão sistemática da literatura

Uma revisão sistemática da literatura foi conduzida entre maio de 2014 e novembro de 2015. Uma busca avançada foi realizada usando as palavras-chave: *plasmodium*; *copy number*; *resistance*; *gene*; *copy number resistance* e *gene copy*, nos bancos de dados: *Pubmed*, *Malaria Journal*, *Science Direct* e *CAPES*. Essas palavras-chave foram identificadas no título, resumo e corpo do texto, de acordo

com o algoritmo de busca de cada banco de dados. Um critério de exclusão manual foi aplicado: (1) estudos com outra espécie de *Plasmodium* que não *P. falciparum* ou *P. vivax*; (2) estudos com cepas de laboratório cultivadas *in vitro*; (3) outras revisões sistemáticas; e (4) estudos com outros genes relacionados com a resistência aos antimaláricos que não *pfmdr1*, *pfgch1*, *pvmr1* e *pvcr1-o*. Todos os artigos duplicados e artigos de revisão foram excluídos; os estudos clínicos foram incluídos nesta revisão sistemática. O título, resumo e métodos de todos os 301 artigos selecionados foram analisados para identificar aqueles que estavam de acordo com os critérios de inclusão. Dos artigos elegíveis os seguintes dados foram extraídos: autor; ano da coleta da amostra (quando disponível); país onde o estudo foi realizado; número amostral e frequência do CNV naquela população de parasitos.

5 Resultados

5.1 Padronização da PCR em tempo real para o gene *pvcr1-o*

Para este estudo, os iniciadores e sonda para o gene *pvcr1-o* foram desenhados, uma vez que não havia outro trabalho a amplificar este gene para cálculo de CNV. A tabela 4 resume as concentrações utilizadas para os iniciadores senso e anti-senso durante a padronização. Para padronizar a sonda, foram utilizadas as concentrações de 150, 200 e 250 nM, de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 4. Concentrações utilizadas para os iniciadores.

		Iniciador senso (nM)	
		300	900
Iniciador anti-senso (nM)	300	300/300	900/300
	900	300/900	900/900

A concentração de 300/900 nM para os iniciadores demonstrou melhor amplificação. A melhor concentração para a sonda foi a de 200 nM, apresentando amplificação média no ciclo 19, com desvio padrão de 0,101.

5.2 Estimativa de Variação de Número de Cópias em *pfmdr1* e *pfgch1*

A análise da variação do número de cópias para os genes *pfmdr1* e *pfgch1* (Figura 8) foi realizada com sucesso em trinta e uma amostras de pacientes

infectados por *P. falciparum* de Mato Grosso, Rondônia e Amapá. Para todos os isolados analisados, nenhum apresentou amplificação gênica.

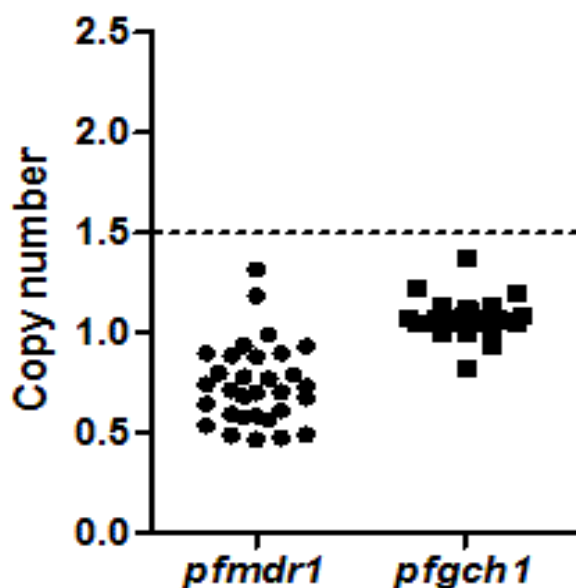


Figura 8. Distribuição da variação do número de cópias para os isolados de *P. falciparum*. **(A)** Perfil de amplificação para o gene *pfmdr1* para alguns dos isolados analisados. **(B)** Perfil de amplificação gênica para *pfgch1*. As barras horizontais representam os valores estimados de quantificação mínima e máxima do número de cópias do gene obtidas dos experimentos em triplicata. Costa, 2017.

5.3 Análise de Polimorfismo de Base Única em *pfcr1* e *pfmdr1*

As amostras de *P. falciparum* foram genotipadas para polimorfismos em *pfcr1* (K76T) e *pfmdr1* (N86Y). Vinte e sete amostras foram analisadas com sucesso (10 de Amapá, 16 de Mato Grosso e 1 de Rondônia) para ambos os genes (Figura 9). Para *pfcr1*, todas as amostras continham o polimorfismo no códon 76 (Figura 9 A). Para todas as amostras analisadas, o polimorfismo no códon 86 de *pfmdr1* não foi encontrado (Figura 9 B).

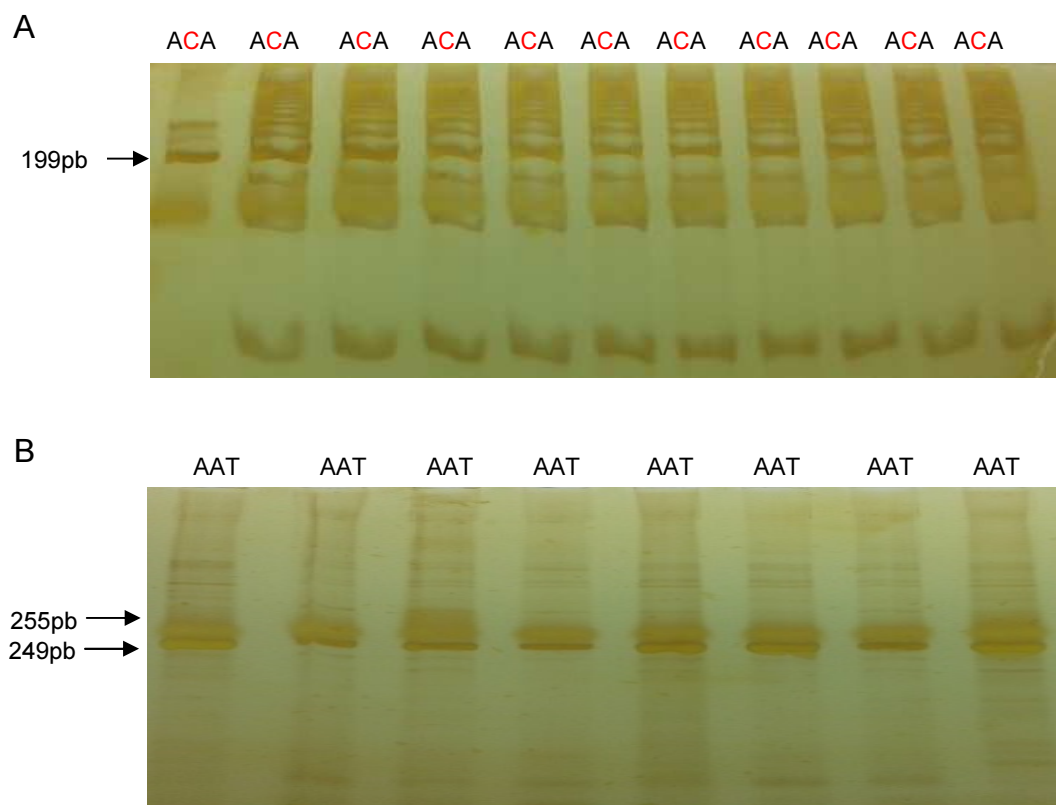


Figura 9. Perfil eletroforético dos genes *pfcr1* e *pfmdr1* para isolados de *P. falciparum* **(A)** Perfil eletroforético do gene *pfcr1*. Não houve clivagem do fragmento pela enzima de restrição, indicando a presença do polimorfismo K76T (AAA>ACA). A banda não clivada apresenta 199 pares de bases. **(B)** Perfil eletroforético do gene *pfmdr1*. Houve clivagem do fragmento original em outros dois fragmentos de 255 e 249 pares de bases, indicando a ausência do polimorfismo no códon 86 (AAT>TAT). Gel de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata. Costa, 2017.

5.4 Variação do Número de Cópias em *pvmdr1* e *pvcrt-o*

Para caracterizar o padrão de CNV dos isolados de *P. vivax* da região Amazônica Brasileira, trinta e oito amostras foram analisadas. Em Mato Grosso, considerando todos os períodos analisados, seis de quatorze (43%) isolados apresentaram múltiplas cópias do gene *pvmdr1* (Figura 10). Em Rondônia, de vinte e três amostras analisadas, apenas uma amostra (4%) apresentou múltiplas cópias do gene (Figura 10 B). Para o gene *pvcrt-o*, apenas uma de quinze amostras (7%) de Mato Grosso tinha múltiplas cópias do gene (Figura 11) e nenhuma amostra de Rondônia mostrou amplificação (Figura 11 B).

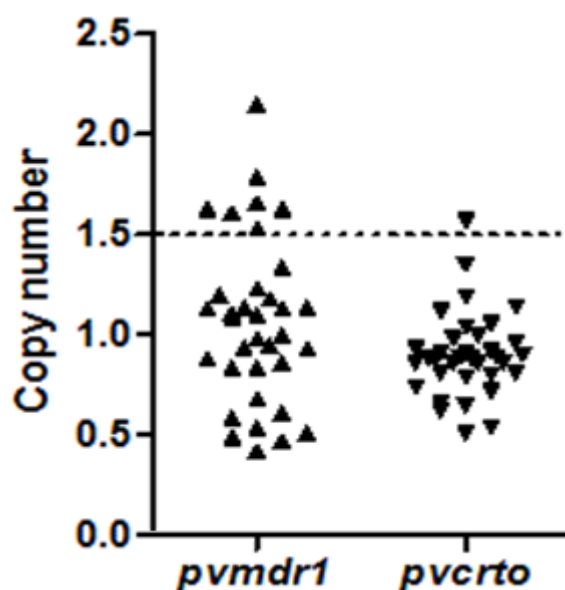


Figura 10. Variação do número de cópias para o gene *pvmdr1* e *pvcrt-o*. Para o gene *pvmdr1*, 7 amostras apresentaram amplificação para as regiões de Mato Grosso e Rondônia. Para o gene *pvcrt-o*, a amplificação foi observada em apenas uma amostra de Mato Grosso.

