

ANA PAULA LARÊDO AMÉRICO

UTILIZAÇÃO DO DELI-teste PARA AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE *IN VITRO* DO
Plasmodium vivax À CLOROQUINA EM CONDIÇÕES DE CAMPO NO MUNICÍPIO DE
TUCURUÍ, PARÁ.

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção para o grau de Mestre em Patologia das Doenças Tropicais.

Orientadores: Prof. Dr. José Maria de Souza

Prof. Dr. Leonardo José Moura Carvalho.

BELÉM - PARÁ
MARÇO DE 2007

ANA PAULA LARÊDO AMÉRICO**UTILIZAÇÃO DO DELI-teste PARA AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE *IN VITRO* DO
Plasmodium vivax À CLOROQUINA EM CONDIÇÕES DE CAMPO NO MUNICÍPIO DE
TUCURUÍ, PARÁ.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção para o grau de Mestre em Patologia das Doenças Tropicais.

Orientadores:

Prof. Dr. José Maria de Souza

Dr. Leonardo José Moura Carvalho

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Tadeu Daniel Ribeiro

Laboratório de Pesquisas em Malária, IOC/FIOCRUZ

Prof. Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa

Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

Prof. Dra. Maristela Gomes da Cunha

Laboratório de Patologia, UFPA

Prof. Dra. Rosana Maria Feio Libonati

Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

BELÉM - PARÁ

MARÇO DE 2007

“Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis”.

(Bertold Brecht)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Alípio Araújo Américo (*In memoriam*) e Antonia Larêdo Américo por suas vidas dedicadas a mim e a minha formação.

À minha irmã e segunda mãe Graça Larêdo Américo que participou da minha criação e sempre deu apoio em minhas decisões.

À minha segunda família Vera Maria Riker Lobato e Valdir Riker Lobato por estarem presentes em minha vida há sete anos e desde então sempre torcem pelo meu sucesso

Ao meu esposo Victor Riker Lobato pelo amor, carinho e atenção dedicados a mim e pela paciência que teve comigo no decorrer do curso de mestrado e do trabalho.

À Amiga Yara Lins Jennings, pessoa muito importante na minha vida e quem eu considero uma irmã.

AGRADECIMENTOS

A Deus que nunca deixa de iluminar o meu caminho mesmo quando eu o esqueço por vezes.

Ao Núcleo de Medicina Tropical pela oportunidade do mestrado necessário e disputado pelos profissionais que almejam a pesquisa e docência.

À coordenação e funcionários do Curso de Mestrado em Doenças Tropicais pela ajuda, amizade e principalmente compreensão nos momentos em que mais precisamos.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Maria de Souza pela orientação e pelos anos em que tem depositado confiança em mim, por ter me incentivado a fazer o mestrado e pela amizade demonstrada ao percorrer desse tempo.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Leonardo José de Moura Carvalho, pela brilhante orientação teórica e prática, pela amizade e principalmente paciência durante o trabalho.

Ao Prof. Dr. Cláudio Tadeu Daniel Ribeiro, chefe do Laboratório de Pesquisas e Diagnóstico em Malária da Fundação Oswaldo Cruz e coordenador do Projeto DELI-teste, por toda a compreensão nesses dois anos, pela amizade e pelas oportunidades como a participação em duas edições do Seminário Laveran & Deane sobre Malária.

À Cláudia Castro, secretária do Laboratório de Pesquisas e Diagnóstico em Malária da Fundação Oswaldo Cruz pela incansável colaboração e paciência nos momentos mais difíceis.

À Dra. Elizabeth Santos, diretora do Instituto Evandro Chagas pela colaboração imprescindível neste trabalho, pela qual eu serei eternamente grata.

À Sra. Ocidéia de Oliveira, secretária da Seção de Parasitologia pelo respeito e pela colaboração na viagem à Tucuruí.

Aos amigos Benedito Pontes dos Santos e Orivaldo de Lima Mota Filho que fizeram um trabalho exímio em Tucuruí e a todos os funcionários do Ambulatório/Laboratório de Ensaios Clínicos em Malária do Instituto Evandro Chagas que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desta pesquisa.

Às Dras. Ana Maria Revorêdo Ventura e Rosana Maria Feio Libonati pela amizade que têm por mim e pelas palavras, necessárias em vários momentos.

Ao Dr. Fernando Tobias Silveira e sua equipe do Programa de Leishmaniose Visceral pela ajuda sempre que necessária.

À Dra. Marinete Marins Póvoa, aos queridos técnicos José Maria e José Mário e à Msc. Giselle Rachid Viana por estarem sempre interessados e dispostos a ajudar, meus sinceros agradecimentos.

Ao motorista do Instituto Evandro Chagas Adelson Dias da Silva pela indispensável colaboração em Tucuruí e pela amizade conquistada.

Aos funcionários do Posto de Saúde Liler Leão, Posto do Rio Onze e do Hospital Regional de Tucuruí, que contribuíram grandemente para a realização deste trabalho.

À grande amiga Maria de Nazaré Almeida Rocha e seu esposo Carlos Hermógenes de Souza Rocha, pessoas extraordinárias que nos acolheram em seu lar em Tucuruí e nos fizeram sentir como se estivéssemos em nossa própria casa.

Ao amigo, Dr. Habib Fraiha Neto pelos conselhos e palavras de incentivo e pelo grande carinho que tem por mim.

À Maria das Graças de Almeida Carvalho, minha ex-professora na faculdade e amiga que eu admiro e a quem eu agradeço pela disposição de ter estudado comigo para a prova de seleção do mestrado e por sempre torcer pelo meu sucesso pessoal e profissional.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS E QUADROS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1) CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.2) CICLO EVOLUTIVO DO <i>Plasmodium spp.</i>	7
1.3) TERAPÊUTICA EM MALÁRIA	10
1.3.1) HISTÓRICO E MECANISMO DE AÇÃO DOS ANTIMALÁRICOS	12
1.3.1.1) Quinina	12
1.3.1.2) Cloroquina	13
1.3.1.3) Mefloquina	14
1.3.1.4) Artemisinina e seus derivados	14
1.3.1.5) Antifolatos e primaquina	14
1.3.2) RESISTÊNCIA DO <i>Plasmodium falciparum</i> E <i>Plasmodium vivax</i> AOS ANTIMALÁRICOS	15
1.3.2.1) Resistência do <i>Plasmodium falciparum</i> aos antimaláricos	16
1.3.2.2) Resistência do <i>Plasmodium vivax</i> à cloroquina	20
1.4) MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA	21
1.4.1) MÉTODOS <i>IN VIVO</i>	23

1.4.2) MÉTODOS <i>IN VITRO</i>	24
2 - JUSTIFICATIVA	31
3 - OBJETIVOS	32
3.1) OBJETIVO GERAL	32
3.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1) ÁREA DE ESTUDO	33
4.2) CASUÍSTICA E TRIAGEM DOS PACIENTES	33
4.3) CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	34
4.4) METODOLOGIA APLICADA AO DELI-TESTE	34
4.4.1) COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE	34
4.4.2) PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE	35
4.4.3) PREPARO E DILUIÇÃO DAS DROGAS	36
4.4.4) DELI-TESTE	39
4.4.5) CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50% DO CRESCIMENTO DO PARASITO (IC50)	40
5 - RESULTADOS	42
6 - DISCUSSÃO	58
7 - CONCLUSÕES	63
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	73

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 – Mapa do Brasil e suas regiões enfatizando os nove estados componentes da Amazônia Legal.....	2
FIGURA 2 – Número de casos de malária notificados no estado do Pará nos anos de 2000, 2003, 2004 e 2005	5
FIGURA 3 – Número de casos de malária vivax e falciparum notificados no estado do Pará nos anos de 2000 a 2005	6
FIGURA 4 – Ciclo biológico do <i>Plasmodium spp</i> no mosquito e no homem	9
FIGURA 5 – Classificação dos antimaláricos segundo o ciclo de vida do <i>Plasmodium spp</i>	11
FIGURA 6 – Demonstração do efluxo de cloroquina dentro do vacúolo parasitóforo do <i>Plasmodium spp</i>	17
FIGURA 7 – Demonstração esquemática dos métodos de avaliação da resistência do <i>Plasmodium spp</i> aos antimaláricos.....	22
FIGURA 8 – Esquema da diferença entre a LDH no homem e a pLHD no <i>Plasmodium spp</i>	27
FIGURA 9 – Preparação da solução de cloroquina para o cultivo do <i>Plasmodium vivax</i>	36
FIGURA 10 – Esquema de preparação da placa de cultura para <i>Plasmodium vivax</i> , utilizando a cloroquina como droga	38
FIGURA 11 – Formas evolutivas do <i>Plasmodium vivax</i> encontradas nas lâminas de esfregaço pré-cultivo de 48 horas de incubação	45
FIGURA 12 – Formas evolutivas do <i>Plasmodium vivax</i> encontradas nas lâminas pós-cultivo de 48 horas de incubação	46
FIGURAS 13 E 14 – Exemplos (amostras 005V e 039V) de comparação entre as curvas de sensibilidade à cloroquina utilizando os anticorpos monoclonais 6C9 e 11D.....	50
FIGURA 15 – Amostras que não permitiram a determinação da IC50 por resultarem em linhas planas.....	52
FIGURA 16 – Curvas de sensibilidade à cloroquina das amostras 004V, 006V, 040V, 043V e 050V.....	52
FIGURA 17 – Curvas de sensibilidade à cloroquina das amostras 001V, 014V, 016V, 019V e 054V.....	53
FIGURA 18 – Curvas de sensibilidade à cloroquina das amostras 002V, 015V, 021V e 026V.....	53
FIGURA 19 – Curvas de sensibilidade à cloroquina das amostras 039V, 047V e 051V.....	54
FIGURA 20 – Curvas de sensibilidade à cloroquina das amostras 005V, 012V e 013V.....	54

FIGURA 21 – Curvas de sensibilidade à cloroquina das amostras 018V, 049V e 053V.....	55
FIGURA 22 – Curvas de sensibilidade à cloroquina das amostras 008V, 025V e 042V.....	55
FIGURA 23 – Distribuição das IC50 de cloroquina sobre isolados de <i>Plasmodium vivax</i> obtidos de pacientes de Tucuruí, Estado do Pará.....	57

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Página
QUADRO 1 – Classificação dos antimaláricos quanto ao seu grupo químico.....	11
QUADRO 2 – Medicamentos utilizados de acordo com a espécie de plasmódio infectante.....	12
TABELA 1 – Densidade parasitária e disponibilidade da IC50 nas amostras.....	43
TABELA 2 – Avaliação prévia densidade ótica para a definição da diluição utilizada nos testes.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

ALECEM/IEC/SVS/MS – Ambulatório e Laboratório de Ensaio Clínicos em Malária/ Sistema de vigilância em Saúde/Ministério da Saúde

APAD – 3-Acetil Piridina Adenina Dinucleotídeo

BSA – Soro Albumina Bovina

DDT - Dicloro-Difenil-Tricloroetano

DNA – Ácido desoxiribonucléico

DELI – double-site enzyme-linked immunodetection

DO – Densidade Ótica

EDTA – Ácido Etileno Aminotetraacético ELISA – Ensaio Imunoenzimático

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz.

FMT/AM – Fundação de Medicina Tropical do Amazonas

FUNASA – Fundação Nacional da Saúde

g - Grama

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC50 – Concentração Inibitória de ic50

HRP2 – Proteína 2 Rica em Histidina

LDH – Lactato Desidrogenase

AcMo – anticorpo monoclonal

µL - Microlitro

mL - Mililitro

mM – Mili molar

mm³ – Milímetro cúbico

MS – Ministério da Saúde

ng – nano grama

nM – nano molar

NAD – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPS – Organização Pan-Americana da Saúde

pH – Potencial hidrogeniônico

Pfcr1 – *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina relacionado ao transportador

Pfdhfr – Diidrofolato redutase do *Plasmodium falciparum*

Pfdhfs – Diidrofolato sintetase do *Plasmodium falciparum*

Pfmdr1 – Gene 1 de resistência múltipla a drogas do *Plasmodium falciparum*

pLDH – Lactato Desidrogenase do parasito

PABA – Ácido p-aminobenzóico

PBS – Phosphate Buffered Saline

PIACM – Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária

PNCM – Programa Nacional de Controle de Malária

rpm – rotações por minuto

RAVREDA – Rede Amazônica de Vigilância da Resistência aos Antimaláricos

SIH – Sistema de Internações Hospitalares

SIM – Sistema de Informações sobre Mortalidade

SISMAL – Sistema de Informações em Malária

SIVEP/MALÁRIA – Sistema de Vigilância Epidemiológica em Malária

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

TBM – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

Thr – Treonina

Tyr - Tirosina

UHT – Usina Hidroelétrica de Tucuruí

WHO – World Health Organization

RESUMO

O Estado do Pará é um dos responsáveis pela maioria das notificações de malária na Região Amazônica. *Plasmodium vivax* é a espécie mais freqüente e a avaliação da sensibilidade do mesmo à cloroquina é essencial para verificar se tal droga mantém sua eficácia. Entretanto, isso não era factível em função da não disponibilidade de metodologia de cultivo de curto prazo e da dificuldade de avaliação da maturação desse parasito. Recentemente, um sistema para cultivo de curto prazo de *P. vivax* foi introduzido, assim como uma metodologia de mensuração (DELI-teste) da maturação/crescimento do parasito baseada na detecção da enzima Lactato Desidrogenase do parasito (pLDH), permitindo estudos de sensibilidade dessa especie plasmoidal aos antimaláricos. O objetivo desse trabalho foi então avaliar o desempenho dessa metodologia para avaliar a quimiossensibilidade de *P. vivax* a cloroquina em condições de campo no município de Tucuruí, no Estado do Para. Foram utilizados 44 pacientes positivos para malária vivax, diagnosticados pelo exame de gota espessa, dos quais, após consentimento, foram coletados 5mL de sangue. Uma suspensão de hemácias de cada paciente, preparada em meio de cultura especial (meios RPMI e Waymouth, soro AB+, hematocrito de 1,8%), foi colocada em cultivo in vitro de curto prazo (48 horas), a 37°C e microaerofilia, frente a uma gama de concentrações (2,34-600ng/mL) de cloroquina. As placas foram então congeladas e, posteriormente, os parasitos foram lisados por congelamento e descongelamento, liberando a pLDH. A mensuração da pLDH foi feita por ELISA-sanduiche (DELI-teste), utilizando como anticorpos de captura os monoclonais 6C9 (anti-pLDH de *Plasmodium*) e 11D (anti-pLDH de *P. vivax*) e como anticorpo de detecção o monoclonal 19G (anti-pLDH de *Plasmodium*). Os valores de densidade ótica obtidos permitiram, na maioria dos casos, traçar curvas de sensibilidade a droga e o conseqüente calculo da concentração inibitória de 50% (IC50). Do total de amostras, 53,8% apresentaram melhores curvas com o monoclonal 11D e 46,1% com o monoclonal 6C9. Das 44 amostras, 26 (59,2%) permitiram traçar curvas interpretáveis de sensibilidade a cloroquina. O rendimento de 59% pode ser considerado satisfatório em função da conhecida dificuldade de se cultivar *P. vivax in vitro*, e das precárias condições de infra-estrutura para realização das culturas. Doze (46,2%) dessas 26 amostras apresentaram IC50 superior ao limiar de 100nM, sendo consideradas resistentes. Esse elevado percentual de amostras com perda de sensibilidade a cloroquina é preocupante e indica que esse tipo de avaliação deve ser continuada e estendida a outras localidades para se ter uma caracterização mais clara dessa situação. O DELI-teste é o único capaz de avaliar a resistência in vitro do *P. vivax* e sua utilização em condições de campo pode contribuir para direcionar estratégias terapêuticas para malária em nosso País.

SUMMARY

The State of Para is responsible for a large amount of malaria notifications in the Brazilian Amazon region. *Plasmodium vivax* is the most prevalent specie and the evaluation of its in vitro sensitivity to chloroquine is essential to verify if this drug keeps its efficacy. However, this kind of evaluation was not feasible due to unavailability of methodologies for short-term in vitro culture and for evaluation of growth/maturation of this parasite. Recently, a method for short-term in vitro culture of *P. vivax* was introduced, as well as a reliable methodology (DELI-test) for measurement of this parasite's growth/maturation, based on the detection of the parasite enzyme Lactate Dehydrogenase (pLDH), allowing studies of sensitivity of this plasmodial specie to antimalarials. The aim of this study was then to evaluate the chemosensitivity of *P. vivax* to chloroquine under field conditions in the municipality of Tucuruí, State of Para, Brazil. A total of 45 patients with vivax malaria were enrolled in the study, after microscopic diagnosis by thick smear, and 5mL of blood were withdrawn from each patient. An erythrocyte suspension was prepared for each patient's blood, using a special culture medium (mixing of RPMI and Waymouth media, AB+ serum, 1.8% hematocrit), and put in short-term (48 hours) culture at 37°C and low tension of oxygen, under a range of concentrations (2,34-600ng/mL) of chloroquine. Plates were then frozen and, later, parasites were lysed by freezing-thawing, releasing the pLDH, which was measured by a sandwich-ELISA (DELI-test), using for capture the monoclonal antibody (MAb) 6C9 (anti-*Plasmodium* pLDH) e 11D (anti-*P. vivax* pLDH) and for detection the MAb19G (anti-*Plasmodium* pLDH). The optical density values allowed in most cases the drawing of curves of sensitivity to the drug and calculation of the 50% inhibitory concentration (IC₅₀). Nearly half (53.8%) of the samples showed better curves with the MAb 11D. Out of the 44 samples, 26 (59.2%) allowed the drawing of interpretable curves of sensitivity for chloroquine. The parasite growth performance of 59% of the samples can be considered satisfactory, taking into account the known difficulty in culturing *P. vivax* in vitro, and the poor laboratory conditions for carrying out the cultures. Thirteen (46.2%) of the 26 interpretable samples showed an IC₅₀ above the threshold of 100nM of chloroquine, being considered resistant. This high frequency of samples with low sensitivity to chloroquine is of concern and indicates that this kind of evaluation should be continued and extended to other localities in order to have a more clear picture of the situation. The DELI-test is currently the only able to evaluate in vitro resistance of *P. vivax* and its use in field conditions can contribute for helping definitions in the malaria therapeutic strategies in Brazil.

