

Aspectos de genética molecular da resistência aos fármacos antimaláricos

Pedro Cravo¹, Virgílio E. do Rosário¹

¹Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais/UNL, Rua da Junqueira 96, 1349-008 Lisboa

A malária, classificada como uma das doenças da pobreza, é conhecida pela sua elevada morbidade e mortalidade, acarretando consigo problemas socio-económicos acrescidos e contribuindo para um menor desenvolvimento dos países afectados. A falta de uma vacina eficaz, o problema da resistência aos fármacos e a falta de investimento na procura e aplicação de novos compostos, contribuem para o adiamento da solução do controlo desta infecção. Este artigo abordará principalmente o fenómeno da resistência aos antimaláricos, a sua base genética e o modo como as novas tecnologias de genética molecular poderão ajudar à resolução de alguns dos problemas associados a esta doença.

A malária

Os protozoários causadores de malária são transmitidos por mosquitos do género *Anopheles* (Figura 1). Existem quatro espécies de parasitas infectantes para o Homem: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. Todas são parasitas intra-eritrocitários, sendo o *P. falciparum* a espécie mais letal (Figura 2), dado poder causar anemia grave e uma condição conhecida como malária cerebral, que pode causar a morte em poucas horas se não detectada e tratada atempadamente. Calcula-se que em todo o mundo, cerca de 500 milhões de pessoas se encontrem em risco constante de sofrer a forma aguda da doença (Figura 3), de entre as quais 0.5-2.5 milhões perderão a vida em cada ano. Mais de 75% destas fatalidades ocorrem em crianças Africanas (Wongsrichanalai *et al.*, 2002), onde se calcula que uma criança morra de malária a cada 30 segundos.

O controlo da malária deveria assentar, idealmente, numa vacina (Letvin *et al.*, 2001) economicamente acessível e eficaz, que permitisse reduzir a incidência e/ou prevalência da doença para níveis negligenciáveis. No entanto, a síntese, produção e implementação de vacinas antimaláricas têm encontrado apenas sucesso limitado, devido a diversas dificuldades de ordem científica, logística e financeira. Nomeadamente, os seguintes problemas têm adiado a produção de uma vacina anti-malárica: a caracterização adequada da resposta imune nas diferentes fases do ciclo de vida do parasita, a identificação de epitopos desencadeadores de respostas protectoras universais, a extensa diversidade antigénica dos parasitas, dificuldades de implementação e sustentabilidade de programas de vacinação em países

tropicais e falta de apoio financeiro para programas de I & D (Investigação e Desenvolvimento) nesta área.

Enquanto se espera por uma vacina, o controlo da malária tem-se baseado em métodos convencionais, tais como as medidas direccionadas contra o vector anofelino e o recurso a diversos medicamentos anti-maláricos tanto para cura como para profilaxia. Grande parte dos esforços têm sido centrados na prevenção do contacto entre humanos e mosquitos adultos, quer pela utilização de redes e cortinas mosquiteiras impregnadas com insecticidas, quer por pulverização intra-domiciliária com insecticida residual. Durante os anos 40, a descoberta do DDT incutiu esperança para a erradicação global da malária, o que levou à implementação de extensos programas de pulverizações (em particular intradomiciliárias) em áreas endémicas de malária por todo o mundo. O programa pareceu ter algum sucesso inicial, dado que a malária foi eliminada ou reduzida em 77 países (incluindo Portugal, Itália e Cabo Verde). No entanto, e passado pouco tempo, o número de casos registados recuperou e excedeu até, níveis anteriores, principalmente no continente Africano (Shell, 1997). Pensa-se que o uso excessivo, e por vezes inadequado, do DDT possa ter sido a principal causa da selecção de mosquitos resistentes ao insecticida. Em todo o caso, em grande parte das regiões endémicas para malária, o uso de redes e cortinas mosquiteiras impregnadas com outros insecticidas (piretróides) continua a mostrar-se relativamente barato e eficaz na redução do impacto da doença (Diallo *et al.*, 1999; White, 1999).

A resistência aos anti-maláricos

Actualmente, a utilização de fármacos anti-maláricos representa a solução mais eficaz no controlo da malária. No entanto, no decorrer das últimas décadas, o aparecimento e propagação de parasitas resistentes à maior parte dos anti-maláricos disponíveis, tem-se revelado como o principal obstáculo a uma eficiente contenção da malária (Tabela 1). Muitos dos compostos disponíveis tais como a cloroquina e Fansidar (sulfadoxina-pirimetamina), são relativamente acessíveis, fáceis de distribuir e eficazes, mas o problema da resistência tem vindo a tornar redundante a sua utilização. Mais preocupante é que em muitas das áreas endémicas para malária, o parasita *P. falciparum* apresenta fenótipos de insensibilidade