5.5 Variação do Número de Cópias em *Plasmodium* spp.: revisão sistemática da literatura

Um total de 307 artigos foi selecionado de quatro bancos de dados e 81 destes artigos foram incluídos na revisão sistemática, de acordo com os critérios estabelecidos (Tabela 3). Estudos incluindo amostras de quatro continentes constituíram a revisão, onde a Ásia e África foram as regiões com mais trabalhos selecionados (86%). A maioria dos estudos avaliou a variabilidade genética em isolados de *P. falciparum*, relacionado com o número de cópias em *pfmdr1*. Somente dois estudos analisaram o gene *pfgh1*. Para o gene *pvmdr1*, oito estudos foram selecionados para inclusão e nenhum para o gene *pvcrt-o*.

Nas Américas e África, a amplificação de *pfmdr1* é restrita a certas localidades (Figura 12). Assim, a maioria dos estudos nas Américas reportou ausência de amplificação em *pfmdr1* em isolados de *P. falciparum*; a taxa de amplificação variou de 6% a 38% (Figura 12). Para alguns países como Brasil e Guiana Francesa foram descritos cerca de 30% de amplificação de *pfmdr1* (entre 2 a 4 cópias) nas amostras analisadas. Em contraste, na África a prevalência de isolados com cópia única de *pfmdr1* chega a quase 100% em diferentes países, com exceção da Etiópia.

Diferente dessas regiões, os países asiáticos apresentaram uma alta taxa e distribuição de isolados com amplificação de *pfmdr1* (Figura 12). Os estudos mostram que na fronteira da Tailândia-Mianmar a taxa de amplificação é maior, chegando a 100%. De forma geral, os países do sudeste asiático tiveram uma maior prevalência de isolados de *P. falciparum* com amplificação de *pfmdr1*, enquanto isolados do sudoeste asiático não apresentaram amplificação gênica.

Em relação ao gene *pfgch1*, apenas dois estudos avaliaram a presença de CNV em isolados de campo. Na África, Kiwuwa et al., (2013) não detectou amplificação em 21 isolados analisados. Entretanto, no sudeste asiático uma diferença significativa nas taxas de amplificação deste gene foi reportada em isolados da Tailândia (72%) e Laos (2%), países que têm histórias de seleção contrastantes.

Nas Américas e na África, poucos estudos avaliaram o CNV no gene *pvmdr1*, encontrando baixas taxas de amplificação (1 a 3%) (Figura 13). Na Ásia, a amplificação deste gene foi reportada no Camboja (4%) e principalmente na Tailândia (7 a 39%) (Figura 13).

Tabela 5. Artigos elegíveis para a inclusão na revisão sistemática.

Bando de dados	Selecionados	Incluídos
Pubmed ^a	90	50
Malaria Journal ^b	135	18
Science Direct ^c	26	4
CAPES ^d	50	5
TOTAL	301	78

^a <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

^b <https://malariajournal.biomedcentral.com/>

^c <http://www.sciencedirect.com/>

^d <http://www.capes.gov.br/>

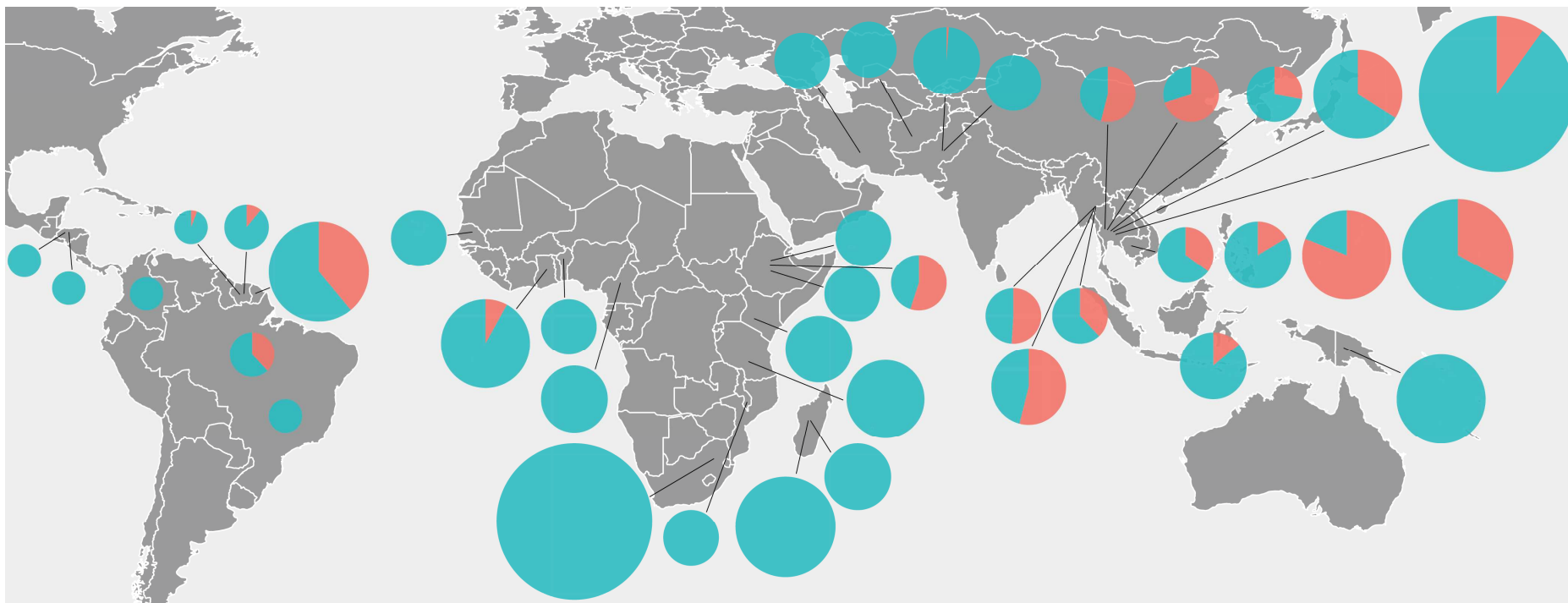


Figura 11. Distribuição dos isolados de *P. falciparum* avaliados quanto à presença de CNV para o gene *pfmdr1*. Em vermelho, está representada a frequência de isolados com amplificação gênica e a área em azul se refere à frequência de isolados com uma única cópia gênica. O raio do gráfico é proporcional ao número de amostras analisadas. Costa et al, 2017.

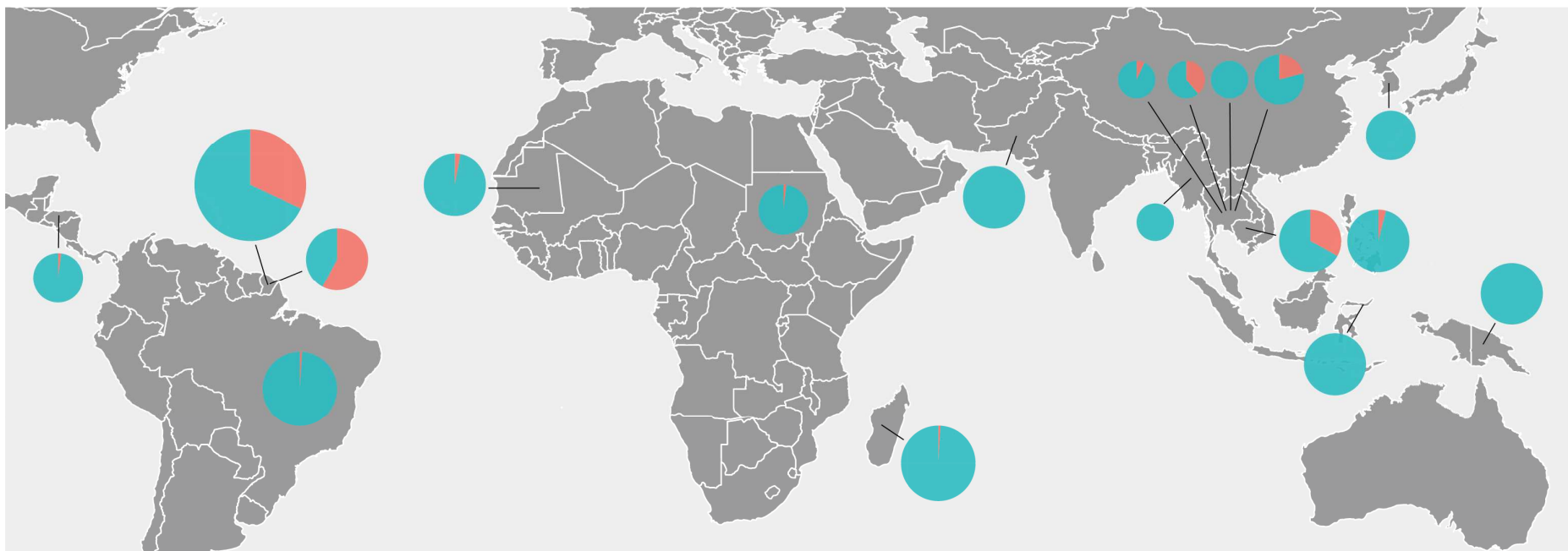


Figura 12. Distribuição dos isolados de *P. vivax* avaliados quanto à presença de CNV no gene *pvmdr1*. Em vermelho, está representada a frequência de isolados com amplificação gênica e a área em azul se refere à frequência de isolados com uma única cópia gênica. O raio do gráfico é proporcional ao número de amostras analisadas. Costa et al, 2017.