1. INTRODUÇÃO

1.1) CONSIDERAÇÕES GERAIS

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a malária ainda se enquadra como um grave problema de saúde pública no mundo atingindo cerca de 100 países, ocasionando a morte de dois milhões de pessoas a cada ano (WHO, 2002). Em levantamento feito pela Organização Pan Americana da Saúde no ano de 2000, dos 1,14 milhões de notificações nas Américas, mais da metade se encontrava no Brasil, com a predominância da malária por *Plasmodium vivax*. Do total de ocorrências da doença neste período, 99,7% estavam na Região Amazônica, sobretudo em três Estados: Amazonas, Pará e Rondônia (FUNASA, 2002; OPS, 2001).

Vários são os fatores preponderantes para a disseminação da malária na região. Os projetos de assentamentos agropecuários e de extrativismo vegetal e mineral têm provocado desmatamento de áreas extensas, agressões ao ambiente, desorganização espacial e concentração de pessoal em condições sanitárias inadequadas, propícias para a transmissão da doença e desta maneira, a Amazônia Legal (**FIGURA 1**) ainda permanece com números elevados de notificações de malária (LADISLAU, 2004).

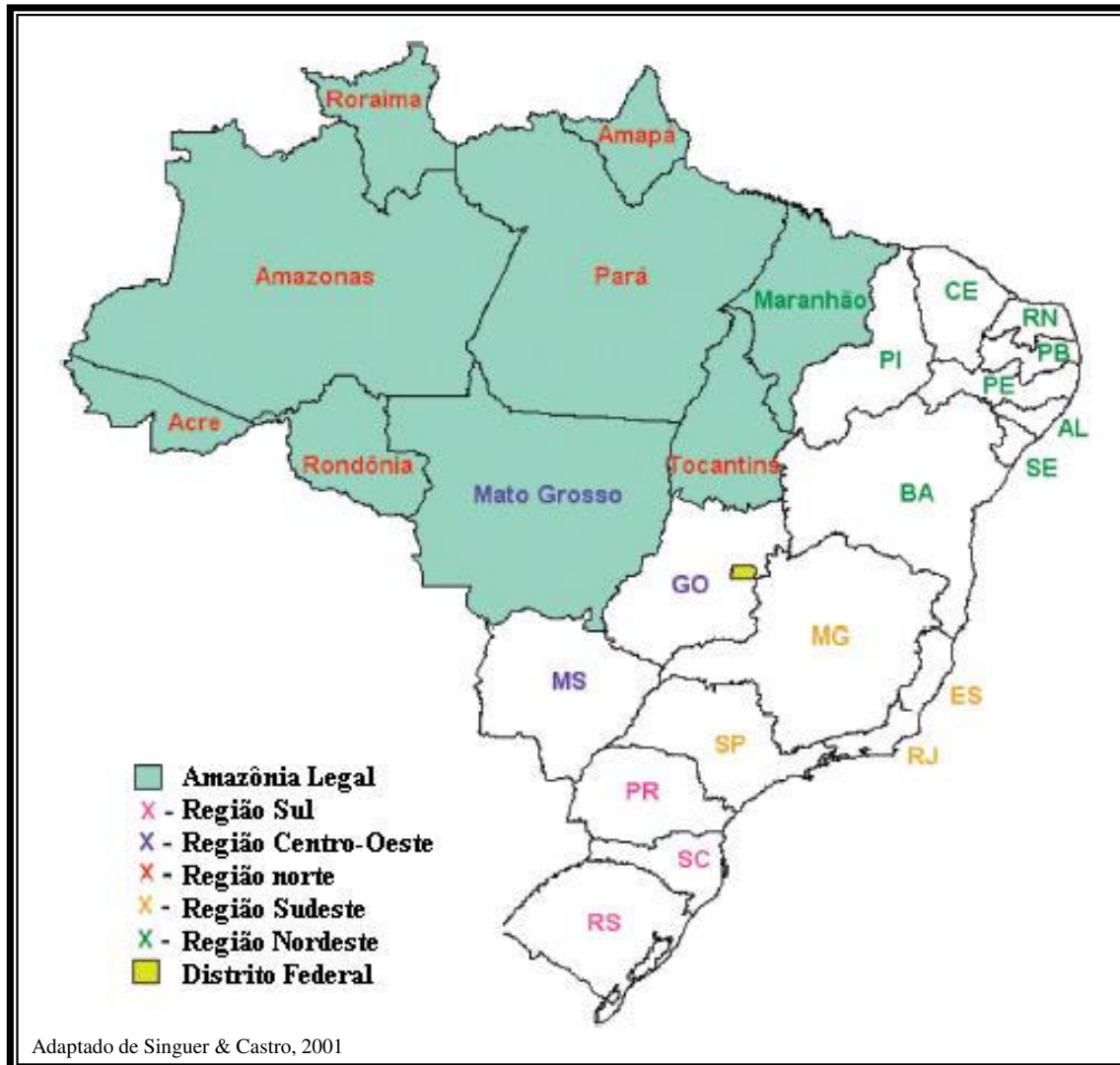


FIGURA 1 – MAPA DO BRASIL E SUAS REGIÕES IDENTIFICANDO OS NOVE ESTADOS COMPONENTES DA AMAZÔNIA LEGAL.

Até a década de 1940, a malária esteve distribuída praticamente por todo o território nacional, chegando a atingir 6 milhões de casos por ano. Com o advento da utilização do DDT e da cloroquina, conseguiu-se controlar a doença em toda a região extra-amazônica. As campanhas de erradicação da malária na década de 60 tiveram grande impacto sobre as regiões sul, sudeste, centro-oeste e parte do nordeste, levando a uma redução do número de casos registrados no País, chegando a cerca de 37.000 casos em 1962, o que permitiu com que essas regiões ficassem com pouca ou nenhuma transmissão da doença (MARQUEZ, 1988).

Os projetos desenvolvimentistas implantados na Região Amazônica a partir da década de 70, incentivados pelo Governo Federal, promoveram grandes investimentos, estimulando o deslocamento de grandes contingentes populacionais sem contato prévio com a malária para as áreas endêmicas aumentando o número de pessoas suscetíveis e o risco de infecções graves (MARQUEZ, 1988).

Em 1999, os Estados da Amazônia Legal registraram 635.644 mil casos da doença, o que levou o Ministério da Saúde a implantar, juntamente com os Estados da Região, o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM) no ano de 2000, objetivando reduzir em 50% o número de casos até o final de 2001; prevenir ocorrências de óbitos por malária e, ao mesmo tempo, evitar o surgimento de epidemias localizadas. O plano resultou em grandes avanços, com a diminuição de 38,9% no número de casos e redução de 36,5% no número de óbitos. Entretanto, devido ao fato de o PIACM ter sido elaborado apenas para execução temporária, foi necessário adotar medidas permanentes para agir de maneira mais efetiva o problema da malária no País. Assim, em 2002 foi implantado o Programa Nacional de Controle de Malária (PNCM) que visou estender os avanços proporcionados pelo PIACM, mas com uma política permanente ajustada às condições locais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003, 2004).

O Estado do Pará obteve resultados significativos desde a implantação do PIACM, que se mantiveram após a implantação do PNCM, apresentando decréscimo nas suas notificações com o decorrer dos anos, passando de 279.303 mil casos em 2000 para cerca de 109.000 mil em 2004 (**FIGURA 2**) (AMÉRICO *et al*, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003; SVS 2005). Entretanto, no ano de 2005 houve um grande acréscimo nos casos notificados, tanto de malária vivax quanto de falciparum, com um total de mais de 123.085 mil casos positivos da doença (**FIGURA 3**) (SVS, 2005).

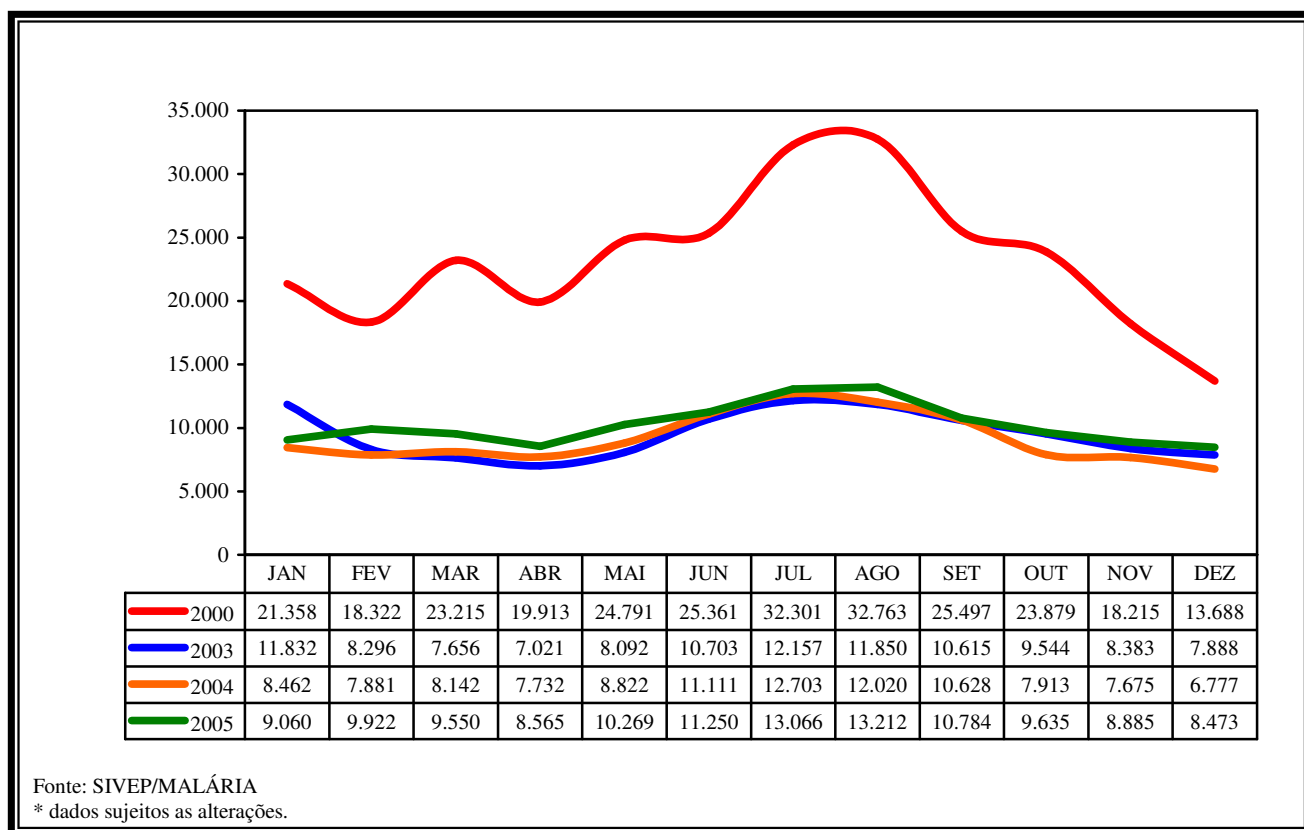


FIGURA 2 - NÚMERO DE CASOS DE MALÁRIA NOTIFICADOS NO ESTADO DO PARÁ NOS ANOS DE 2000, 2003, 2004 E 2005.

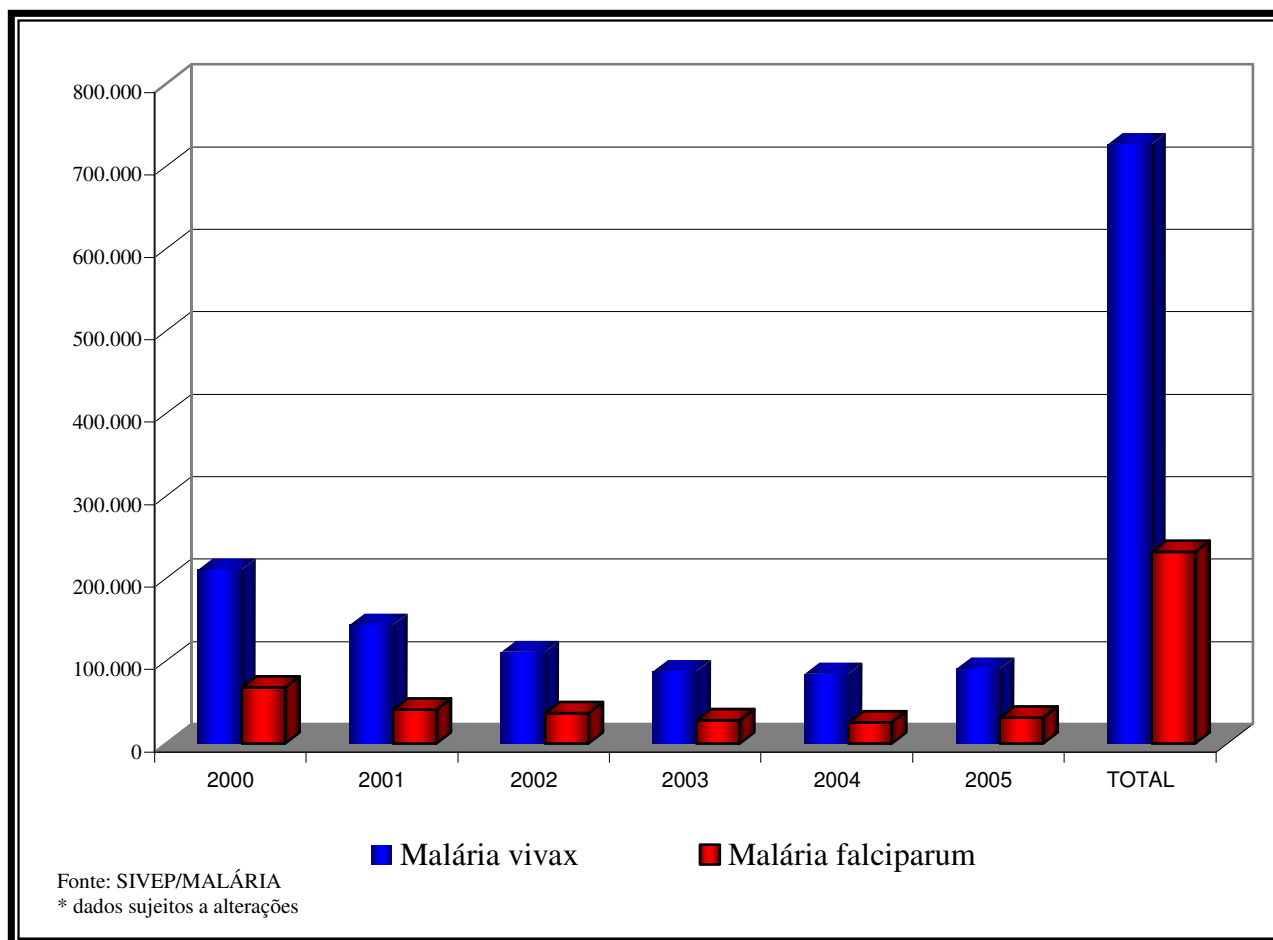


FIGURA 3 - NÚMERO DE CASOS DE MALÁRIA VIVAX E FALCIPARUM NOTIFICADOS NO ESTADO DO PARÁ NOS ANOS DE 2000 A 2005.