Figura 1 – Mosquito vector de malária, *Anopheles*

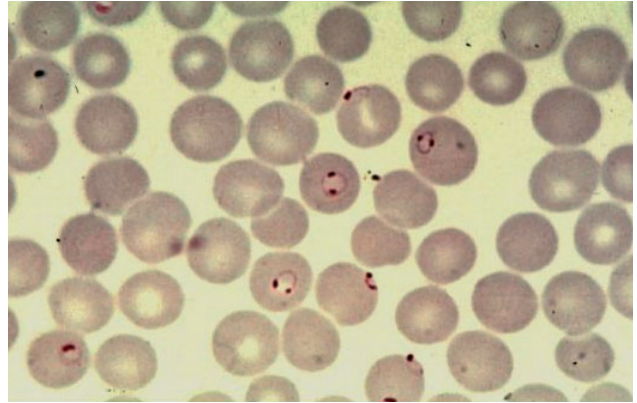


Figura 2 - Eritrócitos parasitados com *P. falciparum*

a dois ou mais fármacos em simultâneo, um fenómeno conhecido por MDR (multi-drug resistance). Por estes motivos, torna-se fundamental compreender quais os mecanismos utilizados pelo *P. falciparum* de modo a evitar os efeitos tóxicos dos fármacos. Esses dados poderão facilitar a implementação de estratégias racionais na síntese de novos fármacos e na re-estruturação de compostos existentes. Para além disso, o conhecimento dos mecanismos de resistência poderá ser aplicado na monitorização e controlo do aparecimento e propagação da quimio-resistência em populações parasitárias naturais.

A resistência aos antimaláricos é definida pela O.M.S. (Organização Mundial de Saúde) como “a capacidade que um parasita possui, para sobreviver e se multiplicar na presença de concentrações de fármaco que normalmente destruiriam parasitas da mesma espécie ou preveniriam a sua multiplicação” (W.H.O., 1963). A quimio-resistência em malária pode depender de vários factores, tais como a administração inadequada de fármacos, propriedades intrínsecas ao composto utilizado, nível de imunidade do hospedeiro (Cravo *et al.*, 2001), farmacogenética e

má nutrição (White, 1999; Hess *et al.*, 1997). A nível do parasita *P. falciparum*, a quimio-resistência surge quando um ou mais indivíduos constituintes de uma população parasitária possuem uma ou mais mutações que lhe proporcionam uma vantagem selectiva na presença de concentrações de fármaco que em condições normais inibiriam a proliferação da fracção sensível da população parasitária (Peters, 1990).

Avaliação da sensibilidade aos fármacos anti-maláricos

A monitorização da prevalência de parasitas resistentes a um determinado composto, a nível regional e individual é um factor determinante no controlo da malária. Uma vez que tenham sido estabelecidas estas prevalências, poder-se-á então escolher e aplicar o protocolo terapêutico apropriado. A escolha da terapêutica correcta é um factor fundamental dado que i) garante que os indivíduos tratados não apresentem sintomas da doença e ii) interrompe a pressão selectiva sobre os parasitas resistentes

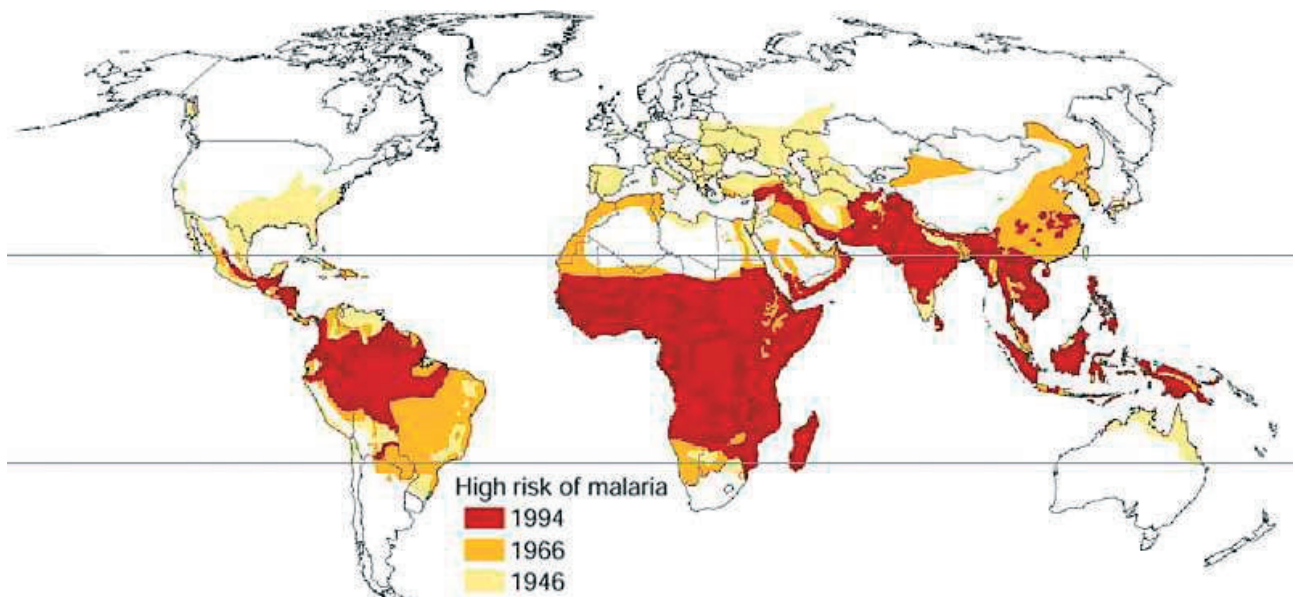


Figura 3 – Evolução da distribuição da malária

ao fármaco utilizado previamente.