6 Discussão

A eficácia de diversas drogas antimaláricas é limitada devido à resistência dos parasitos. Diversos fatores contribuem para o aparecimento e propagação da resistência, como polimorfismos em genes importantes para o estabelecimento deste fenótipo. Estes polimorfismos servem como marcadores moleculares, atuando como ferramentas de vigilância e monitoramento da resistência.

Alguns genes já foram identificados e relacionados com a resistência como o *pfmdr1* e, amplificações deste gene são relacionadas com a alteração na susceptibilidade e resistência a diferentes antimaláricos como CQ, MQ, QN e HF (Reed et al., 2000). Um aumento no número de cópias desse gene é o determinante mais importante de resistência à MQ e pela redução da sensibilidade ao AS *in vitro* (Cowman et al., 1994; Peel et al., 1994; R. Price et al., 2004). No Brasil, a resistência aos antimaláricos por *P. falciparum* é reportada desde 1910 (Gama et al., 2011). Entretanto, em nosso estudo, não foi observada a amplificação do gene *pfmdr1* em nenhuma das regiões estudadas para os trinta e um isolados analisados. Outro trabalho também avaliou a presença de CNV em *pfmdr1* em amostras coletadas durante quatro décadas no Brasil (de 1984 e 2011), quando pacientes eram tratados com QN combinada com tetraciclina, MQ ou ACT (Inoue et al., 2014). Nesse período, a taxa de amplificação de *pfmdr1* chegou a 42%. Particularmente, o uso de drogas como MQ pode ser uma das explicações para a alta taxa de amplificação observada. Uma notável diferença entre o presente estudo e o de Inoue et al. (2014) é a região e o período de coleta das amostras (anos 2000 no presente estudo), o que poderia levar às diferenças observadas no perfil de diversidade genética descrito em ambos os estudos. De acordo com isso, a distribuição de *P. falciparum* com estruturas populacionais distintas tem sido descritas na região da Amazônia Brasileira (Machado et al., 2004). Uma vez que os dados do estudo de Inoue et al. (2014) não foram demonstrados por região, diferenças na distribuição do CNV com nosso estudo devido ao local de infecção não puderam ser avaliadas. Com a ausência de amplificação aqui observada, outra hipótese seria a reversão do fenótipo de resistência devido à retirada das drogas, e, conseqüentemente, a pressão exercida por elas, como já reportado na África (Duah et al., 2013; Ngalah et al., 2015)..

O genoma de *P. falciparum* é conhecido por ser plástico (Wootton et al., 2002), o que significa que o parasito pode passar por uma rápida e extensiva variação em resposta a mudanças de acordo com o ambiente que está inserido, também conhecido como plasticidade fenotípica (Reece et al., 2009). Em um curto período de tempo, essa plasticidade fenotípica pode modificar ou produzir novos fenótipos. Assim, esse fenômeno permite que os parasitos alterem seu *fitness* por mecanismos como a expressão gênica diferencial (Mideo and Reece, 2011). Um exemplo foi dado por Preechapornkul et al. (2009) em que cepas de *P. falciparum* contendo uma única cópia do gene *pfmdr1* sobreviveram preferencialmente na ausência de MQ quando comparadas àquelas com múltiplas cópias. Assim, parasitos que apresentavam um menor número de cópias de *pfmdr1* provavelmente tinham uma chance de sobrevivência maior devido à demanda energética gerada pela Pgh-1. Essa proteína age como uma bomba de efluxo que transporta substratos contra seu gradiente de concentração com hidrólise de ATP (Hoffmann and Kroemer, 2004). A MQ foi usada no início dos anos 2000 como segunda linha de tratamento, e somente em 2006 o ACT foi adotado no Brasil. Assim, a utilização restrita da MQ e, desse modo, a baixa pressão exercida por essa droga pode ter colaborado para a seleção de parasitos com uma única cópia de *pfmdr1* nas nossas amostras.

A resistência à SP foi relatada pela primeira vez na fronteira da Tailândia e Mianmar nos anos 1970 e pouco tempo depois esse fenótipo já podia ser observado em diversas áreas endêmicas pelo mundo (Hurwitz, 1981). Este fenótipo em *P. falciparum* está relacionado com SNPs em dois genes da via do folato, *pfdhfr* e *pfdhps* (Peterson et al., 1988; Triglia et al., 1997). Entretanto, polimorfismos nesses genes podem alterar a eficiência de seus produtos enzimáticos. O gene *pfgch1* codifica a primeira enzima desta via e o aumento do seu número de cópias pode agir como um mecanismo compensatório, uma vez que está associado com um grande número de SNPs em *pfdhfr* e *pfdhps* (Heinberg et al., 2013; Kümpornsin et al., 2014; Nair et al., 2008). Poucos estudos avaliaram o papel do CNV na resistência à SP, particularmente nas Américas. O presente estudo foi o primeiro a avaliar CNV em *pfgch1* em isolados de *P. falciparum* do Brasil. Não foi observada amplificação gênica nos isolados nas regiões estudadas. As amostras aqui estudadas datam dos anos 2000, mais de 20 anos depois da retirada da SP do

esquema terapêutico nacional no final dos anos 1980. Assim, a ausência de amplificação deste gene nos isolados brasileiros pode ser um resultado da retirada dos antifolatos do esquema de tratamento da malária. De fato, a presença de CNV neste gene parece não ser vantajoso na ausência da pressão dos antimaláricos, tendo impacto no crescimento do parasito, uma vez que a amplificação deste gene pode resultar no acúmulo de metabólitos intermediários da via do folato, podendo ser deletéria ao parasito (Heinberg et al., 2013). Uma vez que a evolução dos parasitos resistentes aos antifolatos é multifacetada e complexa, e a atividade do gene *pfcgh1* está relacionada com outras enzimas, análises adicionais devem ser realizadas para confirmar o significado do CNV na aquisição de resistência à SP.

Diversos polimorfismos genéticos têm sido associados com a resistência à CQ nos genes *pfmdr1* e *pfcr1*. Em nosso estudo, o polimorfismo na posição 76 do gene *pfcr1* foi encontrado em todas as amostras analisadas, apesar da CQ não ser usada para o tratamento de malária por *P. falciparum* desde meados de 1980 (Boulos et al., 1997). O polimorfismo K76T é essencial para resistência à CQ, como demonstrado por experimentos de transfecção, e é sugerido que essa mutação em *pfcr1* age reduzindo a quantidade de droga no vacúolo digestivo do parasito (Durand et al., 2001; Durrand et al., 2004; Sidhu et al., 2002; Wellems and Plowe, 2001). Estudos com isolados de campo realizados na África observaram uma significativa associação entre este polimorfismo e a substituição N86Y em *pfmdr1*, sugerindo uma combinação entre os produtos desses dois genes na resistência à CQ (Holmgren et al., 2006; Mockenhaupt et al., 2005; Ochong et al., 2003; Tinto et al., 2008). Nas nossas amostras, não foi observada a substituição no códon 86 entre os isolados analisados. No Brasil, outros estudos também reportaram baixa frequência ou ausência da substituição N86Y em *pfmdr1* (Aguilar et al., 2014; Gbotosho et al., 2012; Inoue et al., 2014). De maneira diferente, outros polimorfismos (Y184F, S1034C, N1042D e D1246Y) que influenciam a resposta do parasito a diferentes drogas como CQ, MQ, QN, HF e ART (Duraisingh et al., 2000; Pickard et al., 2003; Reed et al., 2000) são altamente frequentes na América do Sul (Adhin et al., 2013; Aguilar et al., 2014; Bacon et al., 2009; Duraisingh et al., 2000; Griffing et al., 2010; Inoue et al., 2014). Em conjunto, esses resultados sugerem que os SNPs que conferem resistência à CQ podem ser diferentes entre isolados do parasito da América do Sul e de outras áreas endêmicas. Desse modo, torna-se

necessário definir marcadores mais precisos para caracterizar as amostras sul-americanas.

No Brasil e em diversas outras áreas endêmicas, CQ e PQ ainda são as drogas de escolha usadas para tratar *P. vivax* (WHO, 2013). Apesar da PQ ser atualmente a única droga comercialmente disponível contra os hipnozoítos, outra 8-aminoquinolina chamada Tafenoquina está sendo desenvolvida e testada para ser usada em combinação com CQ (Llanos-Cuentas et al., 2014). Essa droga, além de ser menos tóxica que a PQ, possui uma meia vida de 2 a 3 semanas, o que possibilita o tratamento com uma única dose da droga (Brueckner et al., 1998; Walsh et al., 1999). Porém, a resistência à CQ já foi reportada na Amazônia Brasileira (Alecrim et al., 1999; Chehuan et al., 2013; de Santana Filho et al., 2007; Marques et al., 2014). De forma semelhante ao *P. falciparum*, o CNV no gene *pvm-dr1* de *P. vivax* é supostamente relacionado com resistência aos antimaláricos (Imwong et al., 2008). No Brasil, apenas um estudo descreveu CNV em *pvm-dr1*, mostrando uma amplificação de 0,9% (2/215) em isolados do estado do Acre (Vargas-Rodríguez et al., 2012). Além disso, os autores não observaram qualquer relação entre SNPs descritos para este gene e resistência à CQ.

Em nosso estudo, a amplificação de *pvm-dr1* foi observada em amostras de dois diferentes estados brasileiros (43% em Mato Grosso e 4% em Rondônia). Como anteriormente sugerido em outras áreas geográficas, essa amplificação pode estar associada com utilização de MQ (Imwong et al., 2008; Snounou and White, 2004), em um contexto de infecção mista, quando essa droga era usada como monoterapia ou em combinação para tratar a malária por *P. falciparum*. Um dado que reforça nossos achados é a descrição de isolados de *P. vivax* resistentes à MQ na região da Amazônia Brasileira: 42% no estudo de Aguiar et al. (2014); 6% por Chehuan et al. (2013) e 21,2% por Pratt-Riccio et al. (2013). A resistência de *P. falciparum* à MQ está associada com o aumento do número de cópias de *pfmdr1*, e um mecanismo similar é associado à resistência de *P. vivax* a essa droga (R. Price et al., 2004). Isso porque em algumas regiões do Sudeste Asiático com intensa e continuada pressão por esta droga, amplificações gênicas de *pvm-dr1* são significativamente mais comuns do que em pacientes de outras localidades onde há menos exposição dos parasitos à MQ (Imwong et al., 2008). Adicionalmente, Suwanarusk et al. (2008) reportou amplificação de 21% em *pvm-dr1* em isolados da

Tailândia, que foi associado com um aumento de 2 vezes no IC₅₀ desta droga (Suwanarusk et al., 2008).