1.2) CICLO EVOLUTIVO DO *Plasmodium spp.*

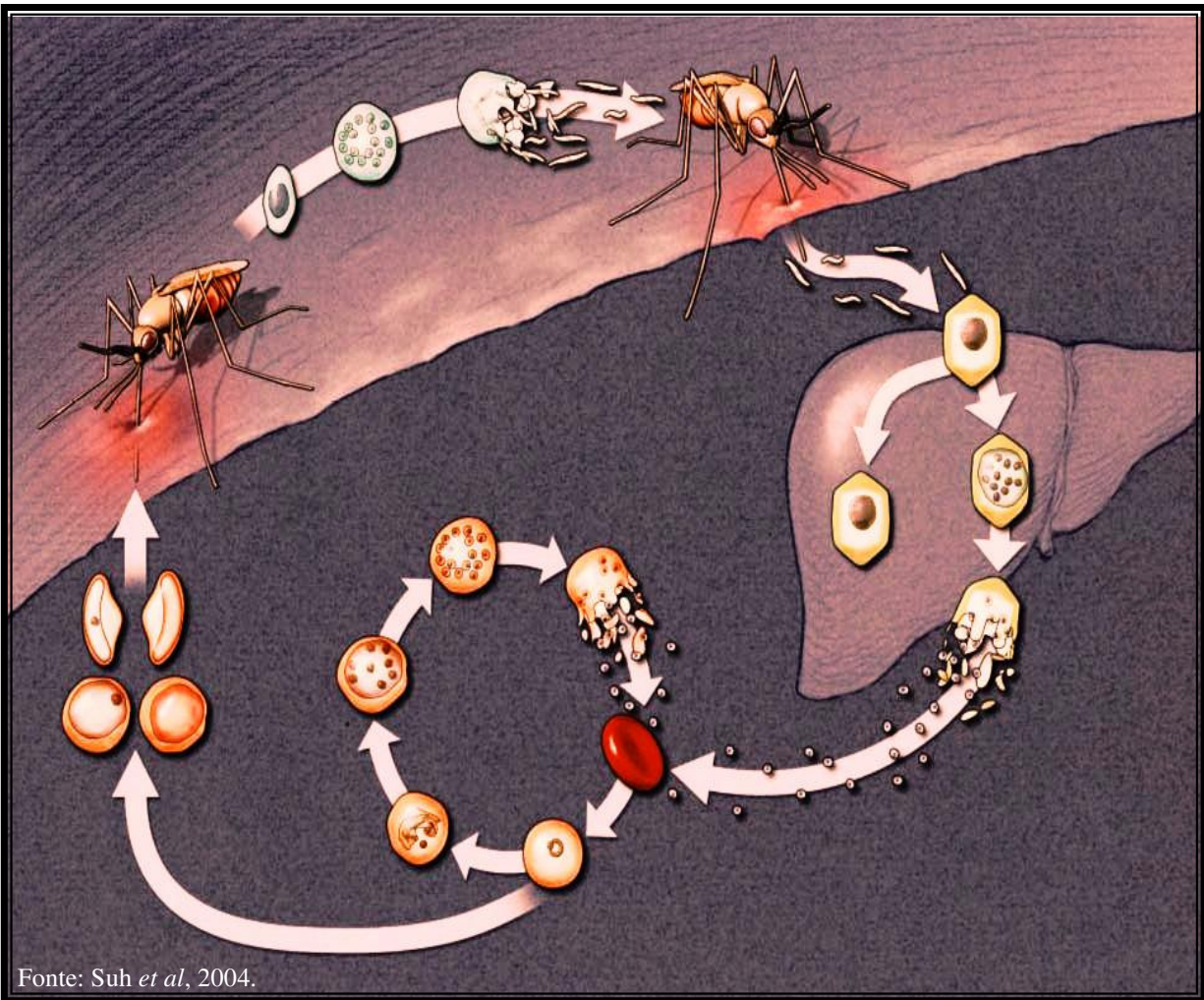
O conhecimento do ciclo pelo qual o parasito da malária se mantém na natureza é de extrema importância para o diagnóstico correto, assim como para o entendimento de características clínicas, patológicas, imunológicas e terapêuticas da doença. Sua biologia é de grande complexidade, e isto de certa maneira favorece sua manutenção em seus hospedeiros (TOSTA *et al*, 2000).

Para efeito didático, consideremos que o ciclo tem início no momento da ingestão -pelo mosquito vetor - de sangue infectado contendo formas sexuadas do parasito, os gametócitos, capazes de infectar o mosquito anofelino. Estes gametócitos, ao chegarem ao trato digestivo do mosquito, se diferenciam em macrogameta ou gameta feminino e microgameta ou gameta masculino, sendo que a formação deste último se dá por um processo denominado de exflagelação. O microgameta fecunda o macrogameta originando o ovo ou zigoto, que se transforma em oocineto e migra através da parede do estômago do mosquito e se aloja formando o oocisto, onde ocorre o processo de multiplicação esporogônica (TOSTA *et al*, 2000).

O oocisto maduro se rompe e libera os esporozoítos formados em seu interior, que migram para as glândulas salivares do inseto fazendo com que o mesmo seja capaz de transmitir a malária após um prazo que varia de 10 a 14 dias. Ao realizar o repasto sanguíneo em um indivíduo sadio, o anofelino introduz na circulação sanguínea os esporozoítos que chegam ao fígado em 30 a 120 minutos e invadem os hepatócitos, onde há o primeiro ciclo esquizogônico da reprodução assexuada que dura em torno de 6 a 16 dias dependendo da espécie de *Plasmodium*, e que tem como resultado os esquizontes teciduais ou hepáticos contendo em seu interior formas evolutivas denominadas de merozoítos, que ao serem liberados seguem para a circulação

sanguínea onde irão invadir os eritrócitos e dar início ao segundo ciclo esquizogônico (TOSTA *et al*, 2000).

No caso de *P. vivax* e *P. ovale*, os parasitos nos hepatócitos podem assumir formas latentes, denominadas de hipnozoítos, que podem permanecer por longos períodos e levar a acessos tardios de malária. Os merozoítos, após a invasão do eritrócito, evoluem de formas jovens chamadas de “anel”, passando a trofozoítos jovens, trofozoítos maduros e então a esquizontes, que darão origem a vários merozoítos (um anel pode dar origem a mais de 30 merozoítos, dependendo da espécie de *Plasmodium*). Os glóbulos vermelhos infectados acabam se rompendo liberando os merozoítos, que voltarão a parasitar outros eritrócitos repetindo o ciclo, ou se diferenciarão em gametócitos, formas capazes de infectar o mosquito anofelino, dando continuidade ao ciclo (FERREIRA, Marcelo, 2002; TOSTA *et al*, 2000) (**FIGURA 4**).



Fonte: Suh *et al.*, 2004.

FIGURA 4 – CICLO BIOLÓGICO DO *Plasmodium spp* NO MOSQUITO E NO HOMEM.

1.3) TERAPÊUTICA EM MALÁRIA

A malária é uma doença infecciosa e não contagiosa que não deixa seqüelas no indivíduo que a contrai principalmente se seu diagnóstico e tratamento forem precoces impedindo que a doença evolua para formas mais graves (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005a).

A terapêutica antimalárica empírica começou a ser utilizada há três séculos e desde então sempre se procuraram estratégias para obter uma droga cada vez mais eficaz no combate ao parasito, assim como melhorar os esquemas terapêuticos visando maior adesão do paciente ao tratamento (FERREIRA, Elizabeth, 2002). O ciclo de vida do plasmódio possui vários estágios distintos e por isso são necessários medicamentos capazes de atingir particularmente cada estágio. A importância está em impedir que o parasito se multiplique na corrente sanguínea evitando a ocorrência dos sintomas clínicos e o surgimento de formas transmissíveis ao mosquito, além de impedirem o desenvolvimento das formas latentes no fígado no caso de infecções por *P. vivax* e *P. ovale* (BAIRD, 2004; DE SOUZA *et al*, 1997, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Os antimaláricos têm duas classificações feitas de acordo com a ação no ciclo de vida do parasito e com o grupo químico das drogas (**FIGURA 5 e QUADRO 1**) (FUNASA, 2001).

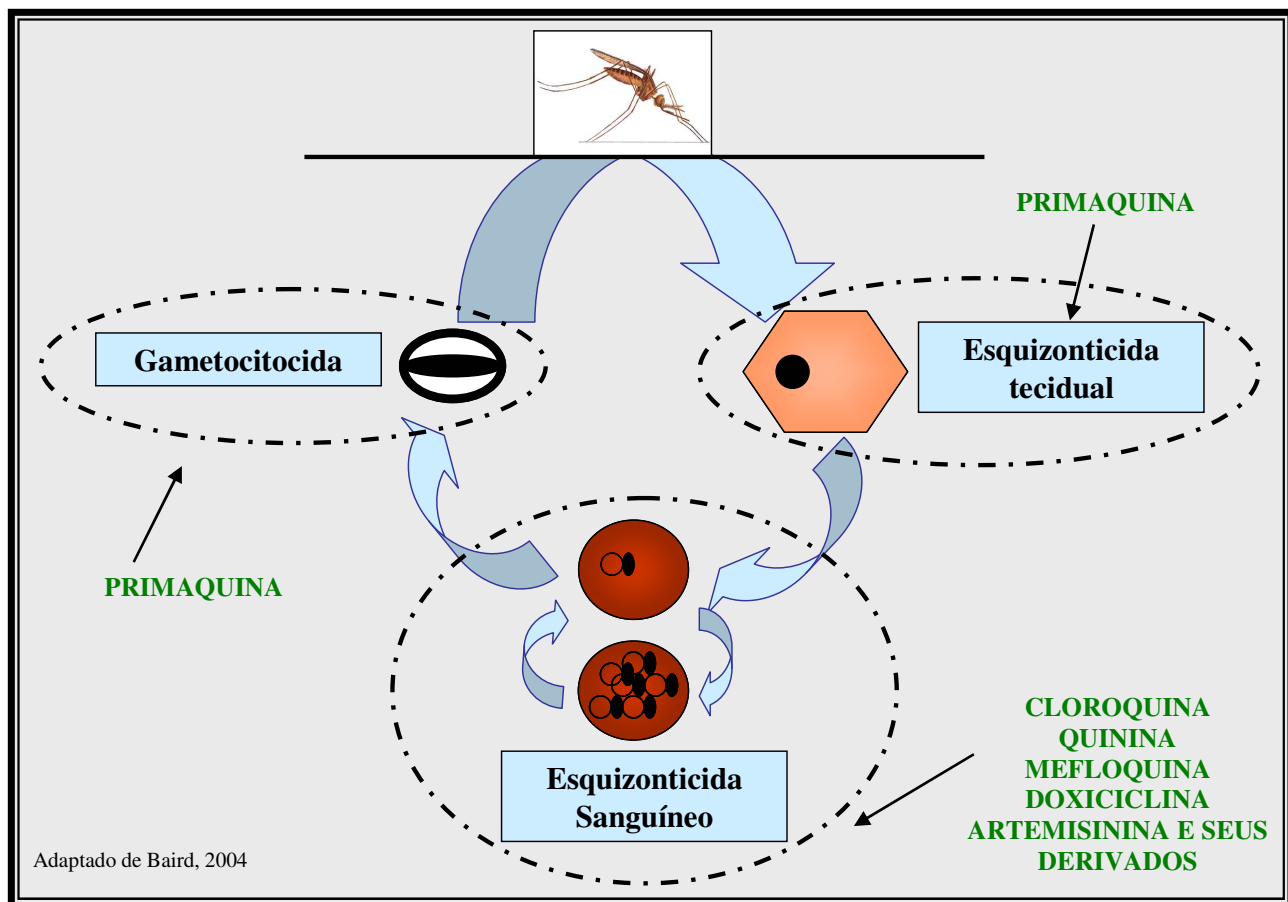


FIGURA 5 - CLASSIFICAÇÃO DOS ANTIMALÁRICOS SEGUNDO O CICLO DE VIDA DO *Plasmodium spp.*

GRUPO QUÍMICO	MEDICAMENTO
4-aminoquinolinas	Cloroquina e amodiaquina
8-aminoquinolinas	Primaquina
Quinolinometanóis	Mefloquina e Quinina
Lactonas sesquiterpênicas com ligação endoperóxido	Artemisinina e seus derivados
Antibióticos	Clindamicina, doxiciclina e tetraciclina

QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO DOS ANTIMALÁRICOS QUANTO AO SEU GRUPO QUÍMICO.

No Brasil, os regimes de tratamento são feitos com base em esquemas recomendados pelo Ministério da Saúde por intermédio da Secretaria de Vigilância em Saúde, expressas no Manual de Terapêutica em Malária, onde cada droga antimalárica possui uma dosagem correta para administração de acordo com a espécie plasmodial e estado clínico do paciente (**QUADRO 2**) (FUNASA, 2001).

ESPÉCIE DE PLASMÓDIO	MEDICAMENTOS
<i>Plasmodium vivax</i>	Cloroquina e primaquina
<i>Plasmodium falciparum</i>	Quinina e doxiciclina ¹ , mefloquina e artemisinina ² , e primaquina ³
<i>Plasmodium malariae</i>	Cloroquina e primaquina ³

QUADRO 2 – MEDICAMENTOS UTILIZADOS DE ACORDO COM A ESPÉCIE DE PLASMÓDIO.

¹ Tratamento de primeira escolha para pacientes de malária falciparum ou de malária mista (*P. vivax* e *P. falciparum*)

² Tratamento de segunda escolha para pacientes de malária falciparum ou de malária mista (*P. vivax* e *P. falciparum*)

³ Utilizada somente se o paciente apresentar formas sexuadas.

1.3.1) HISTÓRICO E MECANISMO DE AÇÃO DOS ANTIMALÁRICOS

1.3.1.1) Quinina

A quinina é o principal alcalóide da casca da cinchona, também conhecida como quina, tendo sido descoberta em 1633 e utilizada para tratar febres na Europa a partir de 1640. O principio ativo foi isolado quase dois séculos mais tarde. É uma base fraca podendo induzir um desequilíbrio no vacúolo ácido do *Plasmodium falciparum* semelhante ao que ocorre com a

cloroquina e inibe assim a formação da hemozoína destruindo o parasito (SCHLESINGER, 1988).

1.3.1.2) Cloroquina

A cloroquina foi sintetizada na Alemanha em 1934 e utilizada primeiramente em 1935 no mesmo país em pacientes com malária vivax durante a Segunda Guerra Mundial em resposta à escassez da quinina, e ganhou notoriedade por ser uma droga barata, segura e muito eficaz contra a malária por *P. vivax* e *P. falciparum*, tanto para cura radical quanto para profilaxia, além de ser bem tolerada pelos pacientes (BAIRD, 2004; GINSBURG, 2005; WELLEMS, 2001).

A cloroquina tem efeito antimalárico sobre *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e cepas sensíveis de *P. falciparum*, como esquizonticida sanguíneo. Seu mecanismo de ação ainda é discutível. Acredita-se que a droga possa agir por ligação ao DNA do parasito ou pela inibição de enzimas transportadoras de membrana (RIDLEY, 1998).

Segundo Ridley (1998), a cloroquina age impedindo a polimerização do grupamento heme. Normalmente, como conseqüência da degradação da hemoglobina, ocorre a liberação do grupamento heme (II ferroprotoporfirina IX). Por ser muito tóxico ao parasito, o heme é oxidado em hematina (III ferroprotoporfirina IX) e, por um processo de polimerização da β -hematina, origina a hemozoína ou pigmento malárico, menos tóxico ao parasito. Desta maneira, a cloroquina, ao ser retida no vacúolo alimentar em quantidades suficientes (quanto maior o acúmulo, melhor seu efeito), impede que haja a polimerização do grupamento heme, resultando na morte do parasito por desestruturação metabólica (FERREIRA, Elizabeth, 2002; GINSBURG, 2005; HYDE, 2002; KROGSTAD, 1988; MAY, 2003; SCHLESINGER, 1988; TRACY, 2003).

1.3.1.3) Mefloquina

A mefloquina foi sintetizada na década de 60 como uma droga promissora no combate a cepas de *P. falciparum* resistentes aos antimaláricos utilizados na época. Foi utilizada pela primeira vez na Tailândia em virtude da resistência à cloroquina. Esta estratégia foi falha devido ao fato de a mefloquina ter uma eliminação lenta do organismo, o que facilitou a seleção de parasitos em concentrações sub-terapêuticas. Seu mecanismo de ação também está ligado à inibição da formação do pigmento malárico (DE SOUZA *et al*, 1983a, 1983b, 1985a, 1985b; SCHLESINGER, 1988; TRACY, 2003; WHITE, 1999).

1.3.1.4) Artemisinina e seus derivados

A artemisinina (Qinghaosu), derivada da planta chinesa *Artemisia annua* (Qing hao) começou a ser utilizada para febres em 340 d.C.; em 1596, passou a ser recomendada no alívio dos sintomas da malária na forma de chá, mas somente em 1972 foi isolada como princípio ativo. O mecanismo de ação da artemisinina e de seus derivados está relacionado ao seu grupamento endoperoxídeo que, ao sofrer rearranjos, é capaz de liberar radicais livres tóxicos ao parasito (MESHNICK, 2001).

1.3.1.5) Antifolatos e Primaquina

Outros antimaláricos não menos importantes se fazem presentes na terapêutica contra a malária. Os antifolatos, como a combinação de pirimetamina e sulfadoxina, são exemplos de drogas que podem ser utilizadas como profilaxia e tratamento de cepas de *P. falciparum* sensíveis a eles. Têm duas ações distintas, inibindo a síntese do folato ao competirem com o ácido p-aminobenzóico (PABA), como no caso de drogas tipo sulfonamidas e sulfonas, e/ou impedindo a utilização do folato por inibição da diidrofolato redutase, como no caso da pirimetamina e o

proguanil. Assim, o uso concomitante de ambos parece apropriado por exercerem efeito sinérgico (SCHLESINGER, 1988).

A primaquina foi a única droga que se mostrou realmente eficaz e segura contra as formas tissulares dos *P. vivax* e *P. ovale* durante a Guerra da Coréia, sendo ainda hoje amplamente utilizada. Foi produzida em 1963, mesma época que a mefloquina, como um composto promissor no combate a cepas de *P. falciparum* resistentes às outras drogas. Não se tem muito conhecimento sobre a ação da primaquina (DE SOUZA *et al*, 1983a, 1983b, 1985a, 1985b; LEAL *et al*, 2003; TRACY, 2003).

1.3.2) RESISTÊNCIA DO *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* AOS ANTIMALÁRICOS

O termo resistência tem sido descrito na literatura, há algumas décadas, como a habilidade do parasito de forçar sua sobrevivência ou multiplicação frente a drogas que o combatem em doses terapêuticas (TALISUNA *et al*, 2004).

Segundo Wernsdorfer (1994) o desenvolvimento e distribuição da resistência aos antimaláricos envolvem vários fatores e, dentre eles, o mais importante é a diversidade nas mutações genéticas dos parasitos que ocorrem naturalmente independentemente do efeito da droga. Outros fatores podem estar envolvidos secundariamente, como as características farmacocinéticas das drogas, relacionadas ao seu longo tempo de meia-vida de eliminação; assim, uma droga de meia-vida curta desenvolveria mais lentamente resistência que uma droga de meia-vida longa (TALISUNA *et al*, 2004; WONGRISCHANALAI; 2002). Características do hospedeiro também são importantes, sendo que pacientes não-imunes estariam mais sujeitos à resistência do que aqueles que apresentam uma semi-imunidade, porque uma melhor resposta

imune aumenta a eficácia da quimioterapia (TALISUNA *et al*, 2004; WONGRISCHANALAI; 2002).