Os métodos tradicionais de avaliação da sensibilidade do *P. falciparum* a antimaláricos baseiam-se sobretudo em testes *in vitro* e/ou *in vivo* (ver W.H.O., 2001 para revisão).

Os testes *in vivo* consistem no tratamento de um grupo de indivíduos sintomáticos e parasitados, com concentrações de fármaco pré-determinadas, seguido de uma monitorização da resposta clínica e/ou parasitológica durante um determinado período. Este tipo de teste possui a vantagem de ser possível ter em conta as interações entre parasita e hospedeiro, reflectindo por isso as situações clínicas e epidemiológicas reais. No entanto, apresenta uma série de problemas que têm vindo a limitar a sua utilização. Nomeadamente, é particularmente difícil i) o acompanhamento dos doentes durante o período total de “follow-up” (mínimo 7 dias), ii) as dificuldades burocráticas de implementação dos testes no terreno (a nível de comissões de ética, regras hospitalares), iii) problemas na distinção entre recrudescência e re-infecção e iv) o controlo individual da ingestão de fármacos não prescritos para o estudo.

Os testes *in vitro* baseiam-se na recolha de sangue de um paciente parasitado de onde os parasitas são expostos a quantidades precisas de um determinado composto numa placa de micro-cultura. Tal permite observar o grau de inibição de crescimento e/ou morte parasitária, reflectindo o grau de susceptibilidade dos parasitas a um determinado fármaco e a uma determinada concentração. Os testes *in vitro*, apresentam também alguns problemas de execução, tais como i) problemas na manutenção de condições de esterilidade (especialmente em estudos de campo), ii) dificuldade no controlo dos níveis de fármaco nas culturas devido à ingestão prévia de antimaláricos por parte do doente iii) as técnicas invasivas de recolha de sangue envolvidas, iv) limitação no número de culturas simultâneas, v) reproductibilidade dos resultados e vi) ausência de uma correlação total

Tabela 1 – Datas de introdução e primeiros casos registados de resistência de *P. falciparum* aos antimaláricos mais utilizados (adaptado de Wongsrichanalai *et al.*, 2002).

| Fármaco | Introduzido em | Primeiro registo de resistência | Diferença (anos) |
|--------------------------|----------------|---------------------------------|------------------|
| Quinino | 1632 | 1910 | 278 |
| Cloroquina | 1945 | 1957 | 12 |
| Proguanil | 1948 | 1949 | 1 |
| Sulfadoxina-pirimetamina | 1967 | 1967 | 0 |
| Mefloquina | 1977 | 1982 | 5 |
| Atovaquona | 1996 | 1996 | 0 |
| Artemisinina e derivados | 1980 | - | - |

com a situação *in vivo*.

Durante a última década, a procura de métodos alternativos que permitam prever rapidamente a resposta dos parasitas aos antimaláricos, tem sido primariamente centrada na procura de marcadores moleculares que permitam, a partir de uma única reacção de PCR (reacção em cadeia da polimerase), ou seguida de incubação com uma enzima de restrição (PCR-RFLP), a detecção da(s) mutação(ões) causadora(s) da resistência a um determinado composto.

A identificação de mutações em genes responsáveis por resistência a antimaláricos

A procura de mutações em genes do parasita responsáveis por quimio-resistência pode ser efectuada através da utilização de parasitas humanos como o *P. falciparum* ou pelo auxílio de modelos animais de malária. Mais especificamente, a utilização de modelos murinos de malária neste tipo de estudos tem sido fundamental (Carlton *et al.*, 2001).

As próximas secções apresentam informação sobre os determinantes genéticos de resistência aos compostos mais utilizados no combate à malária (resumido na Tabela 2).

Tabela 2 – Marcadores moleculares associados à quimio-resistência em *P. falciparum*

| Fármaco | Marcador | Associação com resistência clínica (<i>in vivo</i>) |
|--------------------------|---|---|
| Cloroquina | <i>Pfcr</i> T76 | Bastante elevada |
| | <i>Pfmdr1</i> Y86, F184, C1034, D1042, Y1246 | Ocasional |
| Sulfadoxina-pirimetamina | <i>pfDHFR</i> 108, 51, 59, 164 <i>pfDHPS</i> 436, 437, 540, 581, 623 | Elevada (<i>pfDHFR</i> N108 essencial para a resistência à pirimetamina. Outras mutações aumentam resistência) |
| Mefloquina e quinino | <i>Pfmdr1</i> 86, 184, 1034, 1042, 1246 | Ocasional |
| Artemisinina | <i>Pfmdr1</i> 184, 1034, 1042, 1246 ? <i>PfTCTP</i> ? | Não existe resistência clínica |

Cloroquina

Sintetizada na Alemanha durante a Segunda Guerra Mundial, a cloroquina seria “o fármaco perfeito”; altamente eficaz contra formas eritrocitárias de *P. falciparum*, de baixo custo e sem efeitos secundários. Depressa se tornou no fármaco mais popular e extensivamente utilizado em praticamente todas as regiões endémicas de malária. Os primeiros *foci* de resistência à cloroquina

surgiram no final dos anos 50, em dois lugares geograficamente distantes: a Colômbia (Young and Moore, 1961) e Tailândia (Harinasuta *et al.*, 1962). A partir do focus inicial na Colômbia, os parasitas resistentes alastraram-se para sul do continente Americano, e da Tailândia, difundiram-se para Ocidente, atingindo o continente Africano no final dos anos 70. Desde então, o alastramento da resistência à cloroquina tem sido lento mas implacável e está hoje bem estabelecida na maioria das regiões onde existe malária.