De forma interessante, em nosso estudo, o isolado com amplificação gênica de *pvcrt-o* era de um paciente com relato de recaída após tratamento de CQ com PQ. Até o presente momento, nenhum estudo avaliou a presença de CNV neste gene. A malária grave causada por *P. vivax* e resistência aos antimaláricos tem sido relacionada com o aumento da expressão de *pvcrt-o*, mas somente os níveis de expressão do gene foram avaliados e não se essa amplificação era uma consequência da amplificação gênica (Fernández-Becerra et al., 2009; Melo et al., 2014). O gene *crt* de *P. falciparum* é um dos principais determinantes de resistência à CQ e SNPs neste gene são descritos como marcados moleculares para esse fenótipo do parasito (Wellems and Plowe, 2001). Diferente de *P. falciparum*, nenhum estudo evidenciou uma clara associação entre SNPs no gene *pvcrt-o* e resistência à CQ. Entretanto, esse gene parece afetar a resposta a esta droga independentemente dessas mutações pontuais, uma vez que um experimento de transfecção de *pvcrt-o* em *P. falciparum* demonstrou que a expressão aumentada desse gene resultou em uma maior tolerância à CQ (Sá et al., 2006). Assim, apesar da escassez de informação sobre este gene e sua relação com resistência à CQ em *P. vivax*, a expressão aumentada em casos de gravidade e homologia com *pfcr*t podem fornecer evidência de seu papel na resistência aos antimaláricos.

Analisando os dados obtidos pela revisão sistemática da literatura observamos que a distribuição de isolados resistentes aos antimaláricos é diferente entre as regiões endêmicas do mundo, assim como o perfil de CNV nos diferentes genes. Essas diferenças nas taxas de amplificação gênica, quanto tomadas em conjunto, podem ser o resultado da adoção de diferentes esquemas terapêuticos para a malária nos diferentes países e através dos anos. De fato, existem evidências que a amplificação de *pfmdr1* em *P. falciparum* surgiu como múltiplos eventos independentes, sugerindo que essa região do genoma está sobre forte pressão seletiva (Triglia et al., 1991). Considerando que a amplificação gênica tem um custo para o *fitness* do parasito, a retirada da pressão da droga pode, por sua vez, favorecer parasitos sem amplificação gênica (Ochong et al., 2013; Preechapornkul et al., 2009). Um exemplo da influência do esquema terapêutico é

observado quando se compara o uso da SP no Laos e Tailândia. Esta droga não foi usada amplamente no Laos, apesar de sua utilização como segunda linha de tratamento até 2006, e de forma oposta, a Tailândia tem um histórico de longo uso das drogas antifolato (Bunnag and Harinasuta, 1987; Heinberg et al., 2013; Mayxay et al., 2007). A diferença observada na amplificação gênica entre as áreas endêmicas para o gene *pfgch1* sugere uma adaptação local à pressão da droga, que foi corroborada experimentalmente (Heinberg et al., 2013).

Assim como descrito para *P. falciparum*, há diferenças em relação à frequência de distribuição de CNV para isolados de *P. vivax* nas áreas endêmicas. Nestas regiões, os autores sugerem que a alta taxa de infecção policlonal poderia ter um impacto no desenvolvimento de resistência aos antimaláricos, influenciando a taxa de recombinação sexual e permitindo uma supressão competitiva entre os clones resistentes e sensíveis em uma coinfeção (Lin et al., 2013).

Em resumo, pela primeira vez no Brasil CNV em *pvcrt-o* foi avaliado e uma amplificação deste gene foi observada em isolados de *P. vivax*. Assim, é possível que os casos de malária grave e resistência à CQ possam estar associados com esse polimorfismo, uma vez que estudos anteriores reportaram uma relação entre o fenótipo de resistência e aumento nos níveis de expressão de *pvcrt-o*. De forma interessante, uma extensa variação na taxa de amplificação de *pvmadr1* foi observada entre as regiões estudadas. Para os isolados de *P. falciparum*, nenhuma amplificação foi observada em *pfmdr1* e *pfgch1*, mas o polimorfismo K76T em *pfcr* associado com resistência à CQ estava presente

7 Conclusão

- Entre as amostras analisadas de três regiões da Amazônia Brasileira (AP, MT e RO), não foi observada a presença de CNV nos genes *pfmdr1* e *pfgch1* de *P. falciparum*;
- O principal polimorfismo associado à resistência à CQ no gene *pfcr1* (K76T) foi observado em todas as amostras analisadas de *P. falciparum*, porém o polimorfismo no códon 86 do gene *pfmdr1* não foi encontrado;
- A amplificação gênica de *pvmdr1* foi observada em amostras do Mato Grosso e Rondônia;
- A presença de CNV no gene *pvcrt-o* foi identificada pela primeira vez no Brasil em uma amostra coletada em Mato Grosso;
- A revisão sistemática da literatura mostrou grande presença de isolados com altas taxas de CNV nos genes *pfmdr1* e *pvmdr1* na Ásia para *P. falciparum* e *P. vivax*, respectivamente. De forma contrária, nas Américas e na África as taxas de amplificação gênicas são significativamente menores.

Referências

- Adhin, M.R., Labadie-Bracho, M., Bretas, G., 2013. Molecular surveillance as monitoring tool for drug-resistant *Plasmodium falciparum* in Suriname. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 89, 311–6. doi:10.4269/ajtmh.12-0695
- Aguiar, A.C.C., Pereira, D.B., Amaral, N.S., De Marco, L., Krettli, A.U., 2014. *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* ex vivo susceptibility to anti-malarials and gene characterization in Rondônia, West Amazon, Brazil. *Malar. J.* 13, 73. doi:10.1186/1475-2875-13-73
- Alecrim, M.D.G.C., Alecrim, W., Macedo, V., 1999. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32, 67–68. doi:10.1590/S0037-86821999000100013
- Alesaeidi, S., Miraj, S., 2016. A Systematic Review of Anti-malarial Properties, Immunosuppressive Properties, Anti-inflammatory Properties, and Anti-cancer Properties of *Artemisia Annua*. *Electron. Physician* 8, 3150–3155. doi:10.19082/3150
- Ambroise-Thomas, P., Rossignol, J.F., 1986. Chemotherapy of resistant *falciparum* malaria. *Parasitol. Today*. doi:10.1016/0169-4758(86)90163-8
- Anstey, N.M., Russell, B., Yeo, T.W., Price, R.N., 2009. The pathophysiology of *vivax* malaria. *Trends Parasitol.* 25, 220–227. doi:10.1016/j.pt.2009.02.003
- Bacon, D.J., McCollum, a. M., Griffing, S.M., Salas, C., Soberon, V., Santolalla, M., Haley, R., Tsukayama, P., Lucas, C., Escalante, a. a., Udhayakumar, V., 2009. Dynamics of Malaria Drug Resistance Patterns in the Amazon Basin Region following Changes in Peruvian National Treatment Policy for Uncomplicated Malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2042–2051. doi:10.1128/AAC.01677-08
- Baird, J.K., Basri, H., Purnomo, Bangs, M.J., Subianto, B., Patchen, L.C., Hoffman, S.L., 1991. Resistance to Chloroquine by *Plasmodium vivax* in Irian Jaya, Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44, 547–552.
- Baird, J.K., Leksana, B., Masbar, S., Fryauff, D., Sutanihardja, M., Suradi, Wignall, F., Hoffman, S., 1997. Diagnosis of resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax*: timing of recurrence and whole blood chloroquine levels. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56,

621–6.

Bannister, L., Mitchell, G., 2003. The ins, outs and roundabouts of malaria. *Trends Parasitol.* 19, 209–213. doi:10.1016/S1471-4922(03)00086-2

Barnes, D. a, Foote, S.J., Galatis, D., Kemp, D.J., Cowman, a F., 1992. Selection for high-level chloroquine resistance results in deamplification of the *pfmdr1* gene and increased sensitivity to mefloquine in *Plasmodium falciparum*. *EMBO J.* 11, 3067–3075.

Boulos, M., Amato Neto, V., Dutra, A., Di Santi, S., Shiroma, M., 1991. Frequency of malaria relapse due to *Plasmodium vivax* in a non-endemic region (São Paulo, Brazil). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 33, 143–6.

Boulos, M., Dutra, A.P., DiSanti, S.M., Shiroma, M., Amato Neto, V., 1997. Avaliação clínica do quinino para o tratamento de malária por *Plasmodium falciparum*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 30, 211–213. doi:10.1590/S0037-86821997000300007

Brasil, A., Costa, G., Alecrim, W.D., Macêdo, V., Korves, C.T., Roberts, D.R., Li, J., Sullivan, M., Mccutchan, T.F., 1999. Description of a possible clonal expansion of *Plasmodium vivax* in Manaus - Amazonas - Brazil Descrição de uma possível expansão clonal do 32, 303–305.

Bray, P.G., Mungthin, M., Ridley, R.G., Ward, S.A., 1998. Access to Hematin: The Basis of Chloroquine Resistance. *Mol. Pharmacol.* 54, 170 LP-179.