1.3.2.1) Resistência do *Plasmodium falciparum* aos antimaláricos

O surgimento da resistência do *Plasmodium falciparum* à cloroquina foi um grande marco na história da terapêutica em malária. O primeiro local onde se relatou resistência à cloroquina foi no Sudeste da Ásia, na fronteira entre Tailândia e Camboja, em 1957, espalhando-se rapidamente para Tailândia em 1959. No início de 1960 foram registrados casos na Venezuela e Colômbia. Pouco mais de uma década depois, em 1976, casos de resistência à droga foram observados na Papua Nova Guiné. Pesquisas posteriores demonstraram que a população genética dos parasitos diferenciava de acordo com o local e, dessa maneira, as cepas encontradas na Papua Nova Guiné eram diferentes daquelas encontradas no Sudeste da África (HASTINGS, 2004; OLLIARO, 2005; TALISUNA *et al*, 2004; TRAPE, 2001).

O aparecimento sucessivo da resistência em diversos lugares fez com que as alternativas terapêuticas ficassem consideravelmente limitadas, uma vez que a cloroquina era muito utilizada e produzia, até então, efeitos positivos na cura da malária. Desde então, a resistência à cloroquina ganhou proporções alarmantes e outras áreas da Ásia e da América do Sul foram atingidas, além de alguns países da África, tornando a situação ainda mais preocupante. Foram então conduzidos vários estudos que levaram ao desenvolvimento de novas drogas como mefloquina, sulfadoxina-pirimetamina e também derivados da artemisinina (FERREIRA, Elizabeth, 2002; TALISUNA *et al*, 2004; WONGRISCHANALAI, 2002).

No Brasil, a resistência de *P. falciparum* à cloroquina começou a ser relatada na década de 60 ao ser observada a ineficácia da droga em alguns casos na região amazônica; Reyes e

colaboradores (1986) em um levantamento retrospectivo, feito em sete Estados da Amazônia Legal entre os anos de 1960 e 1963, encontraram a ocorrência de resistência em 122 localidades.

Couto e colaboradores (1995) encontraram elevada frequência de cepas resistentes de *P. falciparum* à cloroquina em ensaios *in vitro* no Estado do Amapá, em Lourenço (79,8%), e no Estado do Pará, em Paragominas (68,4%). Nestas duas áreas, a resistência era mais acentuada em garimpos, talvez devido ao uso indiscriminado da droga ao longo do tempo (COUTO, 2001).

Vários estudos tentam decifrar a relação de sensibilidade e resistência à cloroquina em relação ao seu acúmulo no interior do vacúolo digestivo do parasito (HAWLEY, 1998). Segundo Krogstad e colaboradores (1988), isto estaria ligado a um processo de efluxo onde parasitos resistentes não deixariam que a droga permanecesse no seu interior em maior quantidade do que os parasitos sensíveis (**FIGURA 6**).

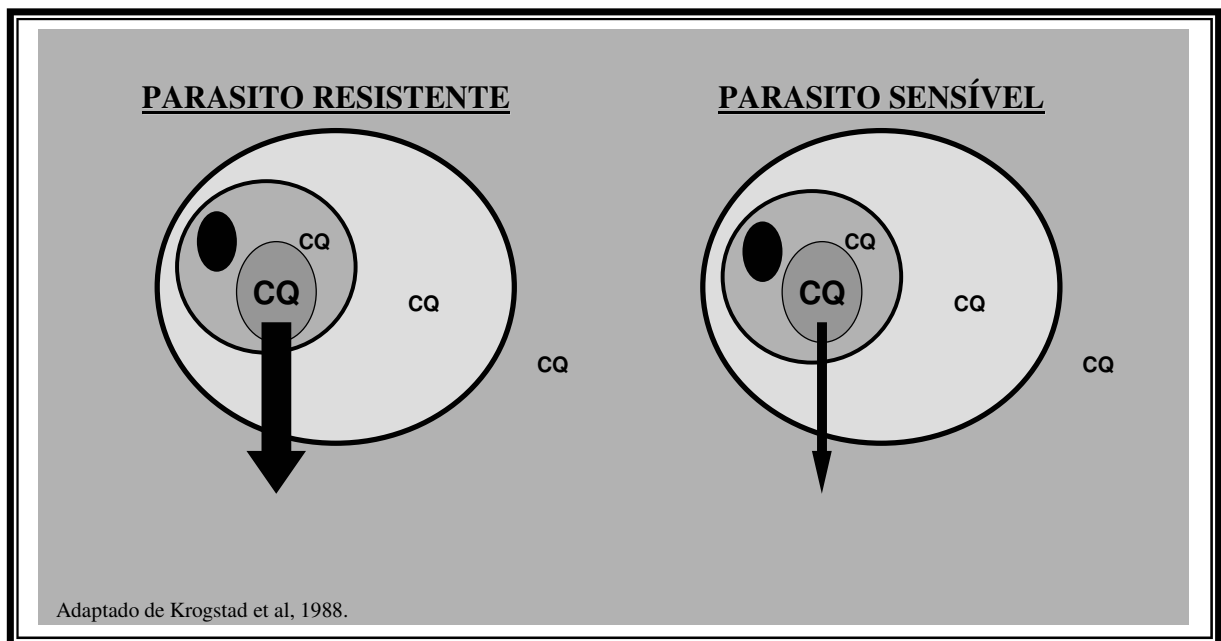


FIGURA 6 – DEMONSTRAÇÃO DO EFLUXO DE CLOROQUINA DENTRO DO VACÚOLO PARASITÓFORO DO *Plasmodium spp.*

Outros estudos expõem que parasitos resistentes possuem um desequilíbrio no gradiente de pH no vacúolo lisossomal e, conseqüentemente, menor acúmulo de droga; ou teriam pouca afinidade com a hematina e não se ligariam eficientemente a ela (GINSBURG, 2005; HYDE, 2002; KIRK, 2001; RIDLEY, 1998; WHITE, 1999).

Os estudos de base molecular para verificação da resistência do *P. falciparum* à cloroquina estão focados em dois genes do parasito. O gene *pfcr1* codifica para uma proteína transportadora de membrana envolvida no transporte de cloroquina no interior do parasito; está localizado no cromossomo 7 e sua implicação na resistência estaria relacionada a substituição do aminoácido lisina pela treonina no códon 76 (76^{THR}) em alguns isolados da África, América do Sul, Ásia e Papua Nova Guiné. Entretanto, não foi vista essa associação na Uganda, onde a resistência à cloroquina é mais prevalente (FAROOQ, 2004; HYDE, 2002; NOMURA, 2001; RIDLEY, 1998; TALISUNA, 2004; WERNSDORFER, 1994; WHITE, 2004; WONGRISCHANALAI, 2002). Viana (2002), ao analisar amostras de algumas localidades da Região Amazônica, concluiu que a presença desta mutação é um forte marcador genético de resistência *in vitro* do *P. falciparum* à cloroquina.

Foi demonstrado também que outro gene, o *pfmdr1*, localizado no cromossomo 5, poderia estar envolvido na resistência à cloroquina, pois uma mutação no códon 86 estava presente em isolados resistentes, como demonstrado em diversos estudos clínicos e *in vitro* em alguns países. Entretanto, outros estudos não encontraram tal relação (HYDE, 2002; NOMURA, 2001; RIDLEY, 1998; TALISUNA, 2004; WERNSDORFER, 1994; WHITE, 2004; WONGRISCHANALAI, 2002).

A resistência a outros antimaláricos, como os quinolinometanóis, tem sido pouco abordada devido ao fato de que ainda permanecem eficazes contra os plasmódios. Resistência à

mefloquina, por exemplo, foi vista pela primeira vez na década de 80 na fronteira entre Tailândia e Camboja, apenas 5 anos após sua introdução na terapêutica. Na Tailândia talvez a resistência a esta droga tenha sofrido influência do extenso uso de outras drogas quimicamente semelhantes antes de sua introdução assim como também da migração de trabalhadores do Camboja. Alguns casos foram relatados na bacia amazônica no Brasil, mas sem a mesma relevância que teve no sudeste da África (HYDE, 2002; WONGSRICHANALAI, 2002). Estudos de polimorfismos demonstraram que o gene *pfmdr1* poderia ser um marcador molecular na investigação do mecanismo de resistência à mefloquina e, mesmo que muitos estudos não confirmem tal achado, acredita-se que o papel do *pfmdr1* possa ser a chave para a modulação dessa resistência (FAROOQ, 2004; TALISUNA *et al*, 2004; WONGSRICHANALAI, 2002).

A quinina é uma droga amplamente utilizada e integrante do regime de tratamento da malária no Brasil e, embora ocorram alguns casos de recrudescência pelo mundo, como àqueles verificados no sudeste da Ásia e oeste da Oceania pelo uso da monoterapia, sua combinação com antibióticos como a doxiciclina tem demonstrado uma boa efetividade no tratamento. Assim como no caso da mefloquina, mutações no gene *pfmdr1* parecem estar envolvidas na redução da sensibilidade do *Plasmodium falciparum* a este eficiente antimalárico (TALISUNA *et al*, 2004; WONGSRICHANALAI, 2002).

A artemisinina e seus derivados foram associados a altas taxas de recrudescência ao serem utilizados como monoterapia, e acredita-se que isso é devido às suas propriedades farmacocinéticas. Desta maneira têm sido utilizados em esquemas com outras drogas como a mefloquina. Segundo Wongsrichanalai (2002), na fronteira da Tailândia e Myanmar, onde é bastante utilizada a combinação entre artemisinina e mefloquina de forma satisfatória, vários estudos de avaliação da resistência não mostraram resultados significativos sobre a perda de sensibilidade do *P. falciparum* à artemisinina e seus derivados.

Estudos moleculares têm sugerido que a variante *Tyr86* do gene *pfmdr1* pode também estar associada à sensibilidade à artemisinina e seus derivados sesquiterpênicos (TALISUNA *et al*, 2004; WONGSRICHANALAI, 2002).

A resistência do *Plasmodium falciparum* aos antifolatos é o resultado de uma seqüência de mutações em genes como *pfdhfr* e *pfdhfs* que parecem permitir ao parasito antagonizar a ligação das drogas sobre os receptores que seriam a chave para a ação antimalárica (FAROOQ, 2004; HYDE, 2002; TALISUNA *et al*, 2004).

1.3.2.2) Resistência do *Plasmodium vivax* à cloroquina

A baixa sensibilidade do *P. vivax* à cloroquina foi relatada em 1989 em dois soldados australianos que retornaram do norte de Papua Nova Guiné, seguido de outros casos na Indonésia em 1991 e Myanmar em 1992 e 1993. Na América do Sul, em 1989 foram observados na Colômbia 11 casos suspeitos de baixa resposta à cloroquina e em 1996 foi assinalada pela primeira vez resistência na Guiana. Na região amazônica brasileira, resistência tipo RII a este antimalárico foi evidenciada em um paciente de Manaus, Amazonas, em 1997, que apresentou parasitemia em D9 (dia 9) após ter ausência de parasitos em D7 (dia 7). Ainda assim, aparentemente, a resistência do *P. vivax* à cloroquina parece ser pouco frequente no Novo Mundo (ALECRIM, 1999; BAIRD *et al*, 1996; BAIRD, 2004; CHOTIVANICH *et al*, 2004; RIECKMANN *et al*, 1989; TALISUNA *et al*, 2004; WHITBY *et al*, 1989).

Segundo Baird (2004) a falha da cloroquina no tratamento da malária vivax poderia estar intimamente relacionada a sua dosagem terapêutica e, assim, revisando pesquisas anteriores, observou que apenas 0,8g em 6 dias de tratamento permitiam uma boa eficácia da cloroquina, sendo que doses abaixo de 0,3g não teriam o mesmo sucesso. Outros estudos concluíram que

doses entre 0,3g e 0,6g não tiveram nenhuma falha. Sendo assim, dose e regime de tratamento estariam relacionados às maiores falhas levando a ocorrência de resistências.

O mecanismo de resistência do *P. vivax* à cloroquina ainda é obscuro, e aparentemente os fatores genéticos que determinam a resistência no primeiro são diferentes no segundo. Estudos com o ortólogo do gene *crt* que no *P. falciparum* está ligado à resistência à cloroquina não demonstraram ligação com a mesma no *P. vivax* (WONGSRICHANALAI, 2002). Sá e colaboradores (2005) descreveram a sequência do gene *mdr1* também ortólogo daquele presente no *P. falciparum*, mas não encontraram correlações substanciais entre a resistência e as mutações.

1.4) MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA

Devido ao fato de a resistência aos antimaláricos ter se tornado cada vez mais importante, vários métodos têm sido avaliados e utilizados para um monitoramento da resistência a antimaláricos incluindo testes *in vivo* e *in vitro* (**FUGURA 7**)(BLOLAND, 2001; TALISUNA *et al*, 2004).

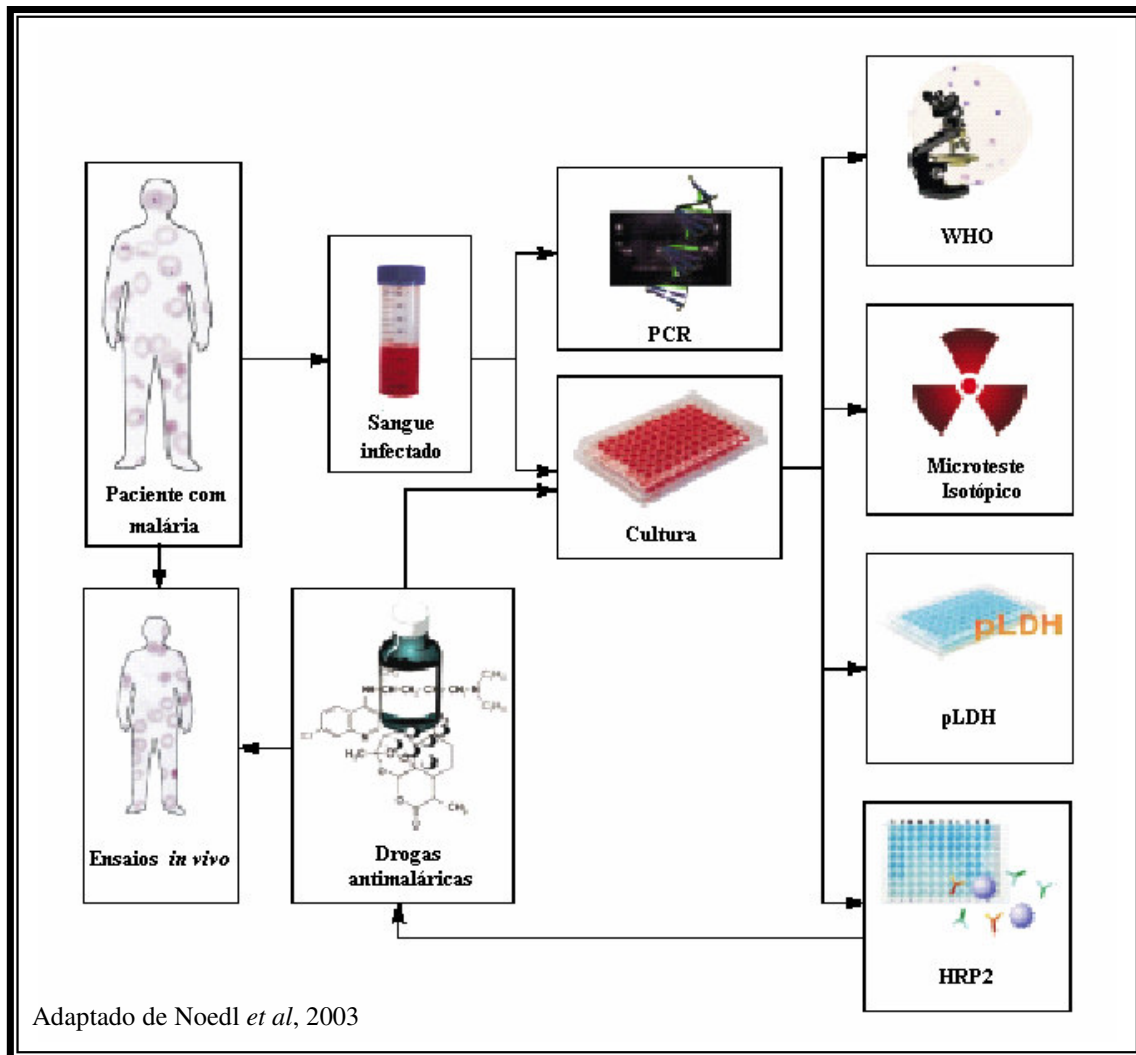


FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO *Plasmodium spp* AOS ANTIMALÁRICOS.

1.4.1) MÉTODOS *IN VIVO*

Os métodos *in vivo* são métodos mais tradicionais para a detecção da resistência aos antimaláricos, pois desde as primeiras confirmações de resistência do *Plasmodium falciparum* à cloroquina, a Organização Mundial da Saúde (OMS) passou a estabelecer critérios para a determinação da resistência *in vivo*. A base dos métodos *in vivo* está na observação da resposta do parasito no organismo frente a uma dose fixa da droga, dentro dos limites de tolerabilidade, observando-se a interação existente entre os parasitos, os antimaláricos e o hospedeiro, permitindo uma avaliação qualitativa da resistência baseada no desaparecimento do parasito e na observação de ocorrência de recrudescências dentro de um período e interpretada de acordo com o sistema de classificação de resistência estabelecido pela OMS em 1973: S (negativação da parasitemia até D7, sem a ocorrência de retorno da mesma); RI (negativação da parasitemia até D7, seguida de recidivas precoce ou tardia); RII (redução da parasitemia sem negativação); RIII (sem redução da parasitemia, podendo ocorrer aumento da mesma) (NOEDL, 2002; TALISUNA *et al*, 2004).