O mecanismo de acção da cloroquina baseia-se na interferência do fármaco no mecanismo de digestão da hemoglobina por parte dos parasitas. O *P. falciparum* digere hemoglobina dentro do seu vacúolo digestivo de onde a proteólise desta proteína resulta na formação de um produto denominado hemo ou ferritoporfirina IV (FP). A FP é altamente tóxica para o parasita dado causar um aumento da permeabilidade das membranas, conduzindo eventualmente à lise celular (Slater *et al.*, 1991). Por esta razão, o parasita possui um mecanismo enzimático de destoxificação celular, que consiste na polimerização da FP num cristal inerte (hemozoína). Pensa-se que a cloroquina actua por inibição funcional de uma ou mais das enzimas envolvidas neste processo, impedindo assim a destoxificação da FP e originando a morte dos parasitas (Ginsburg *et al.*, 1999).

Foi já demonstrado que parasitas resistentes à cloroquina acumulam níveis de fármaco bastante inferiores aos acumulados por parasitas sensíveis, donde se pode concluir que a resistência a este composto resulta da exclusão do fármaco do local de acção, em oposição a uma mudança no seu alvo terapêutico (Yayon *et al.*, 1984). Por esta razão, a maior parte dos estudos dos mecanismos de resistência tem sido focada na procura de mutações em genes codificantes de transportadores de membrana. Dois genes, presentes na membrana do vacúolo digestivo do parasita (local de actuação da cloroquina), têm sido alvo de inumeros estudos: os genes *Pfmdr1* e o *Pfcr1* (*P. falciparum* chloroquine resistance transporter). Um trabalho recente de transfecção genética pareceu indicar que mutações pontuais no gene *Pfmdr1*, codificando alterações nos aminoácidos 1034, 1042 e 1246, podem modular a sensibilidade à cloroquina (Reed *et al.*, 2000). No entanto, foi demonstrada uma segregação independente entre os fenótipos resistência/susceptibilidade à cloroquina e o gene *pfmdr1*, a partir da análise de um cruzamento genético entre um parasita sensível, *P. falciparum* HB3, e outro resistente, Dd2 (Wellems *et al.*, 1990). Além disso, não parece existir uma associação evidente entre o gene *Pfmdr1* e as respostas à cloroquina em populações parasitárias naturais (Bhattacharya *et al.*, 1997; von Seidlein *et al.*, 1997; Pova *et al.*, 1998; Lopes *et al.*, 2002a, b).

o que sugere fortemente que outros genes possam estar envolvidos (no fenótipo de resistência. De facto, um trabalho recente e detalhado de análise de “linkage” e mapeamento cromossómico de clones originários do

cruzamento HB3 x Dd2, permitiu a identificação de outro gene, *Pfcr1*, no qual uma mutação no aminoácido 76 (*Pfcr1* K76T), apresenta uma correlação completa com a resistência à cloroquina em isolados de *P. falciparum* recolhidos em regiões endémicas (Fidock *et al.*, 2000; Babiker *et al.*, 2001; Djimde *et al.*, 2001; Lopes *et al.*, 2002a, b). Em concordância, o papel importante da mutação *Pfcr1* K76T na indução de resistência ao fármaco foi posteriormente confirmado através de experiências de transfecção genética (Fidock *et al.*, 2000; Sidhu *et al.*, 2002).

Quinino e mefloquina

O quinino e a mefloquina serão abordados na mesma secção, dado existirem indícios de relações de resistência cruzada entre os dois compostos e devido ao facto de ambos parecerem partilhar alguns dos mecanismos genéticos de resistência.

O quinino é o antimalárico mais antigo conhecido no Ocidente, podendo ser extraído da casca de várias espécies de árvores do género *Cinchona*. O composto quinino foi isolado da casca da árvore em 1820 pelos químicos franceses Pierre Pelletier e Joseph Caventou, mas só foi sintetizado em laboratório pela primeira vez em meados dos anos 40 (citado em Wernsdorfer & McGregor, 1988). O quinino tem um efeito potente a nível dos estadios intra-eritrocitários de *P. falciparum*, mas o seu curto tempo de vida, implica que o fármaco não possa ser utilizado como profilático. O quinino apresenta também uma elevada toxicidade e efeitos secundários adversos e por estas razões, o seu uso tem sido praticamente limitado ao tratamento de casos de malária grave. Os primeiros registos de suposta resistência de *P. falciparum* ao quinino datam de 1910 (citado em Peters, 1987), mas a resistência a este composto parece não ter sofrido uma elevada propagação (Meshnick, 1997).