Bray, P.G., Ward, S.A., O'Neill, P.M., 2005. Quinolines and Artemisinin: Chemistry, Biology and History, in: Compans, R.W., Cooper, M.D., Honjo, T., Koprowski, H., Melchers, F., Oldstone, M.B.A., Olsnes, S., Potter, M., Vogt, P.K., Wagner, H., Sullivan, D.J., Krishna, S. (Eds.), *Malaria: Drugs, Disease and Post-Genomic Biology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 3–38. doi:10.1007/3-540-29088-5_1

Brega, S., Meslin, B., de Monbrison, F., Severini, C., Gradoni, L., Udomsangpetch, R., Sutanto, I., Peyron, F., Picot, S., 2005. Identification of the *Plasmodium vivax* *mdr*-like gene (*pvmdr1*) and analysis of single-nucleotide polymorphisms among isolates from different areas of endemicity. *J. Infect. Dis.* 191, 272–7. doi:10.1086/426830

- Brueckner, R.P., Lasseter, K.C., Lin, E.T., Schuster, B.G., 1998. First-time-in-humans safety and pharmacokinetics of WR 238605, a new antimalarial. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58, 645–649.
- Bunnag, D., Harinasuta, T., 1987. The current status of drug resistance in malaria. *Int. J. Parasitol.* 17, 169–180. doi:10.1016/0020-7519(87)90038-5
- Bzik, D.J., Li, W.B., Horii, T., Inselburg, J., 1987. Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 8360–4.
- Cabrera, M., Paguio, M.F., Xie, C., Roepe, P.D., 2009. Reduced Digestive Vacuolar Accumulation of Chloroquine is Not Linked to Resistance to Chloroquine Toxicity. *Biochemistry* 48, 11152–11154. doi:10.1021/bi901765v
- Chehuan, Y.F., Costa, M.R.F., Costa, J.S., Alecrim, M.G.C., Nogueira, F., Silveira, H., Brasil, L.W., Melo, G.C., Monteiro, W.M., Lacerda, M.V.G., 2013. In vitro chloroquine resistance for *Plasmodium vivax* isolates from the Western Brazilian Amazon. *Malar. J.* 12, 226. doi:10.1186/1475-2875-12-226
- Cooper, R.A., Ferdig, M.T., Su, X.-Z., Ursos, L.M.B., Mu, J., Nomura, T., Fujioka, H., Fidock, D.A., Roepe, P.D., Wellems, T.E., 2002. Alternative Mutations at Position 76 of the Vacuolar Transmembrane Protein PfCRT Are Associated with Chloroquine Resistance and Unique Stereospecific Quinine and Quinidine Responses in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Pharmacol.* 61, 35 LP-42.
- Cowman, A.F., Galatis, D., Thompson, J.K., 1994. Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked To Amplification of the Pfmdr1 Gene and Cross-Resistance to halofantrine and quinine. *Sci. York* 91, 1143–1147.
- Cowman, A.F., Karcz, S., Galatis, D., Culvenor, J.G., 1991. A P-glycoprotein homologue of *Plasmodium falciparum* is localized on the digestive vacuole. *J. Cell Biol.* 113, 1033–42. doi:10.1083/jcb.113.5.1033
- Das, D., Phyto, A.P., Tarning, J., Ph, D., Lwin, K.M., Ariey, F., Hanpithakpong, W., Lee, S.J., Ringwald, P., Silamut, K., Herdman, T., An, S.S., Yeung, S., Socheat, D., White, N.J., 2009. Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *Drug Ther. (NY)*. 361, 455–467. doi:10.1086/657120

de Andrade, JG, AL de Andrade, ES Araujo, RM Oliveira, SA Silva, CM Martelli, F.Z., 1992. A randomized clinical trial with high dose of chloroquine for treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 34.

de Santana Filho, F.S., Arcanjo, A.R.D.L., Chehuan, Y.M., Costa, M.R., Martinez-Espinosa, F.E., Vieira, J.L., Barbosa, M.D.G.V., Alecrim, W.D., Alecrim, M.D.G.C., 2007. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1125–1126. doi:10.3201/eid1307.061386

De Souza, J., 1992. Epidemiological distribution of *Plasmodium falciparum* drug resistance in Brazil and its relevance to the treatment and control of malaria. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 87, 343–348.

de Souza, J.M., 1983. A phase II clinical trial of mefloquine in Brazilian male subjects. *Bull. World Health Organ.* 61, 815–820.

Dittrich, S., Mitchell, S.L., Blagborough, A.M., Wang, Q., Wang, P., Sims, P.F.G., Hyde, J.E., 2008. An atypical orthologue of 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase can provide the missing link in the folate biosynthesis pathway of malaria parasites. *Mol. Microbiol.* 67, 609–618. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.06073.x

Duah, N.O., Matrevi, S. a, de Souza, D.K., Binnah, D.D., Tamakloe, M.M., Opoku, V.S., Onwona, C.O., Narh, C. a, Quashie, N.B., Abuaku, B., Duplessis, C., Kronmann, K.C., Koram, K. a, 2013. Increased *pfmdr1* gene copy number and the decline in *pfcr* and *pfmdr1* resistance alleles in Ghanaian *Plasmodium falciparum* isolates after the change of anti-malarial drug treatment policy. *Malar. J.* 12, 377. doi:10.1186/1475-2875-12-377

Duraisingh, M.T., Cowman, A.F., 2005. Contribution of the *pfmdr1* gene to antimalarial drug-resistance. *Acta Trop.* 94, 181–190. doi:10.1016/j.actatropica.2005.04.008

Duraisingh, M.T., Jones, P., Sambou, I., von Seidlein, L., Pinder, M., Warhurst, D.C., 2000. The tyrosine-86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 108, 13–23. doi:10.1016/S0166-6851(00)00201-2

Durand, R., Jafari, S., Vauzelle, J., Delabre, J.F., Jesic, Z., Le Bras, J., 2001. Analysis of *pfcr* point mutations and chloroquine susceptibility in isolates of

Plasmodium falciparum. Mol. Biochem. Parasitol. 114, 95–102. doi:10.1016/S0166-6851(01)00247-X

Durrand, V., Berry, A., Sem, R., Glaziou, P., Beaudou, J., Fandeur, T., 2004. Variations in the sequence and expression of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (Pfcr1) and their relationship to chloroquine resistance in vitro. Mol. Biochem. Parasitol. 136, 273–285. doi:10.1016/j.molbiopara.2004.03.016

Eckstein-Ludwig, U., Webb, R.J., van Goethem, I.D.A., East, J.M., Lee, A.G., Kimura, M., O'Neill, P.M., Bray, P.G., Ward, S.A., Krishna, S., 2003. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. Nature 424, 957–961.

Fernández-Becerra, C., Pinazo, M.J., González, A., Alonso, P.L., del Portillo, H. a, Gascón, J., 2009. Increased expression levels of the *pvcrt-o* and *pvmr1* genes in a patient with severe *Plasmodium vivax* malaria. Malar. J. 8, 55. doi:10.1186/1475-2875-8-55

Fidock, D.A., Nomura, T., Talley, A.K., Cooper, R.A., Dzekunov, S.M., Ferdig, M.T., Ursos, L.M.B., bir Singh Sidhu, A., Naudé, B., Deitsch, K.W., Su, X., Wootton, J.C., Roepe, P.D., Wellems, T.E., 2000. Mutations in the *P. falciparum* Digestive Vacuole Transmembrane Protein PfCRT and Evidence for Their Role in Chloroquine Resistance. Mol. Cell 6, 861–871. doi:10.1016/S1097-2765(05)00077-8

Fitch, C.D., 2004. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. Life Sci. 74, 1957–1972. doi:10.1016/j.lfs.2003.10.003

Fohl, L.M., Roos, D.S., 2003. Fitness effects of DHFR-TS mutations associated with pyrimethamine resistance in apicomplexan parasites. Mol. Microbiol. 50, 1319–1327. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03756.x

Foley, M., Tilley, L., 1998. Quinoline Antimalarials: Mechanisms of Action and Resistance and Prospects for New Agents. Pharmacol. Ther. 79, 55–87. doi:10.1016/S0163-7258(98)00012-6

Foot, S., Thompson, J., Cowman, A., Kemp, D., 1989. Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P. falciparum*. Cell 57, 921–30.

Foot, S.J., Kyle, D.E., Martin, R.K., Oduola, A.M., Forsyth, K., Kemp, D.J.,

- Cowman, A.F., 1990. Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 345, 255–8. doi:10.1038/345255a0
- Galinski, M.R., Medina, C.C., Ingravallo, P., Barnwell, J.W., 1992. A reticulocyte-binding protein complex of *plasmodium vivax* merozoites. *Cell* 69, 1213–1226. doi:10.1016/0092-8674(92)90642-P
- Gama, B.E., Lacerda, M.V.G., Daniel-Ribeiro, C.T., Ferreira-da-Cruz, M. de F., 2011. Chemoresistance of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasites in Brazil: Consequences on disease morbidity and control. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. doi:10.1590/S0074-02762011000900020
- Gbotosho, G.O., Folarin, O.A., Bustamante, C., Pereira Da Silva, L.H., Mesquita, E., Sowunmi, A., Zalis, M.G., Oduola, A.M.J., Happi, C.T., 2012. Short Report: Different patterns of *pfprt* and *pfmdr1* polymorphisms in *P. falciparum* isolates from Nigeria and Brazil: The potential role of antimalarial drug selection pressure. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86, 211–213. doi:10.4269/ajtmh.2012.11-0368
- Genton, B., D'Acremont, V., Rare, L., Baea, K., Reeder, J.C., Alpers, M.P., Müller, I., 2008. *Plasmodium vivax* and Mixed Infections Are Associated with Severe Malaria in Children: A Prospective Cohort Study from Papua New Guinea . *PLoS Med.* 5, e127. doi:10.1371/journal.pmed.0050127
- Ginsburg, H., Geary, T.G., 1987. Current concepts and new ideas on the mechanism of action of quinoline-containing antimalarials. *Biochem. Pharmacol.* doi:10.1016/0006-2952(87)90038-4
- Golenser, J., Waknine, J.H., Krugliak, M., Hunt, N.H., Grau, G.E., 2006. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. *Int. J. Parasitol.* 36, 1427–1441. doi:10.1016/j.ijpara.2006.07.011
- Gonçalves, L.A., Cravo, P., Ferreira, M.U., 2014. Emerging *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in South America: An overview. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109, 534–539. doi:10.1590/0074-0276130579
- Griffing, S., Syphard, L., Sridaran, S., McCollum, a. M., Mixson-Hayden, T., Vinayak, S., Villegas, L., Barnwell, J.W., Escalante, a. a., Udhayakumar, V., 2010. *pfmdr1* Amplification and Fixation of *pfprt* Chloroquine Resistance Alleles in *Plasmodium falciparum* in Venezuela. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 1572–