No Brasil, atualmente, está em vigência o Projeto da Rede Amazônica de Vigilância da Resistência aos Antimaláricos (RAVREDA) que, juntamente com Bolívia, Venezuela, Equador, Guiana, Peru, Colômbia, Suriname e o Departamento da Guiana Francesa, objetiva monitorar a resistência e assim estimar a magnitude e distribuição da farmacoresistência dos parasitos da malária aos medicamentos preconizados pelos Programas Nacionais de Controle da Malária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005b).

Entretanto, existem várias desvantagens que delimitam os métodos *in vivo* e, assim, casos verdadeiros de resistência à droga podem não ser detectados devido a possíveis variações

farmacocinéticas, a reinfecções, infecções múltiplas, falta de adesão do paciente ao estudo, ou mesmo à interferência da resposta imune adquirida (NOEDL, 2002).

1.4.2) MÉTODOS *IN VITRO*

Os métodos *in vitro* de avaliação da resistência medem quantitativamente a interação entre o *Plasmodium spp.* e o antimalárico, analisando o crescimento e o desenvolvimento do parasito; assim, sua eficácia é caracterizada pela inibição do crescimento e, conseqüentemente, de sua multiplicação (NOEDL, 2002, PRADINES, 1999; WONGSRICHANALAI *et al*, 2001).

A técnica de cultivo *in vitro* de *P. falciparum* proposta por Trager e Jensen (1976) utilizando o meio RPMI-1640, tamponado com HEPES e suplementado com soro, proporcionou uma revolução em estudos diversos sobre esse parasito, por permitir pela primeira vez acesso fácil a material parasitário, de forma contínua, por laboratórios de pesquisa em todo o mundo. Até hoje, esse é o único dos quatro parasitos que infectam o homem que pode ser cultivado de maneira contínua. O *Plasmodium vivax* é uma espécie de difícil cultivo, principalmente pelo fato de invadir seletivamente células vermelhas jovens, os reticulócitos, que são de baixa prevalência no sangue periférico e, portanto, seu cultivo contínuo dependeria de uma quantidade suficiente dessas células para sua manutenção. Chotivanich e colaboradores (2001) propuseram uma técnica, utilizando além do RPMI 1640 outras substâncias como glicose, ácido ascórbico e hipoxantina dentre outros, verificando que o *P. vivax* crescia bem no meio que lhe foi proposto, mas que necessitava de outros nutrientes para continuar sua multiplicação (RUSSELL, 2003).

A técnica de cultivo *in vitro* de *P. falciparum* descrita por Trager e Jensen proporcionou, entre outras possibilidades, o desenvolvimento de diferentes métodos de avaliação *in vitro* de quimiossensibilidade do parasito a drogas. Tais métodos têm como princípio básico comum ao cultivo de amostras do parasito frente a uma gama de concentrações da(s) droga(s) em teste e diferem essencialmente no sistema de detecção do crescimento do parasito, que pode ser feito por microscopia ótica, emissão de radioatividade por compostos marcados ou por ELISA (RUSSELL, 2003).

Em 1978, Rieckman e colaboradores desenvolveram uma microtécnica com intuito de avaliar a inibição da maturação dos esquizontes do parasito em um período de 30 horas utilizando placas pré-dosadas com drogas em diferentes concentrações. Essa técnica, adotada como padrão pela OMS, avalia a maturação do parasito por microscopia, o que introduz limitações pela necessidade de pessoal qualificado para contagem e avaliação dos estágios do parasito e por ser uma técnica trabalhosa e que consome tempo, pois para cada isolado do parasito testado, é necessária a leitura cuidadosa de muitas lâminas (considerando que cada isolado pode ser testado frente a várias drogas e, para cada uma, várias concentrações – geralmente 8-9 – são testadas).

Dejardins e colaboradores (1979) propuseram o microteste isotópico, um ensaio baseado na utilização de hipoxantina marcada que possuía vantagens sobre o anterior em relação à rapidez e uso de equipamentos automatizados. Entretanto, por se tratar de um método que utiliza material radioativo e equipamentos caros, caiu em desuso (NOEDL *et al*, 2003; TALISUNA *et al*, 2004).

Métodos baseados na detecção de antígenos do parasito por métodos imunocromatográficos (ELISA) foram desenvolvidos nos últimos anos. Esses métodos possuem grandes vantagens em relação ao microteste e ao método isotópico, pois são sensíveis, de fácil realização, permitem a avaliação de grande número de amostras em tempo relativamente curto, não utilizam reagentes perigosos e os equipamentos utilizados – por exemplo, leitor de ELISA –

são de uso comum em muitos laboratórios. Entre os testes imunoenzimáticos desenvolvidos nos últimos anos, aqueles baseados na detecção da Proteína-2 Rica em Histidina (HRP-2) e da Lactato Desidrogenase (pLDH) são atualmente os mais promissores (NOEDL *et al*, 2003; TALISUNA *et al*, 2004).

A HRP-2 é uma proteína produzida somente pelo *Plasmodium falciparum*, envolvida no transporte da hemoglobina ao vacúolo alimentar do parasito, sendo capaz de catalisar a polimerização da mesma em hemozoína. Entretanto, a HRP-2 tem um tempo de *clearance* longo, permanecendo na circulação sanguínea por algumas semanas mesmo após a morte dos parasitos, o que pode limitar sua utilização em testes como esse (NOEDL *et al*, 2003).

Diferente da HRP-2, a Lactato Desidrogenase do parasito (pLDH), uma enzima produzida não somente pelo *P. falciparum*, mas sim por todas as espécies de *Plasmodium* em ambos estágios, sexuado e assexuado. É uma enzima formada durante a via de Embden-Meyerhof ou glicólise anaeróbica e possui um papel importante no metabolismo dos carboidratos necessários para a sobrevivência do parasito no interior da hemácia (MAKLER *et al*, 1993). Possui um análogo no hospedeiro humano, a LDH, que está presente no citoplasma de todas as células do organismo e catalisa, de modo reversível, na presença de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD), o piruvato em lactato; a pLDH catalisa o piruvato através de outra coenzima, a 3-acetil piridina adenina dinucleotídeo (APAD), em L-lactase que resulta em um produto capaz de ser mensurado por espectrofotometria (NOEDL *et al*, 2003; PIPER *et al*, 1999). A pLDH tem um tempo de *clearance* curto, ficando na circulação apenas poucas horas ou dias após a morte dos parasitos (BASCO *et al*, 1995; BROWN *et al*, 2004; GOMEZ *et al*, 1997, MOODY, 2002).

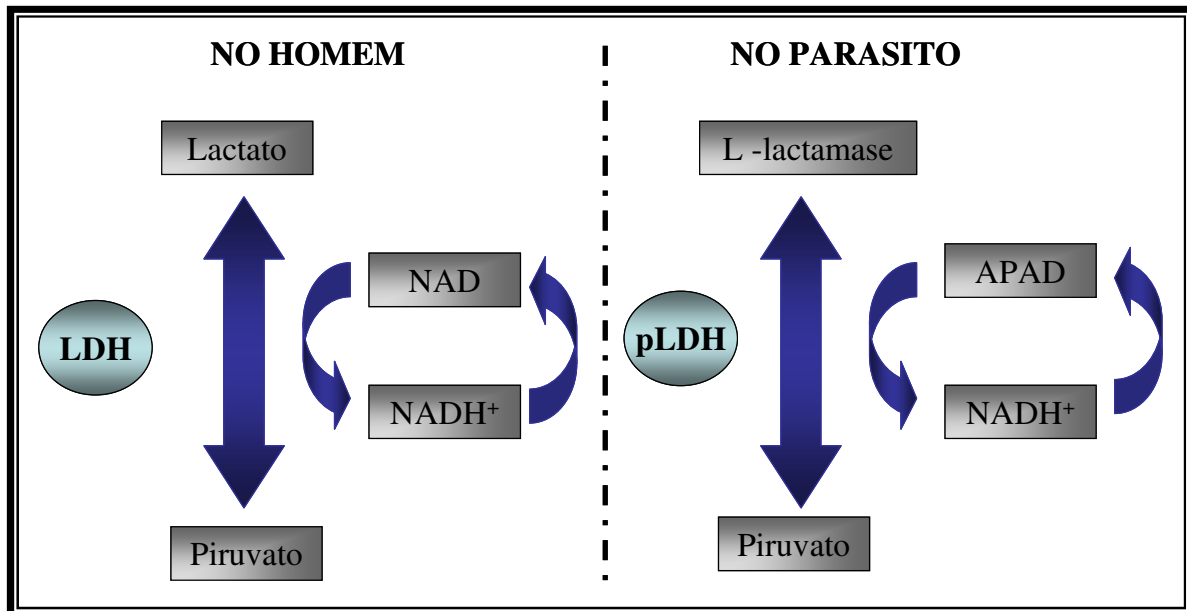


FIGURA 8 – ESQUEMA DA DIFERENÇA ENTRE A pLDH NO HOMEM E NO *Plasmodium spp.*

As primeiras tentativas de utilização da pLDH para mensurar a presença do parasito foram feitas por Makler e colaboradores (1993). Inicialmente, foi proposta a utilização de um método capaz de medir a atividade enzimática da pLDH, uma vez que sua produção é proporcional ao crescimento parasitário. No entanto, necessitava-se de parasitemias superiores a 1% para detecção da atividade enzimática. Assim, optou-se pela detecção imunológica da proteína. Anticorpos monoclonais dirigidos a diferentes epítomos da pLDH foram então produzidos, com o intuito de capturar a proteína em fase sólida em placa de ELISA, após cultivo *in vitro* do parasito (MAKLER, 1993).

Estudos contínuos conduziram ao desenvolvimento do DELI-teste (*double-site enzyme-linked immunodetection*) que se baseia na alta sensibilidade de capturar a pLDH através do ELISA sanduíche, ou de captura, utilizando dois anticorpos monoclonais (MAbs) específicos para epítomos distintos da mesma enzima. Nesse caso, um primeiro anticorpo (captura) é

adsorvido em placas de poliestireno formando a fase sólida. A seguir, adiciona-se a amostra em teste contendo o antígeno, que no caso do DELI-teste é a pLDH. Posteriormente, incuba-se com o segundo anticorpo (detector) marcado com biotina e, a seguir, adiciona-se Estreptavidina marcada com peroxidase e revela-se o teste com a adição de substrato cromogênico que, com a ação enzimática, origina produto solúvel colorido. Esse teste mostrou-se capaz de detectar parasitemias muito baixas (0,005%) de *P. falciparum*. Uma grande vantagem adicional da pLDH é o fato de que formas homólogas são produzidas pelas diferentes espécies plasmodiais, o que permitiu o desenvolvimento de anticorpos monoclonais direcionados para cada espécie (BRASSEUR *et al*, 2001; DRUILHE *et al*, 2001; SANCHEZ, 2001).

Outros estudos em áreas endêmicas na África mostraram que o teste é perfeitamente factível em condições de campo. Entretanto, já nesse estudo foi observada uma limitação, que é o não crescimento ou maturação de parte dos isolados colocados em cultura, tendo isso ocorrido naquele caso com 8 (18%) de 44 amostras frescas testadas no cultivo curto (48 horas). Entretanto, essa limitação não é inerente ao sistema de detecção (ELISA DELI-teste), e sim a fase preliminar, ou seja, o cultivo *in vitro* de amostras frescas (BRASSEUR, 2001; GOLEND, 1997; MORENO, 2001a, 2001b).

Estudos preliminares de avaliação de quimio-sensibilidade a antimaláricos com o DELI-teste foram realizados recentemente em Manaus, Amazonas, em trabalho de colaboração entre o Laboratório de Pesquisas em Malária do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz e a Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM). De 56 isolados de *P. falciparum*, 34 (61%) apresentaram crescimento/maturação após 48 horas permitindo a determinação da concentração inibitória 50% (IC50) das drogas testadas pelo DELI-teste (Leonardo Carvalho, comunicação pessoal). Os resultados mostraram que, das amostras testadas, as frequências de isolados sensíveis foram de 30,3% para Cloroquina, 75% para Quinina, 79,3% para Mefloquina e 95,5%

para Artemisinina. Obviamente, o pequeno número de amostras analisadas não permite conclusões definitivas, mas a ser comprovada essa tendência é preocupante a frequência de resistência a Quinina (25%) e Mefloquina (20,7%). No caso de Cloroquina, é interessante observar que 30% das amostras apresentaram sensibilidade, resultado semelhante ao observado por Couto e colaboradores (1995), que relataram frequências de 31,6% de isolados sensíveis a cloroquina no Estado do Para e 20,2% no Estado do Amapá.

Na América do Sul em geral, a prevalência de infecções por *P. vivax* é muito superior aquela de *P. falciparum*. No Brasil, *P. vivax* é responsável por cerca de 3/4 dos casos de malária registrados anualmente (74,3% de 601.889 mil casos registrados em 2005). Considera-se que *P. vivax* continua apresentando boa sensibilidade a cloroquina, que segue sendo utilizada como droga de primeira linha para as formas assexuadas sanguíneas desse parasito. Entretanto, o aparecimento e desenvolvimento de resistência de *P. vivax* à cloroquina é uma preocupação do Ministério da Saúde. Por isso, estudos *in vivo* já estão sendo conduzidos dentro das atividades da RAVREDA (SVS, 2005)

Diante dessa necessidade, um sistema de cultivo *in vitro* de curto prazo (48 horas) foi desenvolvido para permitir a avaliação de quimiossensibilidade desse parasito à cloroquina utilizando o DELI-teste. Esse método, desenvolvido por pesquisadores do Instituto Pasteur em Paris e da Universidade de Rouen, na França, utiliza uma mistura de meios de cultura RPMI e Waymouth e soro humano AB+. A disponibilidade de anticorpos monoclonais dirigidos a epitopos gênero-específicos da pLDH permite que a avaliação do crescimento desse parasito seja feita pelo DELI-teste.

Assim, um pequeno número de isolados de *P. vivax* também foi avaliado na FMT-AM. Nesse caso, o sucesso das culturas de curto prazo (48 horas) foi menor que as de *P. falciparum*, com 14 (52%) de 27 amostras apresentando maturação/crescimento suficiente para possibilitar a

detecção da produção de pLDH. Somente Cloroquina foi avaliada e, surpreendentemente, 42,8% das amostras apresentaram IC50 acima do limiar de 100nM, ou seja, resistentes de acordo com o limiar adotado (Leonardo Carvalho, comunicação pessoal). Apesar de o limiar para *P. vivax* ainda não estar bem determinado, esses dados demonstram que possa estar havendo perda de sensibilidade dessa espécie de plasmódio à cloroquina, o que é muito preocupante, por ser esta a droga de primeira linha nesse caso, apresentando muitas vantagens sobre as demais, como por exemplo, menos efeitos colaterais e preço muito reduzido.

Esses dados demonstram a importância de se conduzir esse tipo de estudo e mostra que o DELI-teste é viável e facilmente realizável em condições adequadas, como aquelas verificadas nas instalações da FMT-AM em Manaus. Entretanto, o fato de apenas 61% das amostras de *P. falciparum* e 52% das amostras de *P. vivax* ter apresentado crescimento/maturação satisfatórios mostra que ajustes ainda são necessários para aperfeiçoar as culturas de curto prazo. Além disso, é necessário saber se esse tipo de cultura é viável em localidades com infra-estrutura mais precária, como municípios do interior, justamente onde são mais comuns os surtos e epidemias de malária e onde se torna sempre importante verificar o perfil de sensibilidade a antimaláricos.

Por último, o desenvolvimento recente de anticorpos monoclonais específicos para a pLDH de *P. vivax* pelo Dr Michael Makler (Flow Inc., Portland, OR, EUA) nos possibilita a realização de um DELI-teste de fato específico para *P. vivax*, pois o realizado com o anticorpo gênero-específico, apesar da triagem prévia por microscopia, levava ao risco de erros pela presença não detectada de infecção mista por *P. falciparum* nas amostras pesquisadas.

Por esses motivos, e diante da grande potencialidade de aplicação do DELI-teste, esse trabalho foi desenhado para avaliar o desempenho do método no município de Tucuruí, Estado do Pará, que tem enfrentado um elevado índice de notificações de casos de malária nos últimos anos.

2. JUSTIFICATIVA

O controle da malária deixou há alguns lustros de enfatizar a ação vetorial como nos anos 60, onde a assistência aos doentes era tida como atividade complementar. Com o passar dos anos, viu-se que uma ação de controle, baseada na quimioterapia, poderia ser de suma importância. Portanto, as drogas antimaláricas ganharam um maior destaque em relação à doença desde então (FERREIRA, Marcelo, 2002). No entanto, com o advento da multirresistência do *Plasmodium falciparum* aos medicamentos antimaláricos e com o aparecimento da queda de sensibilidade do *Plasmodium vivax* à cloroquina, essa dificuldade tornou-se um obstáculo na estratégia de controle a partir das drogas. Para isso, o conhecimento da sensibilidade dos parasitos da malária às drogas nas regiões endêmicas como o estado do Pará, é de extrema significância por facilitar uma conduta terapêutica mais adequada. O DELI-teste é um teste colorimétrico de metodologia simples, de fácil realização no campo, não laborioso em sua leitura como o microteste de maturação de esquizontes, não utiliza substâncias radioativas como o microteste isotópico, utiliza materiais simples e de fácil aquisição, possui alta sensibilidade e permite a análise relativamente rápida de várias amostras. É atualmente o único teste *in vitro* capaz de avaliar a sensibilidade do *Plasmodium vivax* a drogas de primeira linha como a cloroquina ou àquelas em desenvolvimento. A implantação desse teste em uma localidade do interior do Estado do Pará poderá servir futuramente para tornar possível sua realização em outras localidades de perfil similar, permitindo o monitoramento da resistência, de modo especial no que se refere ao *P. vivax*, que representa 75% da malária brasileira, viabilizando tratamentos mais eficazes e diminuindo a morbidade e a mortalidade por malária (SVS, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1) OBJETIVO GERAL

Avaliação do desempenho do teste imunoenzimático DELI-TESTE para ensaios de quimiosensibilidade *in vitro* do *Plasmodium vivax* em condições de campo no município de Tucuruí, Estado do Pará.