A mefloquina, um composto derivado do quinino, foi produzida durante os anos 70 pelo exército Norte Americano, com o objectivo principal de combater a resistência aos fármacos existentes na época (Peters, 1998). No entanto, estudos iniciais em modelos roedores de malária indicaram que a resistência ao fármaco poder-se-ia tornar um problema grave, caso este fosse introduzido em regime monoterapêutico (Peters, 1977). Os primeiros casos de *P. falciparum* resistente à mefloquina surgiram no princípio dos anos 80 e actualmente a resistência a este composto é um obstáculo sério a um eficiente controlo da malária em diversas áreas geográficas (Wernsdorfer, 1994). Curiosamente, verificou-se um fenómeno de resistência intrínseca em áreas onde a mefloquina nunca havia sido utilizada (White, 1994), sendo este um resultado provável da pressão selectiva por outros fármacos (quinino possivelmente).

Contrariamente à SP, os mecanismos de acção e da resistência ao quinino e mefloquina não estão ainda

totalmente clarificados. Tem sido assumido que estes compostos interferem com mecanismos de digestão da hemoglobina no vacúolo digestivo dos parasitas (Geary *et al.*, 1986), e que a sua passagem para o interior do vacúolo é facilitada pela acção de um transportador activo (Vanderkooi *et al.*, 1988). Deste modo, tem sido investigado o papel de um gene denominado *Pfmdr1* (*P. falciparum* multi-drug resistance 1), codificante para uma proteína (Pgh-1) da família dos transportadores ABC, presente na membrana do vacúolo digestivo do parasita. Mutações pontuais e/ou amplificação do gene *Pfmdr1* têm sido implicadas em alguns, mas não todos, os casos de resistência ao quinino e à mefloquina em *P. falciparum*. Os primeiro estudo sobre o envolvimento deste gene na resistência a estes compostos demonstrou que o gene sofrera uma amplificação (2-4 vezes) numa linha de parasitas, *P. falciparum* W2-MEF, que havia sido seleccionada *in vitro* para a resistência à mefloquina (Wilson *et al.*, 1989). Estudos subsequentes do mesmo tipo, mostraram que acrescida à resistência à mefloquina, os mutantes seleccionados apresentavam também uma diminuição de susceptibilidade ao quinino (Cowman, *et al.*, 1994; Peel *et al.*, 1994), indicando a existência de um fenómeno de resistência cruzada entre os dois fármacos. No entanto, em isolados de *P. falciparum* colhidos a partir de indivíduos em zonas endémicas, a resistência à mefloquina e quinino nem sempre é acompanhada da super-expressão do gene *Pfmdr1*, sugerindo a existência de outros mecanismos de resistência. Um estudo recente no modelo de malária roedor *Plasmodium chabaudi*, utilizando a análise de cruzamentos genéticos, permitiu concluir que a amplificação do gene *mdr1* é um fenómeno importante na geração de resistência à mefloquina, mas que pelo menos mais um gene estará envolvido (Cravo *et al.*, 2002). Para além da amplificação genética, e em alternativa alguns trabalhos de campo (Lopes *et al.*, 2002a; Price *et al.*, 1999; Zalis *et al.*, 1998), análise de cruzamentos genéticos (Duraisingh *et al.*, 2000) e experiências de transfecção genética (Reed *et al.*, 2000), parecem indicar que a sensibilidade à mefloquina e quinino pode também ser modulada por mutações pontuais no gene *Pfmdr1* (Tabela 2). No entanto, outros estudos parecem não encontrar qualquer correlação. Estas observações sugerem a existência de uma complexa relação entre a sensibilidade à mefloquina e quinino e expressão diferencial e/ou mutações pontuais no gene *Pfmdr1*. É provável que a resistência a estes fármacos consista de um mecanismo complexo onde vários genes estarão diferencialmente implicados em níveis de resistência diferentes.

Sulfadoxina-pirimetamina (SP)

A combinação SP foi introduzida para o tratamento de *P. falciparum* de um modo globalizado durante os anos 60. Rapidamente, no entanto, surgiram os primeiros casos publicados de resistência na fronteira da Tailândia-Cambodja (Wongsrichanalai *et al.*, 2002). Actualmente,

existem já níveis elevados de resistência a este composto em grande parte do sudoeste Asiático, sul da China e Amazonas (Wongsrichanalai *et al.*, 2002). A resistência à SP só atingiu o continente Africano nos anos 80, e embora existam ainda áreas onde o parasita é sensível ao fármaco, a sua eficácia está comprometida.