1579. doi:10.1128/AAC.01243-09

Gueirard, P., Tavares, J., Thiberge, S., Bernex, F., Ishino, T., Milon, G., Franke-Fayard, B., Janse, C.J., Ménard, R., Amino, R., 2010. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 18640–5. doi:10.1073/pnas.1009346107

Harinasuta, T., Suntharasamai, P., Viravan, C., 1965. Chloroquine-resistant falciparum malaria in Thailand. *Lancet* 286, 657–660. doi:10.1016/S0140-6736(65)90395-8

Hay, S.I., Guerra, C.A., Tatem, A.J., Noor, A.M., Snow, R.W., 2004. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect. Dis.* 4, 327–336. doi:10.1016/S1473-3099(04)01043-6

Heinberg, A., Kirkman, L., 2015. The molecular basis of antifolate resistance in *Plasmodium falciparum*: looking beyond point mutations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1342, 10–18. doi:10.1111/nyas.12662

Heinberg, A., Siu, E., Stern, C., Lawrence, E. a., Ferdig, M.T., Deitsch, K.W., Kirkman, L. a., 2013. Direct evidence for the adaptive role of copy number variation on antifolate susceptibility in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* 88, 702–712. doi:10.1111/mmi.12162

Higgins, C.F., 2007. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* 446, 749–757.

Hoffmann, U., Kroemer, H.K., 2004. The ABC transporters MDR1 and MRP2: multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance. *Drug Metab. Rev.* 36, 669–701. doi:10.1081/DMR-200033473

Holmgren, G., Björkman, A., Gil, J.P., 2006. Amodiaquine resistance is not related to rare findings of pfmdr1 gene amplifications in Kenya. *Trop. Med. Int. Health* 11, 1808–12. doi:10.1111/j.1365-3156.2006.01742.x

Hurwitz, E., 1981. Resistance of *Plasmodium falciparum* malaria to sulfadoxine-pyrimethamine ('Fansidar') in a refugee camp in Thailand. *Lancet* 317, 1068–1070. doi:10.1016/S0140-6736(81)92239-X

Hyde, J., 2005. Drug-resistant malaria. *Trends Parasitol.* 21, 494–498. doi:10.1016/j.pt.2005.08.020

- Imwong, M., Pukrittayakamee, S., Pongtavornpinyo, W., Nakeesathit, S., Nair, S., Newton, P., Nosten, F., Anderson, T.J.C., Dondorp, a., Day, N.P.J., White, N.J., 2008. Gene Amplification of the Multidrug Resistance 1 Gene of *Plasmodium vivax* Isolates from Thailand, Laos, and Myanmar. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2657–2659. doi:10.1128/AAC.01459-07
- Imwong, M., Stepniewska, K., Tripura, R., Peto, T.J., Lwin, K.M., Vihokhern, B., Wongsan, K., von Seidlein, L., Dhorda, M., Snounou, G., Keereecharoen, L., Singhasivanon, P., Sirithiranont, P., Chalk, J., Nguon, C., Day, N.P.J., Nosten, F., Dondorp, A., White, N.J., 2016. Numerical Distributions of Parasite Densities During Asymptomatic Malaria. *J. Infect. Dis.* 213, 1322–1329. doi:10.1093/infdis/jiv596
- Inoue, J., Lopes, D., do Rosário, V., Machado, M., Hristov, A.D., Lima, G.F., Costa-Nascimento, M.J., Segurado, A.C., Di Santi, S.M., 2014. Analysis of polymorphisms in *Plasmodium falciparum* genes related to drug resistance: a survey over four decades under different treatment policies in Brazil. *Malar. J.* 13, 372. doi:10.1186/1475-2875-13-372
- Jambou, R., Legrand, E., Niang, M., Khim, N., Lim, P., Volney, B., Ekala, M., Bouchier, C., Esterre, P., Fandeur, T., Mercereau-Puijalon, O., 2005. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet* 366, 1960–3.
- Jani, D., Nagarkatti, R., Beatty, W., Angel, R., Slebodnick, C., Andersen, J., Kumar, S., Rathore, D., 2008. HDP—A Novel Heme Detoxification Protein from the Malaria Parasite. *PLOS Pathog.* 4, e1000053.
- Jiang, H., Patel, J.J., Yi, M., Mu, J., Ding, J., Stephens, R., Cooper, R.A., Ferdig, M.T., Su, X.Z., 2008. Genome-wide compensatory changes accompany drug-selected mutations in the *Plasmodium falciparum* crt gene. *PLoS One* 3. doi:10.1371/journal.pone.0002484
- Kapatos, G., Hirayama, K., Shimoji, M., Milstien, S., 1999. GTP Cyclohydrolase I Feedback Regulatory Protein Is Expressed in Serotonin Neurons and Regulates Tetrahydrobiopterin Biosynthesis. *J. Neurochem.* 72, 669–675. doi:10.1046/j.1471-4159.1999.0720669.x
- Karcz, S.R., Galatis, D., Cowman, A.F., 1993. Nucleotide binding properties of a P-glycoprotein homologue from *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58,

269–276. doi:10.1016/0166-6851(93)90048-3

Khim, N., Andrianaranjaka, V., Popovici, J., Kim, S., Ratsimbao, A., Benedet, C., Barnadas, C., Durand, R., Thellier, M., Legrand, E., Musset, L., Menegon, M., Severini, C., Nour, B.Y.M., Tichit, M., Bouchier, C., Mercereau-Puijalon, O., M??nard, D., 2014. Effects of Mefloquine use on *Plasmodium vivax* multidrug resistance. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1637–1644. doi:10.3201/eid2010.140411

Kidgell, C., Volkman, S.K., Daily, J., Borevitz, J.O., Plouffe, D., Zhou, Y., Johnson, J.R., Le Roch, K.G., Sarr, O., Ndir, O., Mboup, S., Batalov, S., Wirth, D.F., Winzeler, E.A., 2006. A systematic map of genetic variation in *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathog.* 2, 0562–0577. doi:10.1371/journal.ppat.0020057

Kim, Y.K., Kim, C., Park, I., Kim, H.Y., Choi, J.Y., Kim, J.M., 2011. Therapeutic Efficacy of Chloroquine in *Plasmodium vivax* and the *pvm-dr1* Polymorphisms in the Republic of Korea Under Mass Chemoprophylaxis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84, 532–534. doi:10.4269/ajtmh.2011.10-0486

Krishna, S., Woodrow, C.J., Staines, H.M., Haynes, R.K., Mercereau-Puijalon, O., 2006. Re-evaluation of how artemisinins work in light of emerging evidence of in vitro resistance. *Trends Mol. Med.* 12, 200–205. doi:10.1016/j.molmed.2006.03.005

Kümpornsin, K., Modchang, C., Heinberg, A., Ekland, E.H., Jirawatcharadech, P., Chobson, P., Suwanakitti, N., Chaotheing, S., Wilairat, P., Deitsch, K.W., Kamchonwongpaisan, S., Fidock, D.A., Kirkman, L.A., Yuthavong, Y., Chookajorn, T., 2014. Origin of robustness in generating drug-resistant malaria parasites. *Mol. Biol. Evol.* 31, 1649–1660. doi:10.1093/molbev/msu140

Lin, J.T., Patel, J.C., Kharabora, O., Sattabongkot, J., Muth, S., Ubalee, R., Schuster, A.L., Rogers, W.O., Wongsrichanalai, C., Juliano, J.J., 2013. *Plasmodium vivax* isolates from Cambodia and Thailand show high genetic complexity and distinct patterns of *P. vivax* multidrug resistance gene 1 (*pvm-dr1*) polymorphisms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 88, 1116–1123. doi:10.4269/ajtmh.12-0701

Llanos-Cuentas, A., Lacerda, M. V., Rueangweerayut, R., Krudsood, S., Gupta, S.K., Kochar, S.K., Arthur, P., Chuenchom, N., M??hrle, J.J., Duparc, S., Ugwuegbulam, C., Kleim, J.P., Carter, N., Green, J.A., Kellam, L., 2014. Tafenoquine plus chloroquine for the treatment and relapse prevention of *Plasmodium vivax* malaria (DETECTIVE): A multicentre, double-blind, randomised,

phase 2b dose-selection study. *Lancet* 383, 1049–1058. doi:10.1016/S0140-6736(13)62568-4

Looareesuwan, S., Viravan, C., Vanijanonta, S., Wilairatana, P., Suntharasamai, P., Charoenlarp, P., Arnold, K., Kyle, D., Webster, K., Canfield, C., 1992. Randomised trial of artesunate and mefloquine alone and in sequence for acute uncomplicated falciparum malaria. *Lancet* 339, 821–824. doi:10.1016/0140-6736(92)90276-9

Lorenz, C., Virginio, F., Aguiar, B.S., Suesdek, L., Chiaravalloti-Neto, F., 2015. Spatial and temporal epidemiology of malaria in extra-Amazonian regions of Brazil. *Malar. J.* 14, 408. doi:10.1186/s12936-015-0934-6

Lu, F., Lim, C.S., Nam, D.-H., Kim, K., Lin, K., Kim, T.-S., Lee, H.-W., Chen, J.-H., Wang, Y., Sattabongkot, J., Han, E.-T., 2011. Genetic polymorphism in *pvm-dr1* and *pvcrt-o* genes in relation to in vitro drug susceptibility of *Plasmodium vivax* isolates from malaria-endemic countries. *Acta Trop.* 117, 69–75. doi:10.1016/j.actatropica.2010.08.011

Machado, R.L.D., Calvosa, V.S.P., Ferreira, M.U., Rossit, A.R.B., dos Santos, E.J.M., Conway, D.J., others, 2004. Genetic structure of *Plasmodium falciparum* populations in the Brazilian Amazon region. *J. Infect. Dis.* 190, 1547–1555.