3.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implantar a técnica do DELI-teste em uma localidade (Tucuruí) do interior do Estado do Pará;
- Verificar o perfil de sensibilidade em diferentes concentrações de drogas antimaláricas dos isolados de *Plasmodium vivax* utilizando o Deli-teste;
- Avaliar a utilização de um anticorpo monoclonal anti-pLDH espécie-específico de *P. vivax* como anticorpo de captura no DELI-teste, em comparação com o anticorpo anti-pLDH gênero-específico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1) ÁREA DE ESTUDO

A área escolhida para o estudo foi o município de Tucuruí, localizado a 350km da capital Belém no sudeste do Estado do Pará. Possui uma população de 85.499 habitantes e densidade demográfica de 38,95 habitantes/Km². Banhado pelo rio Tocantins, dispõe de um grande lago formado na barragem do mesmo rio para construção da Usina Hidrelétrica de Tucuruí (UHT), onde estão localizadas 1.600 ilhas, das quais somente 600 são habitadas. O município é um dos que contribuem com o maior número de casos de malária no Pará, registrando 5.022 casos notificados da doença no ano 2000, passando para 8.208 casos em 2005. Segundo o Sistema de Informações em Epidemiologia em Malária (SIVEP-MALÁRIA), o local que recebeu maior número de notificações em Tucuruí nos últimos anos foi o Posto de Saúde Liler Leão, localizado no bairro do Mangal (IBGE, 2006; SVS, 2005).

4.2) CASUÍSTICA E TRIAGEM DOS PACIENTES

Foram utilizados no estudo 44 pacientes positivos em gota espessa para malária por *P. vivax*, atendidos em três locais: Posto de Saúde do Rio Onze, Hospital Regional de Tucuruí e Posto de Saúde Liler Leão.

Os pacientes incluídos eram de ambos os sexos, com idades entre 15 e 65 anos, residentes nas zonas rural e urbana do município, independente do número de vezes que tiveram malária.

Foram excluídos pacientes menores de 15 anos; grávidas; pacientes com suspeita de malária grave e complicada; aqueles que apresentaram resultado positivo para malária mista; pacientes que estavam no momento da coleta em tratamento ou que tomaram antimalárico nos últimos 30 dias, ou ainda aqueles que estavam fazendo uso de algum antibiótico.

4.3) CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Foi utilizado um termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 1) com intuito de justificar a pesquisa bem como prestar informações do objetivo da mesma e esclarecer o procedimento a ser utilizado, as precauções e a privacidade dos participantes. Salienta-se que este termo de consentimento, juntamente com o questionário (ANEXO 2) utilizado para obtenção de dados do paciente e das amostras biológicas, foram enviados para o ALECEM/IEC/SVS/MS e posteriormente encontrar-se-ão sob custódia do Laboratório de Pesquisas em Malária do Departamento de Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz.

4.4) METODOLOGIA APLICADA AO DELI-teste

4.4.1) COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Foi obtido um volume de 5ml de sangue através da coleta por punção de uma das veias do antebraço do paciente com malária utilizando tubos Vacutainer[®] com anticoagulante EDTA, seguida de confecção de lâminas de esfregaço sanguíneo – fixado com metanol – e gota espessa, ambos corado pelo Giemsa. A quantificação da parasitemia foi realizada: 1) pela contagem de parasitos em 200 leucócitos (gota espessa), que permite inferir o numero de parasitos por mm³ de

sangue (tomando-se como base uma leucometria de 8000 leucócitos por mm^3 de sangue, deve-se assim multiplicar o número de parasitos encontrados em 200 leucócitos pelo fator 40); 2) pelo método do percentual de hemácias parasitadas, a partir da contagem de todas as formas assexuadas do parasito em 5.000 hemácias.

4.4.2) PREPARO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Para o cultivo *in vitro* que visou a maturação do *Plasmodium vivax*, foi utilizado meio específico (doravante denominado “meio vivax”) consistindo de uma mistura de 150mL de meio RPMI-1640 (Gibco) (previamente tamponado com 35mM de HEPES e 24mM de Bicarbonato de Sódio a 5g/mL; 50mL de meio Waymouth (Sigma); uma gota de solução de Hipoxantina 1mg/mL; duas gotas de sulfato de gentamicina a 10mg/mL; e suplementado com 29mL de um *pool* de plasma humano recalcificado do tipo AB+.

O sangue colhido passou por um processo de centrifugação (2000rpm, 10 minutos, temperatura ambiente). O plasma foi retirado e congelado e as hemácias lavadas duas vezes com RPMI puro. Uma alíquota de hemácias foi criopreservada em solução criopreservante (Glicerolyte). Preparou-se uma suspensão de hemácias parasitadas em meio completo, sendo que para *P. vivax* utilizou-se 450 μL de hemácias para 9,75mL de “meio vivax”. Essa suspensão foi utilizada no DELI-teste (ver abaixo).

4.4.3) PREPARO E DILUIÇÃO DAS DROGAS

Para ensaios com amostras de *P. vivax*, foi utilizada somente a cloroquina. O sal da droga foi pesado na quantidade de 5mg diretamente em tubos de 15ml, utilizando balança analítica. A droga era previamente dissolvida em 1mL de etanol e aliqüotadas (100µl cada) e congeladas a -20°C. Ao serem descongeladas, a essas soluções eram adicionados 233µl de meio RPMI puro sendo assim constituída a solução-mãe, que era utilizada por um período máximo de uma semana para preparo das soluções de uso (soluções-filha). As soluções-filha eram preparadas da seguinte maneira (**FIGURAS 9**):

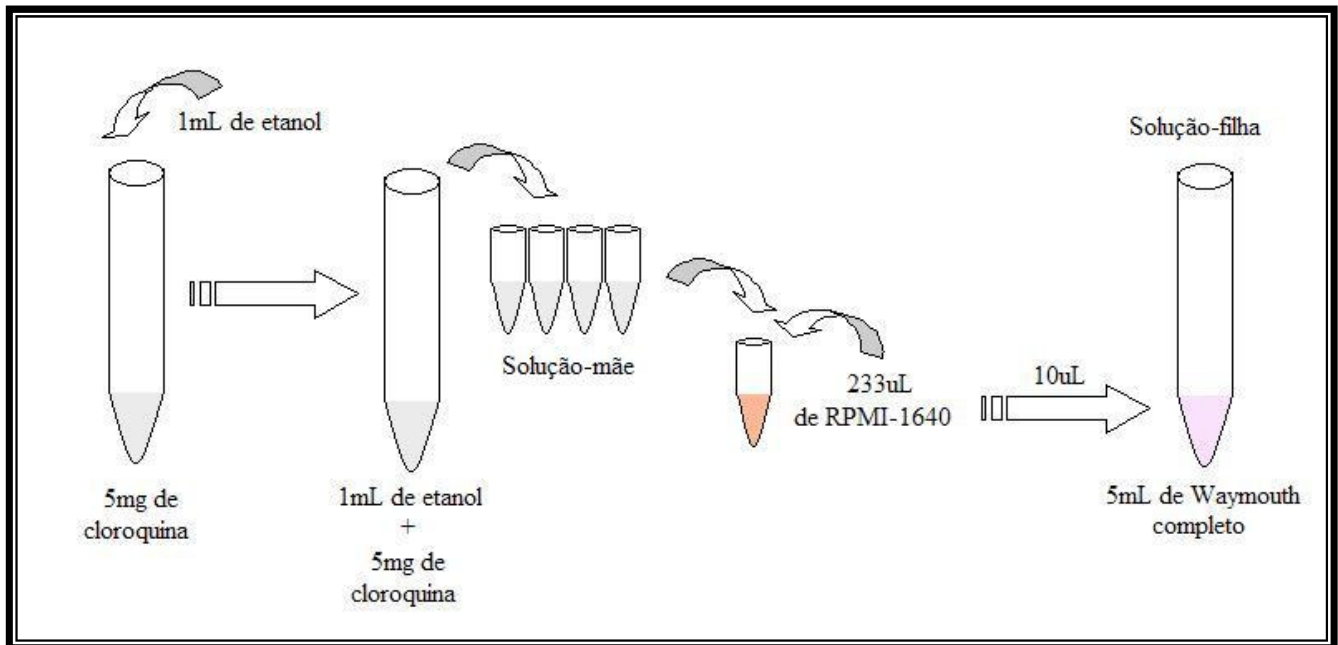


FIGURA 9 – PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE CLOROQUINA PARA O CULTIVO DO *Plasmodium vivax*.

As soluções-filhas eram utilizadas apenas no dia da preparação, a cada dia era preparada uma solução fresca. Para o preparo das soluções-filha, utilizou-se o meio específico para o *P. vivax*.

A partir da solução-filha, preparava-se a placa com as diluições seriadas de cada droga. Isso era feito da seguinte maneira (e como esquematizado na FIGURA 10): nos poços das colunas 2-12 da placa de 96 poços, colocavam-se 50 μ L do meio de cultura completo; nos poços das colunas 1 e 2, adicionava-se 50 μ L da solução-filha (ou seja, os poços da coluna 2 ficavam com 100 μ l, com metade da concentração de droga dos poços da coluna 1). O conteúdo dos poços da coluna 2 eram homogeneizados e 50 μ L eram transferidos para os poços da coluna 3, homogeneizados e novamente 50 μ L transferidos para os poços da coluna 4 e assim sucessivamente, até os poços da coluna 9. Nessa coluna, após homogeneização, 50 μ L eram descartados. Desse modo, obtinha-se 9 diluições seriadas das drogas, com concentrações de 600-2,34ng/mL. Nos poços 10-12 não se adicionava droga, e assim serviam como controle (sem interferência de drogas) para determinar 100% de crescimento do parasito, informação crucial para o cálculo da concentração inibitória 50% (IC50) de cada droga em cada isolado.

Com a placa pronta, 200 μ L da suspensão de hemácias (vide início desse item) eram depositados em cada poço da placa de cultura (todos os ensaios em duplicata). As placas foram mantidas em microaerofilia pela utilização de um aparato (dessecador) contendo uma vela e água para manter a umidade, e armazenadas em estufa regulada a 37°C por 48 horas. Ao fim desse período, o sobrenadante de um dos poços das colunas 10-12 (sem drogas) era descartado e, com o tapete de hemácias, confeccionava-se um esfregaço posteriormente fixado em metanol e corado pelo Giemsa para verificação microscópica do crescimento do parasito (avaliação de parasitemia com a contagem de 5.000 hemácias e descrição das formas parasitárias encontradas). A placa era então imediatamente congelada a -20°C até que pudesse ser realizado o DELI-teste.

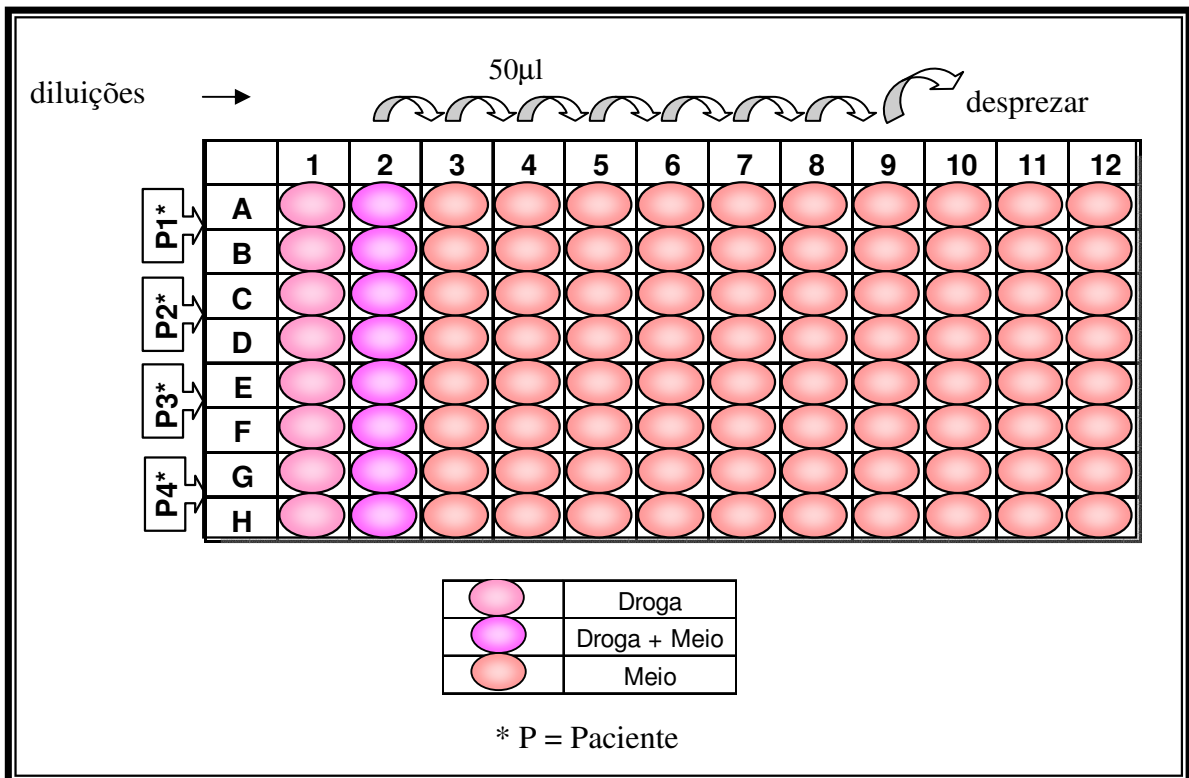


FIGURA 10 – ESQUEMA DE PREPARAÇÃO DA PLACA DE CULTURA PARA *Plasmodium vivax*, UTILIZANDO A CLOROQUINA COMO DROGA.

4.4.4) DELI-TESTE

Para execução do DELI-teste, os seguintes anticorpos monoclonais foram utilizados (Dr Michael Makler, Flow Inc., Portland, EUA):

- MAb 6C9: anti-LDH de gênero de *Plasmodium* (captura)
- MAb 11D: anti-LDH de *P. vivax* (captura)
- MAb 19G7: anti-LDH gênero-específico de *Plasmodium spp.*, marcado com biotina (detecção).

OBS: o MAb 6C9 (gênero-específico) vinha sendo usado como anticorpo de captura para LDH de *P. vivax*. Nesse trabalho, utilizamos o MAb 11D, específico de *P. vivax*, de modo a garantir a confiabilidade dos dados, eliminando potenciais interferências de infecções mistas não diagnosticadas.

As placas foram sensibilizadas *overnight* a 4°C com os anticorpos de captura (MAb 6C9: 5µg/mL; MAb 11D: 5µg/mL) diluídos em PBS-DELI. A seguir, foram lavadas e saturadas por 4 horas com uma solução de PBS-DELI suplementada com 0,5% com Soro Albumina Bovina (BSA), a temperatura ambiente. As placas com as culturas de parasito passaram por um processo de congelamento-descongelamento três vezes, resultando na lise das hemácias e dos parasitos e conseqüente liberação da pLDH. O lisado de cada poço foi então transferido (puro ou diluído em PBS-DELI)* para poços das placas de ELISA sensibilizadas anteriormente com anticorpos monoclonais (6C9 ou 11D). As placas foram incubadas durante 1 hora a 37°C e, em seguida, lavadas com PBS-BSA 0,5% (5 vezes). Após a lavagem, seguia-se a incubação com o anticorpo monoclonal de detecção biotinilado anti-pLDH (19g7) durante 1 hora a 37°C. Após essa segunda incubação as placas foram novamente lavadas com PBS-BSA 0,5% (5 vezes) e, finalmente,

incubadas com Estreptavidina-peroxidase (Sigma, 1:10.000) a temperatura ambiente por 30 minutos. As placas foram então lavadas com PBS-BSA 0,5% (9 vezes) e o substrato TBM (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) foi adicionado e mantido por 5 minutos. A reação foi interrompida pela adição de ácido fosfórico (H_3PO_4) 1M, e a intensidade da cor foi medida no leitor de microplacas no comprimento de onda de 450nm.

*: a intensidade da coloração no ELISA é proporcional a quantidade de pLDH nos poços. Uma vez que cada isolado é colocado em cultivo com diferentes parasitemias iniciais, e cada isolado pode crescer de maneira diferente, as densidades óticas (DOs) podem variar bastante, em alguns casos proporcionando leituras muito elevadas que impossibilitam a observação da queda nas DOs nos poços em que a droga foi efetiva, devido a formação de um *plateau* de DO. Para contornar isso, uma avaliação prévia das DOs era feita: uma amostra de um poço controle (sem droga) de cada isolado era testado em duas diluições (1:2 e 1:10); a diluição que proporcionasse uma DO mais próxima do intervalo 0,500-1,500 era a escolhida para a realização do teste definitivo. Caso na diluição 1:2 a leitura ainda ficasse abaixo de 0,500, a amostra era testada pura. E caso na diluição 1:10 a leitura ficasse acima de 1,500, o DELI-teste era conduzido mas, caso ainda mantivesse o *plateau* de DO, a amostra era ainda mais diluída (por exemplo, a 1:50).