O mecanismo genético de resistência à SP é o único que se encontra bem elucidado, estando directamente relacionado com o mecanismo de acção do fármaco. Os parasitas da malária necessitam de sintetizar cofactores de folato *de novo*, uma vez que parecem ser incapazes de utilizar os do hospedeiro (exógenos) (Ferone, 1977). Para o fazerem, requerem um suplemento de dihidrofolato e de tetrahidrofolato que é produzido através da via da biossíntese do folato. Este processo envolve várias vias metabólicas catalizadas por diversas enzimas (ver Sirawaraporn *et al.*, 1997 para revisão); duas destas, a DHPS (dihidropteroato sintase) e a DHFR-TS (enzima bi-funcional dihidrofolato redutase-timidilato sintase), são alvos da combinação SP. A sulfadoxina e a pirimetamina ligam-se covalentemente à DHPS e DHFR-TS, respectivamente, inibindo o seu funcionamento, o que resulta na morte dos parasitas por interrupção da síntese de DNA. Assim, foi já claramente demonstrado através de estudos em *P. falciparum* e modelos murinos de malária, que a resistência à SP surge através de mutações pontuais nas enzimas DHPS e DHFR-TS (Carlton *et al.*, 2001; Wongsrichanalai *et al.*, 2002). Estas mutações parecem diminuir a afinidade do fármaco para o centro activo das enzimas, tendo sido observadas por todo o mundo mutações em vários codões, em ambas as enzimas (Tabela 2). De um modo geral, uma mutação no gene *Pfdhfr-ts* (não sei se é correcto mas á so para uniformizar com p.ex. *Pfmdr 1*), onde uma serina no codão 108 é substituída por uma asparagina, parece ser suficiente e precursora de resistência à pirimetamina e, conseqüentemente, à SP (Sibley *et al.*, 2001). O facto de apenas uma única mutação ser suficiente para alterar a sensibilidade à pirimetamina, explica a razão pela qual a resistência de *P. falciparum* a este composto tenha surgido imediatamente após o seu uso ter sido generalizado (Tabela 1).

A utilização da informação molecular A investigação dos mecanismos moleculares de quimio-resistência parasitária é relevante para o combate à malária, sobretudo a causada por *P. falciparum*, por duas razões principais: i) permite uma identificação racional de novos alvos terapêuticos, ii) e permite que se estabeleçam novos métodos de identificação/ diagnóstico da resistência aos antimaláricos, individualmente, por paciente. Conseqüentemente, seria possível efectuar uma avaliação da frequência de “mutações resistentes” numa determinada região endémica. Assumindo que exista uma correlação total (ou pelo menos elevada) entre uma determinada mutação ou mutações devidamente caracterizadas e a resistência a um determinado composto antimalárico, espera-se que a frequência de alelos

mutantes reflecta, aproximadamente, a frequência da população parasitária fenotipicamente resistente. Assim, a detecção das mutações dos parasitas directamente associados à resistência, obtida através de técnicas moleculares e a sua relação com o fenótipo “resistência”, apresenta vantagens em relação aos métodos tradicionais utilizados na mesma identificação (*i.e.* testes *in vitro* e testes *in vivo*). Entre outras, estas vantagens incluem: i) o facto de ser necessária apenas uma quantidade de amostra de sangue infectado do paciente para estudo molecular posterior, em oposição à necessidade de se utilizarem parasitas em cultura *in vitro*, que requer maior volume de sangue a colher; ii) independência da intervenção de factores ambientais (condições de cultura adequadas) e do hospedeiro (influência da imunidade sobre o crescimento parasitário, mesmo em caso de resistência aos antimaláricos); e iii) o elevado número de testes realizados em curtos espaços de tempo. No entanto, é importante realçar que o elevado custo dos equipamentos e reagentes utilizados nestas técnicas e a formação contínua de pessoal, nas técnicas de biologia molecular, representam factores restrictivos na utilização destas ferramentas nestes estudos, principalmente nos países em vias de desenvolvimento com recursos limitados. Além disso, é de ter em conta que a presença de um determinado polimorfismo genético poderá não ser suficiente para predizer com total certeza a resposta a um determinado fármaco *in vivo* (Tabela 2). Por estas razões, a avaliação da prevalência de parasitas resistentes a um determinado antimalárico, numa área geográfica definida, deve ainda hoje, ser uma actividade de complementação, utilizando informação resultante da combinação de testes *in vitro*, *in vivo* e análise molecular. Deste modo, poder-se-ão efectuar comparações entre os resultados obtidos pelos diferentes métodos, o que permite estabelecer os valores predictivos de resistência relativos um determinado marcador molecular. Um bom exemplo é a utilização do marcador *Pfcr* K76T para a monitorização da resistência à cloroquina em regiões endémicas para *P. falciparum*. Vários estudos de campo recentes parecem indicar que este marcador é altamente indicativo quer de resistência *in vitro* e quer de falência terapêutica em doentes infectados com *P. falciparum* resistente à cloroquina (Wellems & Plowe, 2001). O resultado de um destes estudos, efectuado no Mali (Djimde *et al.*, 2001), serviu inclusivamente para que a política terapêutica da malária fosse re-ajustada naquele País, realçando assim a importância prática da utilização da informação molecular no controlo da malária.

Conclusões

Durante a última década, os progressos no conhecimento da base molecular da resistência do *P. falciparum* a diversos antimaláricos têm sido bastante significativos. Um conjunto de mutações nos genes *Pfdhfr* e *Pfdhps* têm sido apontadas como as causas de resistência à SP (sulfa-

doxina-pirimetamina), enquanto os genes *Pfmdr1* e *Pfcr* têm sido implicados na resistência a outros compostos (Tabela 2). Mutações neste último têm sido fortemente associadas à resistência à cloroquina enquanto que polimorfismos no *Pfmdr1* parecem alterar a susceptibilidade dos parasitas à mefloquina, quinino, cloroquina e outros fármacos de importância no controlo da malária. De um modo geral, a combinação de várias mutações pontuais (e amplificação génica?) em genes específicos do *P. falciparum* parece ser necessária para um fenótipo de quimio-resistência.