Marques, M.M., Costa, M.R.F., Santana Filho, F.S., Vieira, J.L.F., Nascimento, M.T.S., Brasil, L.W., Nogueira, F., Silveira, H., Reyes-Lecca, R.C., Monteiro, W.M., Lacerda, M.V.G., Alecrim, M.G.C., 2014. *Plasmodium vivax* Chloroquine Resistance and Anemia in the Western Brazilian Amazon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 342–347. doi:10.1128/AAC.02279-12

Mayxay, M., Nair, S., Sudimack, D., Imwong, M., Tanomsing, N., Pongvongsa, T., Phompida, S., Phetsouvanh, R., White, N.J., Anderson, T.J., Newton, P.N., 2007. Combined molecular and clinical assessment of *Plasmodium falciparum* antimalarial drug resistance in the Lao People's Democratic Republic (Laos). *Am J Trop Med Hyg* 77.

Melo, G.C., Monteiro, W.M., Siqueira, A.M., Silva, S.R., Magalhães, B.M.L., Alencar, A.C.C., Kuehn, A., Portillo, H. a. D., Fernandez-Becerra, C., Lacerda, M.V.G., 2014. Expression Levels of *pvcrt-o* and *pvm-dr-1* Are Associated with Chloroquine Resistance and Severe *Plasmodium vivax* Malaria in Patients of the Brazilian Amazon. *PLoS One* 9, e105922. doi:10.1371/journal.pone.0105922

Menard, R., Tavares, J., Cockburn, I.A., Markus, M., Zavala, F., Amino, R., 2013. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 701–712. doi:10.1038/nrmicro3111

Meshnick, S.R., 1990. Chloroquine as intercalator: a hypothesis revived. *Parasitol. Today* 6, 77–79. doi:10.1016/0169-4758(90)90215-P

Mideo, N., Reece, S.E., 2011. Plasticity in parasite phenotypes: evolutionary and ecological implications for disease. *Future Microbiol.* 7, 17–24. doi:10.2217/fmb.11.134

Ministério da Saúde, 2010. Guia prático de tratamento da malária no Brasil, Ministério da Saúde.

Mita, T., Tanabe, K., Kita, K., 2009. Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance. *Parasitol. Int.* 58, 201–209. doi:10.1016/j.parint.2009.04.004

Mockenhaupt, F.P., Ehrhardt, S., Eggelte, T.A., Agana-Nsiire, P., Stollberg, K., Mathieu, A., Markert, M., Otchwemah, R.N., Bienzle, U., 2005. Chloroquine-treatment failure in northern Ghana: roles of pfcr1 T76 and pfmdr1 Y86. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 99, 723–732. doi:10.1179/136485905X75395

Moore, D. V, Lanier, J.E., 1961. Observations on Two *Plasmodium Falciparum* Infections with an Abnormal Response to Chloroquine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 10, 5–9.

Mota, M.M., Pradel, G., Vanderberg, J.P., Hafalla, J.C., Frevert, U., Nussenzweig, R.S., Nussenzweig, V., Rodríguez, A., 2001. Migration of *Plasmodium* Sporozoites Through Cells Before Infection. *Science* (80-.). 291, 141–4. doi:10.1126/science.291.5501.141

Mueller, I., Galinski, M.R., Baird, J.K., Carlton, J.M., Kochar, D.K., Alonso, P.L., del Portillo, H.A., 2009. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect. Dis.* 9, 555–566. doi:10.1016/S1473-3099(09)70177-X

Mungthin, M., Bray, P.G., Ridley, R.G., Ward, S.A., 1998. Central Role of Hemoglobin Degradation in Mechanisms of Action of 4-Aminoquinolines, Quinoline Methanols, and Phenanthrene Methanols. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 2973–2977.

Nair, S., Miller, B., Barends, M., Jaidee, A., Patel, J., Mayxay, M., Newton, P., Nosten, F., Ferdig, M.T., Anderson, T.J.C., 2008. Adaptive copy number evolution in malaria parasites. *PLoS Genet.* 4. doi:10.1371/journal.pgen.1000243

Neiva, A., 1910. Formação de raça do hematozoário do impaludismo resistente á quinina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* doi:10.1590/S0074-02761910000100009

Ngalah, B.S., Ingasia, L.A., Cheruiyot, A.C., Chebon, L.J., Juma, D.W., Muiruri, P., Onyango, I., Ogony, J., Yeda, R.A., Cheruiyot, J., Mbuba, E., Mwangoka, G., Achieng, A.O., Ng'ang'a, Z., Andagalu, B., Akala, H.M., Kamau, E., 2015. Analysis of Major Genome Loci Underlying Artemisinin Resistance and pfmdr1 Copy Number in pre- and post-ACTs in Western Kenya. *Sci. Rep.* 5, 8308.

Nomura, T., Carlton, J.M., Baird, J.K., del Portillo, H.A., Fryauff, D.J., Rathore, D., Fidock, D.A., Su, X., Collins, W.E., McCutchan, T.F., Wootton, J.C., Wellems, T.E., 2001. Evidence for different mechanisms of chloroquine resistance in 2 *Plasmodium* species that cause human malaria. *J. Infect. Dis.* 183, 1653–61. doi:10.1086/320707

Noronha, E., Alecrim, M.G., Romero, G. a, Macêdo, V., 2000. RIII mefloquine resistance in children with falciparum malaria in Manaus, AM, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 33, 201–205. doi:S0037-86822000000200008 [pii]

Nosten, F., van Vugt, M., Price, R., Luxemburger, C., Thway, K.L., Brockman, A., McGready, R., ter Kuile, F., Looareesuwan, S., White, N.J., 2000. Effects of artesunate-mefloquine combination on incidence of *Plasmodium falciparum* malaria and mefloquine resistance in western Thailand: a prospective study. *Lancet* 356, 297–302. doi:10.1016/S0140-6736(00)02505-8

Ochong, E., Tumwebaze, P.K., Byaruhanga, O., Greenhouse, B., Rosenthal, P.J., 2013. Fitness consequences of *plasmodium falciparum* pfmdr1 polymorphisms inferred from ex vivo culture of Ugandan parasites. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 4245–4251. doi:10.1128/AAC.00161-13

Ochong, E.O., Broek, I.V.F.V. a. n. d. e. n., Kees, K. e. u. s., Nzila, A., 2003. Association between chloroquine and amodiaquine resistance and allelic variation in the *Plasmodium falciparum* multiple drug resistance 1 gene and the chloroquine resistance transporter gene in isolates from the upper Nile in southern Sudan. *Am J Trop Med Hyg* 69.

- Olliario, P., 2001. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. *Pharmacol. Ther.* 89, 207–219. doi:10.1016/S0163-7258(00)00115-7
- Olliario, P.L., Haynes, R.K., Meunier, B., Yuthavong, Y., 2001. Possible modes of action of the artemisinin-type compounds. *Trends Parasitol.* 17, 122–126. doi:10.1016/S1471-4922(00)01838-9
- Orjuela-Sanchez, P., de Santana Filho, F.S., Machado-Lima, a., Chehuan, Y.F., Costa, M.R.F., Alecrim, M.D.G.C., del Portillo, H. a., 2009. Analysis of Single-Nucleotide Polymorphisms in the crt-o and mdr1 Genes of *Plasmodium vivax* among Chloroquine-Resistant Isolates from the Brazilian Amazon Region. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 3561–3564. doi:10.1128/AAC.00004-09
- Peel, S., Bright, P., Yount, B., Handy, J., Baric, R., 1994. A strong association between mefloquine and halofantrine resistance and amplification, overexpression, and mutation in the P-glycoprotein gene homolog (pfmdr) of *Plasmodium falciparum* in vitro. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51, 648–58.
- Peterson, D.S., Walliker, D., Wellems, T.E., 1988. Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 9114–9118.
- Phyo, A.P., Nkhoma, S., Stepniewska, K., Ashley, E. a., Nair, S., McGready, R., Moo, C.L., Al-Saai, S., Dondorp, A.M., Lwin, K.M., Singhasivanon, P., Day, N.P.J., White, N.J., Anderson, T.J.C., Nosten, F., 2012. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: A longitudinal study. *Lancet* 379, 1960–1966. doi:10.1016/S0140-6736(12)60484-X
- Pickard, a. L., Wongsrichanalai, C., Purfield, a., Kamwendo, D., Emery, K., Zalewski, C., Kawamoto, F., Miller, R.S., Meshnick, S.R., 2003. Resistance to Antimalarials in Southeast Asia and Genetic Polymorphisms in pfmdr1 Resistance to Antimalarials in Southeast Asia and Genetic Polymorphisms in pfmdr1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2418–2423. doi:10.1128/AAC.47.8.2418
- Preechapornkul, P., Imwong, M., Chotivanich, K., Pongtavornpinyo, W., Dondorp, A.M., Day, N.P.J., White, N.J., Pukrittayakamee, S., 2009. *Plasmodium falciparum* pfmdr1 amplification, mefloquine resistance, and parasite fitness. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 1509–15. doi:10.1128/AAC.00241-08
- Price, R., Nosten, F., Luxemburger, C., ter Kuile, F., Paiphun, L., Price, R.,

Luxemburger, C., Chongsuphajaisiddhi, T., White, N., Price, R., Nosten, F., White, N., ter Kuile, F., 1996. Effects of artemisinin derivatives on malaria transmissibility. *Lancet* 347, 1654–1658. doi:10.1016/S0140-6736(96)91488-9

Price, R., Uhlemann, A., Brockman, a, 2004. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet* 364.