4.4.5) CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50% DO CRESCIMENTO DO PARASITO (IC50)

A IC50 de cloroquina para cada isolado foi calculada a partir de curvas traçadas contendo na abscissa as concentrações-teste da droga e na ordenada as DOs correspondentes. As curvas

ideais produzidas nesse caso são curvas do tipo sigmoidal, na qual até uma determinada concentração da droga o parasito cresce bem, produzindo um *plateau* de DO, e a uma dada concentração onde a droga de fato age, existe uma queda brusca na DO, refletindo o não crescimento/maturação do parasito naquela concentração de droga. Para calcular a IC50, a concentração de droga que inibe em 50% o crescimento do parasito, utiliza-se a seguinte formula:

$$\text{DO}_{\text{IC50}} = (\text{média das DOs dos poços sem droga} - \text{menor DO registrada na curva} / 2) - \text{menor DO registrada na curva}$$

Projeta-se então o valor de DO_{IC50} na curva e assim determina-se a que concentração da droga corresponde aquele valor de DO_{IC50} .

5. RESULTADOS

Dos 44 pacientes atendidos, a idade variou de 16 a 63 anos, sendo que a maioria (73%) era do sexo masculino, e desses a ocupação mais freqüente observada foi a de pescador/agricultor. Nos pacientes do sexo feminino, a ocupação que mais prevaleceu foi a de dona de casa. Em relação ao número de vezes que contraíram a doença, 9% declararam nunca ter contraído malária anteriormente, 5% alegaram ter contraído somente uma vez, 43% tiveram de duas a cinco vezes, 18% entre seis e nove vezes, e 25% mais de nove vezes.

A densidade parasitária nos pacientes, avaliada pelo exame da gota espessa, variou de 500 a 35.000 parasitos por mm^3 de sangue, a maioria (62%) abaixo de 10.000 parasitos por mm^3 de sangue. As parasitemias medidas como percentual de hemácias parasitadas em relação ao total de hemácias, avaliadas na distensão sanguínea, mostraram menor variação, com valores entre 0,08% e 0,8%, e não houve uma relação direta entre os valores observados em cada tipo de contagem (**TABELA 1**). Considerando uma contagem de 8.000 leucócitos e de 5.000.000 de hemácias em 1 mm^3 de sangue, uma densidade de 1.000 parasitos por mm^3 de sangue (25 parasitos por 200 leucócitos) deveria equivaler a uma parasitemia de 0,02%. Entretanto, os valores de leucometria e hematimetria podem variar amplamente, principalmente em indivíduos com malária, o que justifica a não equivalência dos dados. Uma vez que a contagem de parasitos/ mm^3 de sangue é feita em função de um número fixo hipotético (8.000) de leucócitos, podemos considerar que a contagem percentual de hemácias parasitadas é mais acurada, por se basear em dados precisos (percentual de hemácias parasitadas em relação ao total de hemácias).

PACIENTE	DENSIDADE PARASITÁRIA			CURVA DE IC50	
	mm ³	Pré-cultivo (%)	Pós-cultivo (%)	Disponível	Não disponível
001V	2.500	0,2	0,4	X	-
002V	10.000	0,3	0,4	X	-
004V	1.000	0,16	0,2	X	-
005V	1.500	0,2	0,45	X	-
006V	3.500	0,2	0,6	X	-
008V	10.000	0,4	0,6	X	-
011V	1.000	0,12	0,40	-	X
012V	20.000	0,4	0,8	X	-
013V	5.000	0,3	0,5	X	-
014V	5.000	0,2	0,7	X	-
015V	15.000	0,4	0,8	X	-
016V	4.000	0,3	0,5	X	-
017V	20.000	0,40	0,90	-	X
018V	25.000	0,8	1	X	-
019V	5.000	0,3	0,5	X	-
021V	6.000	0,2	0,45	X	-
022V	7.000	0,20	0,50	-	X
025V	20.000	0,56	0,72	X	-
026V	5.000	0,3	0,6	X	-
027V	10.000	0,36	0,6	X	-
028V	15.000	0,40	0,50	-	X
029V	25.000	0,50	0,70	-	X
030V	2.000	0,1	0,3	X	-
031V	1.000	0,10	0,50	-	X
033V	12.500	0,32	0,62	-	X
034V	5.000	0,20	0,50	-	X
036V	500	0,09	0,30	-	X
037V	5.000	0,20	0,50	-	X
038V	6.000	0,30	0,60	-	X
039V	500	0,08	0,34	X	-
040V	3.500	0,1	0,31	X	-
041V	30.000	0,6	0,8	X	-
042V	2.000	0,2	0,6	X	-
043V	2.000	0,20	0,60	-	X
045V	1.500	0,10	0,50	-	X
046V	1.500	0,10	0,30	-	X
047V	15.000	0,4	0,7	X	-
048V	10.000	0,30	0,40	-	X
049V	15.000	0,4	0,6	X	-
050V	2.000	0,1	0,3	X	-
051V	35.000	0,8	1	X	-
052V	3.000	0,20	0,50	-	X
053V	8.000	0,3	0,5	X	-
054V	2.500	0,15	0,3	X	-

TABELA 1 – DENSIDADE PARASITÁRIA E DISPONIBILIDADE DA IC50 DAS AMOSTRAS.

Dos 44 isolados de *P. vivax* estudados, na ausência de droga (poços controles) todos apresentaram crescimento ou pelo menos mantiveram a parasitemia inicial após o cultivo de curto prazo (48 horas) (**TABELA 1**). As formas de trofozoítos jovens e maduros foram prevalentes nas lâminas de esfregaço tanto pré- quanto pós-cultura, sendo que os esquizontes tiveram maior presença naquelas pós-cultura (**FIGURAS 11 e 12**).

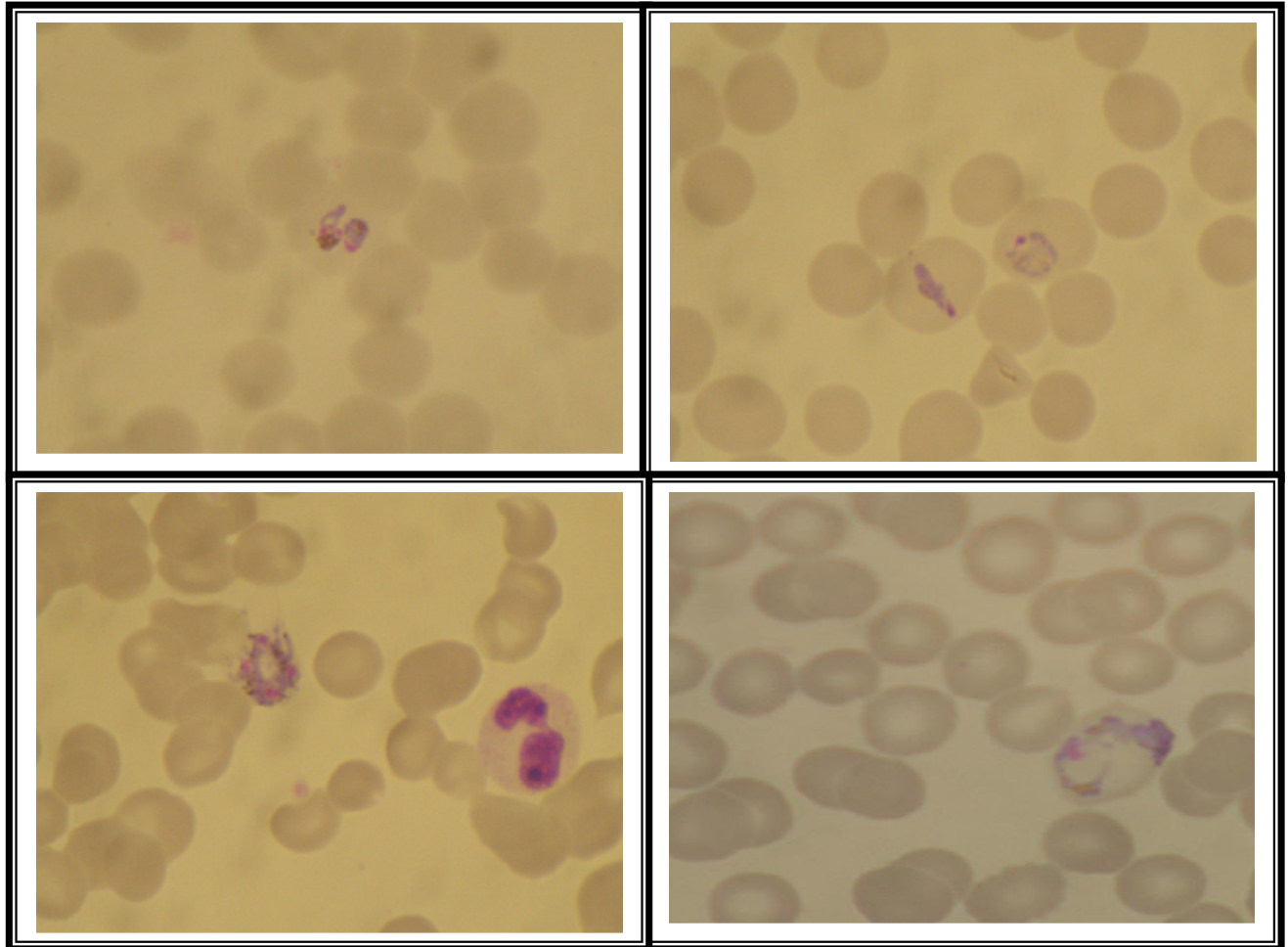


FIGURA 11 – FORMAS EVOLUTIVAS DO *Plasmodium vivax* ENCONTRADAS NAS LÂMINAS DE ESFREGAÇO PRÉ CULTIVO DE 48 HORAS DE INCUBAÇÃO.

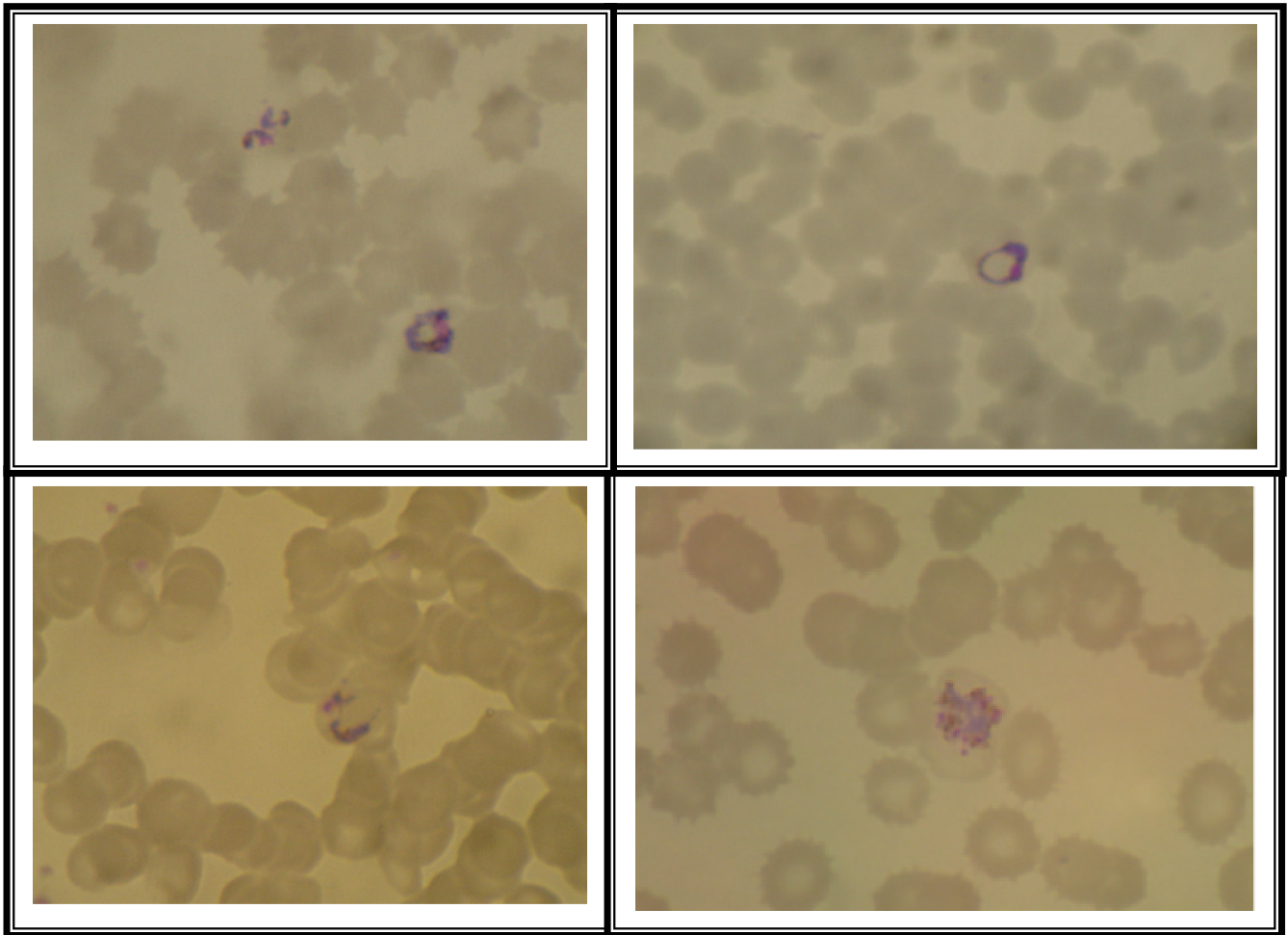


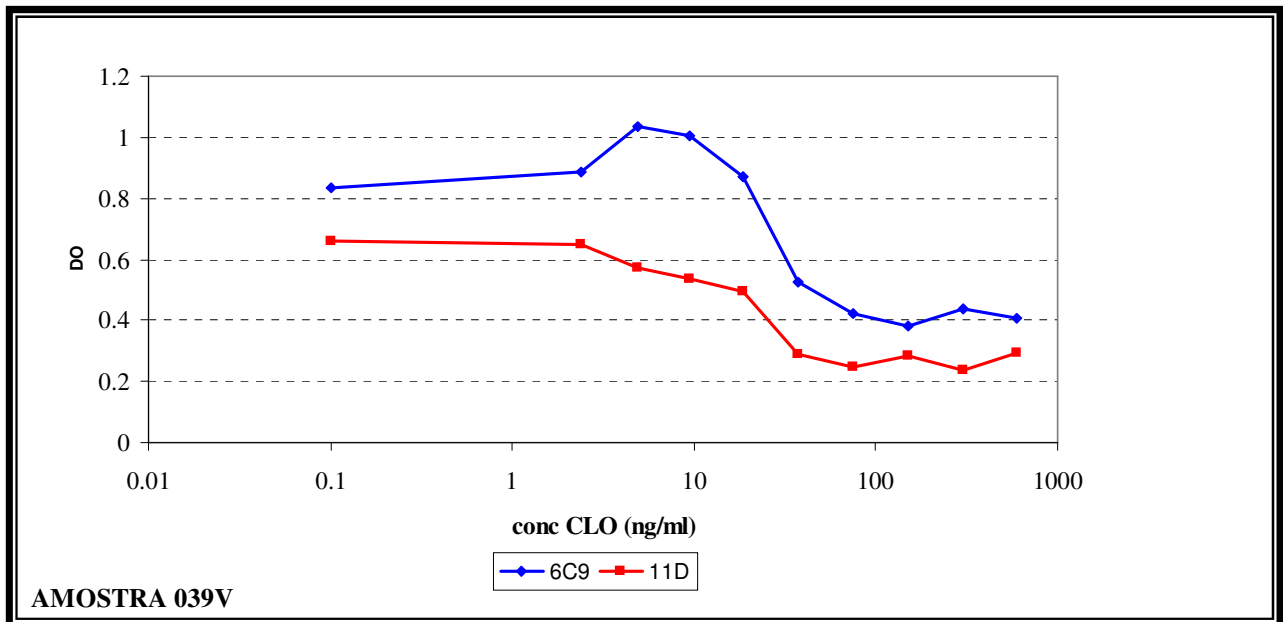
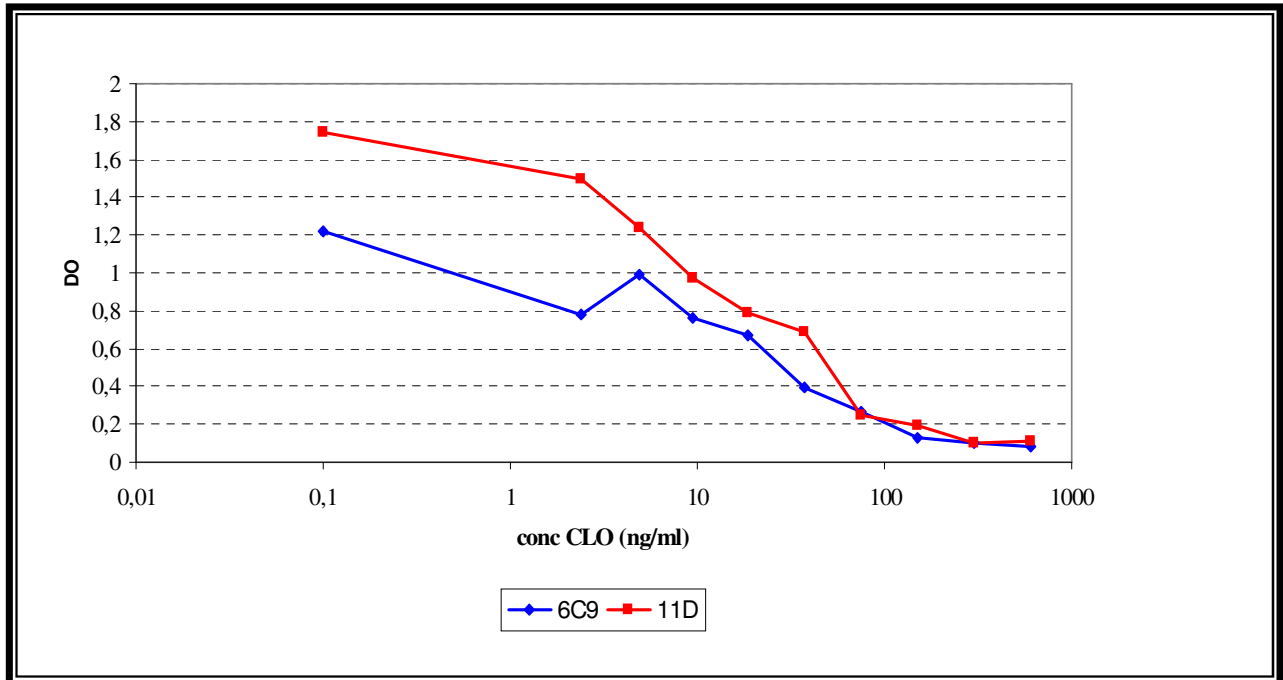
FIGURA 12 – FORMAS EVOLUTIVAS DO *Plasmodium vivax* ENCONTRADAS NAS LÂMINAS PÓS CULTIVO DE 48 HORAS DE INCUBAÇÃO.