A utilização de ferramentas moleculares no diagnóstico da quimio-resistência em malária está ainda numa fase inicial. O futuro dever-se-á basear sobretudo na identificação de novos marcadores moleculares de resistência, que vem agora ser facilitada pela recente descodificação do genoma do parasita *P. falciparum* (Gardner *et al.*, 2002). À medida que a nova informação sobre a genética da quimio-resistência se torna disponível, poder-se-á tornar possível a criação de novas e melhoradas ferramentas moleculares que permitirão a detecção atempada de *foci* de resistência, facilitando a implementação de medidas preventivas adequadas.

Bibliografia

- Babiker, A., Pringle, S.J., Abdel-Muhsin, A., Mackinnon, M., Hunt, P. & Walliker, D. (2001) High level of Chloroquine resistance in Sudanese isolates of *Plasmodium falciparum* is associated with mutations in the chloroquine resistance transporter gene *pfcr* and the multi-drug resistance gene *pfmdr1*. *J. Infect. Dis.*, **183**(10), 1535-1538.
- Bhattacharya, P.R., Biswas, S. & Kabilan, L. (1997) Alleles of the *Plasmodium falciparum* *pfmdr1* gene appear not to be associated with chloroquine resistance in India. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, **91**(4), 454-455.
- Carlton, J. M.-R., Hayton, K., Cravo, P. V. L. & Walliker, D. (2001) Of mice and malaria mutants: Unravelling the genetics of drug resistance using rodent malaria models. *Trends in Parasitol.*, **17**(5), 236-242.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**(3), 1143-1147.
- Cravo, P., Culleton, R., Hunt, P., Walliker, D. & Mackinnon, M. (2001) Antimalarial drugs clear resistant parasites from partially immune hosts. *Anti Microb. Agents Chem.* **45**(10), 2897-2901.
- Cravo, P.V.L., Carlton, J., Hunt, P., Bioni, L., Padua, R.A. & Walliker, D. (2002) Genetics of mefloquine-resistance in malaria; duplication and over-expression of the *mdr1* gene enhances resistance due to other genes. *Anti Microb. Agents Chem.* (*in press*)
- Diallo, D.A., Habluetzel, A., Cuzin-Ouattara, N., Nebie, I., Sanogo, E., Cousens, S.N. & Esposito, F. (1999) Widespread distribution of insecticide-impregnated curtains reduces child mortality, prevalence and intensity of malaria infection, and malaria transmission in rural Burkina Faso. *Parassitologia* 1999 **41**(1-3), 377-81
- Djimde, A., Doumbo, O.K., Stekete, R.W. & Plowe, C.V. (2001) Application of a molecular marker for surveillance of chloroquine-resistant malaria. *Lancet*, **358**(9285), 890-891.
- Duraisingh, M.T., Roper, C., Walliker, D. & Warhurst, D.C. (2000) Increased sensitivity to the antimalarials mefloquine and artemisinin is conferred by mutations in the *pfmdr1* gene of *Plasmodium*