Price, R.N., Uhlemann, A.C., Brockman, A., McGready, R., Ashley, E., Phaipun, L., Patel, R., Laing, K., Looareesuwan, S., White, N.J., Nosten, F., Krishna, S., 2004. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet* 364. doi:10.1016/S0140-6736(04)16767-6

Reece, S.E., Ramiro, R.S., Nussey, D.H., 2009. Plastic parasites: sophisticated strategies for survival and reproduction? *Evol. Appl.* 2, 11–23. doi:10.1111/j.1752-4571.2008.00060.x

Reed, M.B., Saliba, K.J., Caruana, S.R., Kirk, K., Cowman, a F., 2000. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 403, 906–909. doi:10.1038/35002615

Ribacke, U., Mok, B.W., Wirta, V., Normark, J., Lundeberg, J., Kironde, F., Egwang, T.G., Nilsson, P., Wahlgren, M., 2007. Genome wide gene amplifications and deletions in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 155, 33–44. doi:10.1016/j.molbiopara.2007.05.005

Rieckmann, K.H., Davis, D.R., Hutton, D.C., 1989. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? *Lancet* 334, 1183–1184. doi:10.1016/S0140-6736(89)91792-3

Rohrbach, P., Sanchez, C.P., Hayton, K., Friedrich, O., Patel, J., Sidhu, A.B.S., Ferdig, M.T., Fidock, D.A., Lanzer, M., 2006. Genetic linkage of *pfmdr1* with food vacuolar solute import in *Plasmodium falciparum*. *EMBO J.* 25, 3000–3011. doi:10.1038/sj.emboj.7601203

Rubio, J.P., Cowman, A.F., 1996. The ATP-binding cassette (ABC) gene family of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Today* 12, 135–140. doi:10.1016/0169-4758(96)10003-X

Sá, J.M., Nomura, T., Neves, J. d’Arc, Baird, J.K., Wellems, T.E., del Portillo, H.A., 2005. *Plasmodium vivax*: allele variants of the *mdr1* gene do not associate with chloroquine resistance among isolates from Brazil, Papua, and monkey-adapted

strains, *Experimental Parasitology*. doi:10.1016/j.exppara.2004.12.005

Sá, J.M., Yamamoto, M.M., Fernandez-Becerra, C., de Azevedo, M.F., Papakrivos, J., Naudé, B., Wellems, T.E., del Portillo, H. a., 2006. Expression and function of pvcrt-o, a *Plasmodium vivax* ortholog of pfcr1, in *Plasmodium falciparum* and *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 150, 219–228. doi:10.1016/j.molbiopara.2006.08.006

Severini, C., Menegon, M., 2015. Resistance to antimalarial drugs: An endless world war against *Plasmodium* that we risk losing. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 3, 58–63. doi:10.1016/j.jgar.2015.02.002

Sidhu, A.B.S., Valderramos, S.G., Fidock, D.A., 2005. pfmdr1 mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* 57, 913–926. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04729.x

Sidhu, A.B.S., Verdier-Pinard, D., Fidock, D.A., 2002. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by pfcr1 mutations. *Science* 298, 210–213. doi:10.1126/science.1074045

Sirawaraporn, W., Sathitkul, T., Sirawaraporn, R., Yuthavong, Y., Santi, D.V., 1997. Antifolate-resistant mutants of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 1124–1129.

Snounou, G., White, N.J., 2004. The co-existence of *Plasmodium*: sidelights from *falciparum* and *vivax* malaria in Thailand. *Trends Parasitol.* 20, 333–339. doi:10.1016/j.pt.2004.05.004

Sturm, A., Menard, R., Heussler, V.T., 2006. Manipulation of Host Hepatocytes into Liver Sinusoids. *Science* (80-.). 1287. doi:10.1126/science.1129720

Surolia, N., Padmanaban, G., 1991. Chloroquine inhibits heme-dependent protein synthesis in *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 4786–4790.

Suwanarusk, R., Chavchich, M., Russell, B., Jaidee, A., Chalfein, F., Barends, M., Prasetyorini, B., Kenangalem, E., Piera, K.A., Lek-Uthai, U., Anstey, N.M., Tjitra, E., Nosten, F., Cheng, Q., Price, R.N., 2008. Amplification of pvmdr1 associated with multidrug-resistant *Plasmodium vivax*. *J. Infect. Dis.* 198, 1558–1564. doi:10.1086/592451

- Suwanarusk, R., Russell, B., Chavchich, M., Chalfain, F., Kenangalem, E., Kosaisavee, V., Prasetyorini, B., Piera, K. a., Barends, M., Brockman, A., Lek-Uthai, U., Anstey, N.M., Tjitra, E., Nosten, F., Cheng, Q., Price, R.N., 2007. Chloroquine Resistant *Plasmodium vivax*: In Vitro Characterisation and Association with Molecular Polymorphisms. *PLoS One* 2, e1089. doi:10.1371/journal.pone.0001089
- SVS/MS, 2015. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. *Bol. Epidemiol* 46, 43–2015. doi:10.1590/S1415-790X2004000400010
- Tinto, H., Guekoun, L., Zongo, I., Guiguemdé, R.T., D'Alessandro, U., Ouédraogo, J.B., 2008. Chloroquine-resistance molecular markers (Pfcrt T76 and Pfmdr-1 Y86) and amodiaquine resistance in Burkina Faso. *Trop. Med. Int. Health* 13, 238–40. doi:10.1111/j.1365-3156.2007.01995.x
- Tjitra, E., Anstey, N.M., Sugiarto, P., Warikar, N., Kenangalem, E., Karyana, M., Lampah, D. a., Price, R.N., 2008. Multidrug-Resistant *Plasmodium vivax* Associated with Severe and Fatal Malaria: A Prospective Study in Papua, Indonesia. *PLoS Med.* 5, e128. doi:10.1371/journal.pmed.0050128
- Travassos, M.A., Laufer, M.K., 2009. Resistance to Antimalarial Drugs: Molecular, Pharmacologic, and Clinical Considerations. *Pediatr Res* 65, 64R–70R.
- Triglia, T., Cowman, A.F., 1994. Primary structure and expression of the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7149–7153. doi:10.1073/pnas.91.15.7149
- Triglia, T., Foote, S.J., Kemp, D.J., Cowman, A.F., 1991. Amplification of the multidrug resistance gene *pfmdr1* in *Plasmodium falciparum* has arisen as multiple independent events. *Mol. Cell. Biol.* 11, 5244–5250. doi:10.1128/MCB.11.10.5244
- Triglia, T., Menting, J.G.T., Wilson, C., Cowman, A.F., 1997. Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 13944–13949.
- van Es, H.H., Karcz, S., Chu, F., Cowman, A.F., Vidal, S., Gros, P., Schurr, E., 1994. Expression of the plasmodial *pfmdr1* gene in mammalian cells is associated with increased susceptibility to chloroquine. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2419–2428.
- Vancer Jagt, D.L., Hunsaker, L.A., Campos, N.M., 1986. Characterization of a

hemoglobin-degrading, low molecular weight protease from *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 18, 389–400. doi:10.1016/0166-6851(86)90095-2

Vargas-Rodríguez, R.D.C.M., da Silva Bastos, M., Menezes, M.J., Orjuela-Sánchez, P., Ferreira, M.U., 2012. Single-nucleotide polymorphism and copy number variation of the multidrug resistance-1 locus of *Plasmodium vivax*: local and global patterns. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87, 813–21. doi:10.4269/ajtmh.2012.12-0094

Walsh, D.S., Looareesuwan, S., Wilairatana, P., Heppner, D.G., Tang, D.B., Brewer, T.G., Chokejindachai, W., Viriyavejakul, P., Kyle, D.E., Milhous, W.K., Schuster, B.G., Horton, J., Braitman, D.J., Brueckner, R.P., 1999. Randomized Dose-Ranging Study of the Safety and Efficacy of WR 238605 (Tafenoquine) in the Prevention of Relapse of *Plasmodium vivax* Malaria in Thailand. *J. Infect. Dis.* 180, 1282–1287. doi:10.1086/315034

Warhurst, D.C., 1987. Antimalarial interaction with ferriprotoporphyrin IX monomer and its relationship to activity to the blood schizontocides. *Ann Trop Med Parasitol* 81, 65–7.

Wellems, T.E., Plowe, C. V, 2001. Chloroquine-resistant malaria. *J. Infect. Dis.* 184, 770–776. doi:10.1136/bmj.2.5805.108-a

White, G.B., 2017. Essential malariology (2nd edition). *Parasitol. Today* 2, 28. doi:10.1016/0169-4758(86)90081-5

White, N.J., 2008. Qinghaosu (Artemisinin): The Price of Success. *Science* (80-.). 320, 330 LP-334.

White, N.J., 1997. Assessment of the pharmacodynamic properties of antimalarial drugs in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 1413–1422.

WHO, 2015. World Malaria Report 2015.

WHO, 2013. Malaria. *Nature* 284. doi:10.1038/nature.2013.13535

WHO, 2001. Antimalarial drug combination therapy Report of a WHO Technical Consultation. *World Heal. Organ. Geneva WHO* 36.

Wongsrichanalai, C., Pickard, A.L., Wernsdorfer, W.H., Meshnick, S.R., 2002. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet. Infect. Dis.* 2, 209–18. doi:10.1016/S1473-3099(02)00239-6

Wootton, J.C., Feng, X., Ferdig, M.T., Cooper, R.A., Mu, J., Baruch, D.I., Magill, A.J., Su, X., 2002. Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 418, 320–323.

Zalis, M.G., Pang, L., Silveira, M.S., Milhous, W.K., Wirth, D.F., 1998. Characterization of *Plasmodium falciparum* isolated from the Amazon region of Brazil: Evidence for quinine resistance. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58, 630–637.