- falciparum*. *Mol. Microbiol.* **36**(4), 955-961.
- Ferone, R. (1977) Folate metabolism in malaria. *Bull. World. Health Organ.* **55**(2-3), 291-298
- Fidock, D.A., Nomura, T., Talley, A.T., Cooper, R.A., Dzekunov, S.M., Ferdig, M.T., Ursos, L.M., Sidhu, A.S., Naude, B., Deitsch, K.W., Su, X.Z., Wootton, J.C., Roepe, P.D. & Wellems, P.D. (2000) Mutations in the *P. falciparum* Digestive vacuole transmembrane protein *Pfcr* and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol. Cell* **6**, 861-871.
- Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O. *et al.* (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **2002** **419**(6906), 498-511.
- Geary, T.G., Jensen J.B. & Ginsburg, H. (1986) Uptake of [3H]chloroquine by drug-sensitive and -resistant strains of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem. Pharmacol.* **35**(21), 3805-3812.
- Ginsburg, H., Ward, A.S. & Bray, P.G. (1999) An integrated model of chloroquine action. *Parasitol. Today* **15**(9), 357-360
- Harinasuta, T., Migasen, S. & Boonag, D. (1962) Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* in Thailand. UNESCO First Regional Symposium on Scientific Knowledge of Tropical Parasites, Singapore University, Singapore.
- Hess F.I., Nukuro E., Judson L., Rodgers J., Nothdurft H.D. & Rieckmann K.H. (1997) Anti-malarial drug resistance, malnutrition and socio-economic status. *Trop. Med. Int. Health* **2**(8), 721-728
- Letvin NL, Bloom BR, Hoffman SL. (2001) Prospects for vaccines to protect against AIDS, tuberculosis, and malaria. *JAMA* **285**(5), 606-611
- Lopes, D., Rungsihirunrat, K., Nogueira, F., Seugorn, A., Gil, J.P., do Rosário, V.E. & Cravo, P. (2002a). Molecular Characterisation of Drug-resistant *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Malaria Journal* **1**:12.
- Lopes, D., Nogueira, F., Ferreira, C., Gil, J.P., do Rosário, V.E. & Cravo, P. (2002b) *Pfcr* and *pfmdr1* mutations and malaria chloroquine resistance in the Democratic Republic of São Tomé & Príncipe, West Africa. *Annals. Trop. Med. Parasitol.* (in press).
- Mesnick, S.R. (1997) Why does quinine still work after 350 years of use? *Parasitol. Today* **13**(3), 89-90.
- Peel, S.A., Brigh, P., Yount, B., Handy, J., Baric, R.S. (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**(5), 648-658.
- Peters, W. (1977) Prolonged malaria prophylaxis. *Br. Med. J.* **2**(6102), 1604-1605.
- Peters, W. (1987) "Chemotherapy and drug resistance in malaria". Academic Press, London, Second edition.
- Peters, W. (1990) The prevention of antimalarial drug resistance. *Pharmacol. Ther.* **47**(3), 499-508
- Peters, W. (1997) Chemoprophylaxis of malaria. *Br. Med. J.* **1**;1(6052), 49-50.
- Peters, W. (1998) Drug resistance in malaria parasites of animals and man. *Adv Parasitol* **41**, 1-62.
- Povoa, M.M., Adagu, I.S., Oliveira, S.G., Machado, R.L., Miles, M.A. & Warhurst, D.C. (1998) *Pfmdr1* Asn1042Asp and Asp1246Tyr polymorphisms, thought to be associated with chloroquine resistance, are present in chloroquine-resistant and sensitive Brazilian field isolates of *Plasmodium falciparum*. *Experim. Parasitol.* **88**(1), 64-68.
- Price, R.N., Cassar, C., Brockman, A., Duraisingh, M., Van Vugt, M., White, N.J., Nosten, F. & Krishna, S. (1999). The *pfmdr1* gene is associated with a multidrug-resistant phenotype in *Plasmodium falciparum* from the western border of Thailand. *Anti Microb. Agents Chem.* **43**(12), 2943-2949.
- 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**(6772), 906-909.
- Shell, E. (1997). Resurgence of a deadly disease. *Atlantic Monthly*, August, 45-60.
- Sibley, C.H., Hyde, J.E., Sims, P.F., Plowe, C.V., Kublin, J.G., Mberu, E.K., Cowman, A.F., Winstanley, P.A., Watkins, W.M. & Nzila, A.M. (2001) Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? *Trends Parasitol.* **17**(12), 582-588.
- Sidhu, A.B., Verdier-Pinard, D., Fidock, D.A. (2002) Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by *pfcr* mutations. *Science* **298**(5591), 210-213.
- Sirawaraporn, W., Sathitkul, T., Sirawaraporn, R., Yuthavong, Y. & Santi, D.V. (1997) Antifolate-resistant mutants of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **18**;94(4), 1124-1129
- Slater, A.F., Swiggard, W.J., Orton, B.R., Flitter, W.D., Goldberg, D.E., Cerami, A. & Henderson, G.B. (1991) An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **88**(2), 325-329.
- Vanderkooi, G., Prapunwattana, P. & Yuthavong, Y. (1998) Evidence for electrogenic accumulation of mefloquine by malarial parasites. *Biochem Pharmacol* **37**(19), 3623-3631.
- von Seidlein, L., Duraisingh, M.T., Drakeley, C.J., Bailey, R., Greenwood, B.M. & Pinder, M. (1997). Polymorphisms in the *pfmdr1* gene and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* in the Gambia. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, **91**(4), 450-453.
- Wellems, T.E., Panton, L.J., Gluzman, I.Y., Rosário, V.E., Gwadz, R.W., Walker-Jonah, A. & Krogstad, D.J. (1990) Chloroquine resistance not linked to *mdr*-like genes in a *Plasmodium falciparum* cross. *Nature* **345**(6272), 253-255.
- Wellems, T.E. & Plowe, C.V. (2001) Chloroquine-Resistant Malaria. *J. Infect. Dis.*, **184**, 770-776.
- Wernsdorfer, W. & McGregor, Sir I. (1988) "Malaria – Principles and Practice of Malariology, Volume 1". Churchill Livingstone.
- Wernsdorfer, W. (1994) Epidemiology of drug resistance in malaria. *Acta Tropica* **56**, 143-156.
- White, N.J. (1994) Mefloquine. *Br. Med. J.* **308**(6924), 286-287
- White, N.J. (1999) Delaying antimalarial drug resistance with combination chemotherapy. *Parassitologia* **41**(1-3), 301-8
- Wilson, C.M., Volkman, S.K., Thaithong, S., Martin, R.K., Kyle, D.E., Milhous, W.K. & Wirth D.F. (1993) Amplification of *pfmdr 1* associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Mol. Biochem. Parasitol.* **57**(1), 151-160.
- Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. (2002) Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect. Dis.* **2**(4), 209-218
- W.H.O. (1963) Terminology of malaria and malaria eradication. World health Organization, Geneva WHO Monograph series No. 13.
- W.H.O. Report (2001) Drug resistance in malaria (http://www.who.int/emc/amrpdfs/Drug_resistance_in_malaria.pdf)
- Young, M.D. & Moore, D.V. (1961) Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **10**, 317-320.
- 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**(5), 630-637.