Uma vez que a produção de pLDH é diferente para cada isolado, em função da parasitemia inicial e da intensidade com que cada isolado cresce, antes de realizar o DELI-teste propriamente dito foi necessário determinar, para cada amostra, a diluição ideal que seria utilizada nos ensaios. Para isso, realizou-se previamente um ELISA com amostras de poços sem droga (controles), diluídas a 1:2 e a 1:10, utilizando como anticorpo de captura o monoclonal 6C9. Foi definido que, idealmente, a melhor diluição seria aquela que resultasse em uma DO entre 0,500 e 1,500, uma vez que nesse intervalo não se corre o risco de haver antígeno (LDH) de menos, resultando em sensibilidade baixa do teste, ou em excesso, resultando na formação de *plateau* de DO, em ambos os casos prejudicando a análise das curvas de sensibilidade. A TABELA 2 mostra os valores de densidade ótica (DO) de cada amostra em cada diluição. Com base nessa avaliação prévia, 28 (63,6%) amostras foram testadas na diluição 1:2, 8 (18,2%) na diluição 1:10, 5 (11,4%) na diluição 1:5, 1 (2,3%) na diluição de 1:50 e 2 (4,5%) não foram diluídas, sendo adicionado o hemolisado diretamente na placa previamente sensibilizada com anticorpo.

Amostra	Diluição de 1:2	Diluição de 1:10	Diluição selecionada				
			1:2	1:5	1:10	1:50	Puro
001V	0,646	0,437	X				
002V	1,380	0,608		X			
004V	0,925	0,565	X				
005V	2,235	1,435			X		
006V	2,005	0,985		X			
008V	1,906	1,170			X		
011V	0,453	0,270	X				
012V	1,748	0,735			X		
013V	0,923	0,483	X				
014V	1,207	0,626	X				
015V	1,001	0,614			X		
016V	1,338	0,750	X				
017V	0,960	0,687		X			
018V	1,547	0,931		X			
019V	0,729	0,450	X				
021V	0,821	0,490	X				
022V	0,956	0,561	X				
025V	0,875	0,545	X				
026V	0,494	0,264	X				
027V	0,953	0,361	X				
028V	0,672	0,260	X				
029V	1,503	0,553	X				
030V	1,095	0,489	X				
031V	0,719	0,301	X				
033V	0,687	0,265	X				
034V	0,365	0,160	X				
036V	0,305	0,142	X				
037V	0,214	0,088					X
038V	1,058	0,311	X				
039V	1,742	0,511	X				
040V	1,063	0,404	X				
041V	0,863	0,259	X				
042V	2,757	2,626				X	
043V	0,097	0,050					X
045V	0,254	0,104	X				
046V	0,502	0,141	X				
047V	1,993	0,687			X		
048V	2,042	0,561	X				
049V	2,715	1,024			X		
050V	2,398	0,726			X		
051V	2,685	1,744			X		
052V	0,541	0,175	X				
053V	1,295	1,202	X				
054V	0,325	0,349		X			

TABELA 2 – AVALIAÇÃO PRÉVIA DENSIDADE ÓTICA PARA A DEFINIÇÃO DA DILUIÇÃO UTILIZADA NOS TESTES.

Após avaliar a diluição ideal para testar as amostras utilizando como referência o lisado de poços controles (sem droga) e como anticorpo de captura o monoclonal 6C9, gênero-específico, todas as amostras foram testadas frente a esse mesmo anticorpo e também frente ao monoclonal 11D, específico para pLDH de *P. vivax*. Na maioria dos casos, os perfis das curvas obtidas com os dois monoclonais foram semelhantes, mesmo que apresentassem diferenças de DO em cada ponto da curva, como exemplificado nas FIGURAS 13 e 14. Assim, 53,8% dos 26 isolados que apresentaram curvas de sensibilidade interpretáveis mostraram melhores curvas com o anticorpo espécie-específico (11D), enquanto que 46,1% mostraram melhores curvas com o anticorpo gênero-específico (6C9). Para calcular as IC50, para cada amostra foi escolhida a curva que apresentou o melhor perfil.



FIGURAS 13 E 14 – EXEMPLOS (AMOSTRAS 005V E 039V) DE COMPARAÇÃO ENTRE AS CURVAS DE SENSIBILIDADE A CLOROQUINA UTILIZANDO OS ANTICORPOS MONOCLONAIS 6C9 E 11D

Em oito amostras (011V, 027V, 030V, 033V, 37V, 045V, 046V e 052V) (**FIGURA 15**) a produção de pLDH, além de baixa, foi homogênea em todos os poços, resultando em linhas planas e não permitindo a determinação da IC50. Em outros 10 casos, as curvas não foram interpretáveis, em geral porque produziam pontos irregulares.

Em 26 (59,2%) das 44 amostras, a produção de pLDH sob diferentes concentrações de cloroquina permitiu o desenho de curvas bem traçadas, permitindo assim o cálculo de IC50. As curvas são mostradas nas FIGURAS 16 a 22.

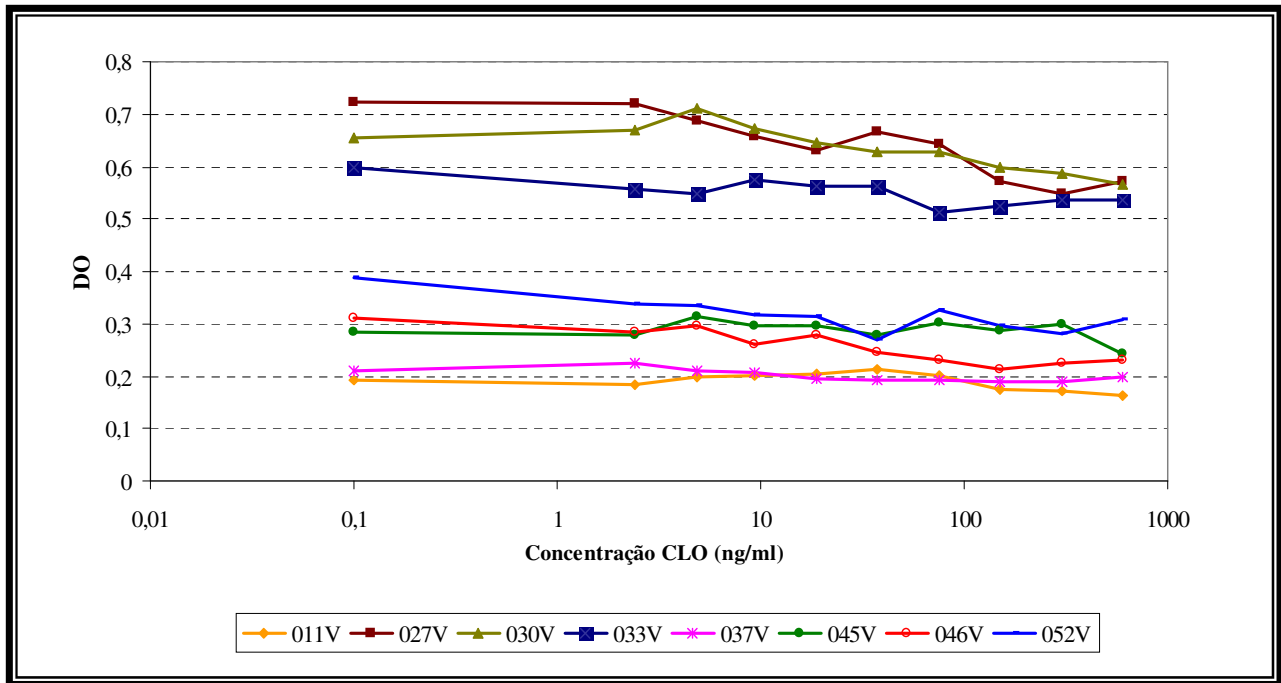


FIGURA 15: AMOSTRAS QUE NÃO PERMITIRAM A DETERMINAÇÃO DA IC50 POR RESULTAREM EM LINHAS PLANAS

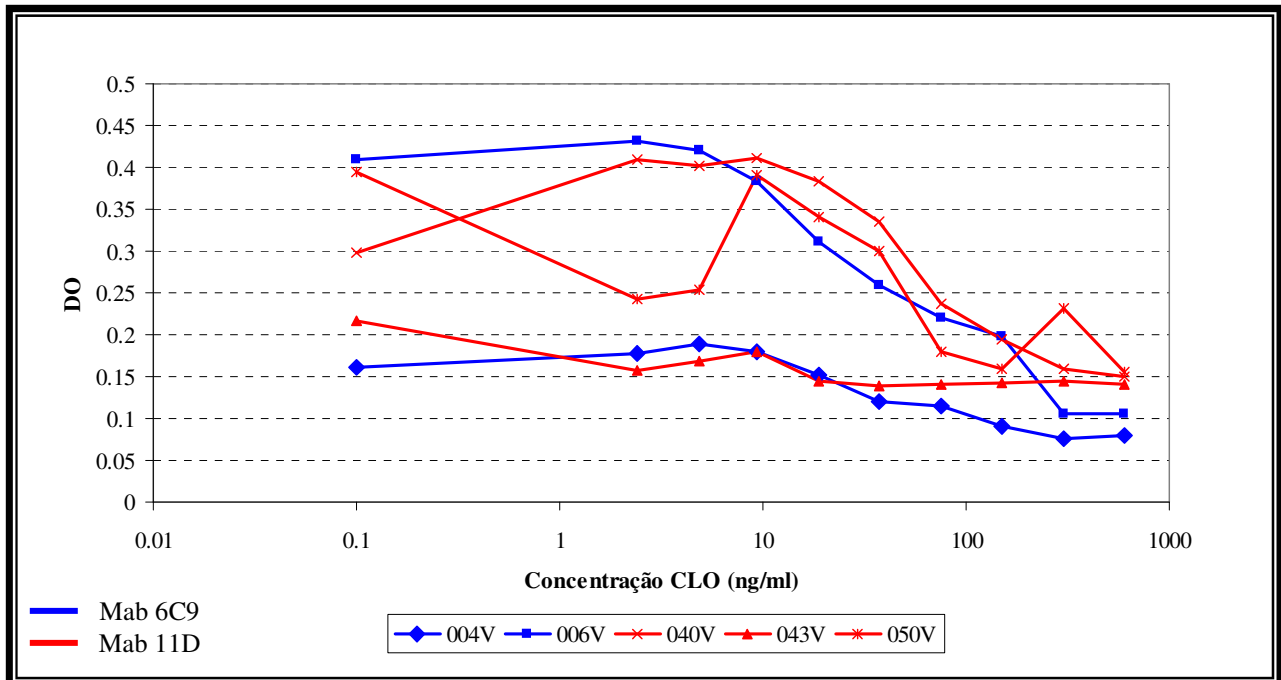


FIGURA 16 – CURVAS DE SENSIBILIDADE A CLOROQUINA DAS AMOSTRAS 004V, 006V, 040V, 043V E 050V.

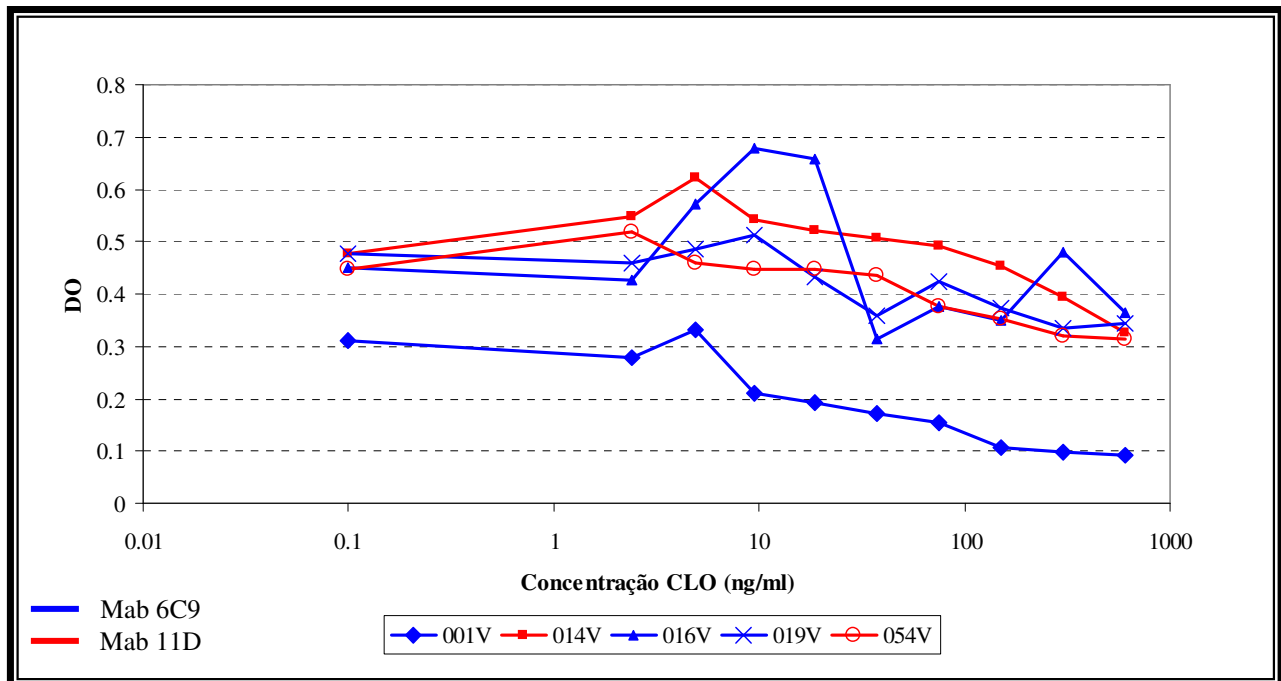


FIGURA 17 – CURVAS DE SENSIBILIDADE A CLOROQUINA DAS AMOSTRAS 001V, 014V, 016V, 019V E 054V.

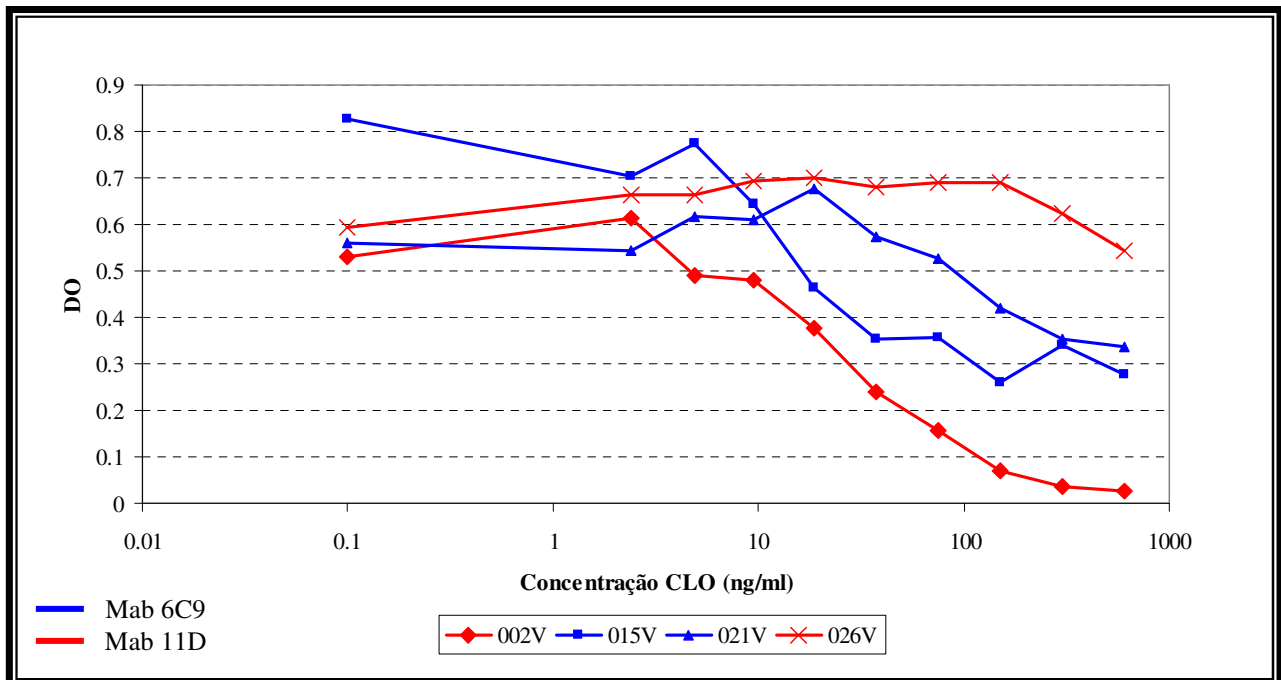


FIGURA 18 – CURVAS DE SENSIBILIDADE A CLOROQUINA DAS AMOSTRAS 002V, 015V, 021V E 026V.

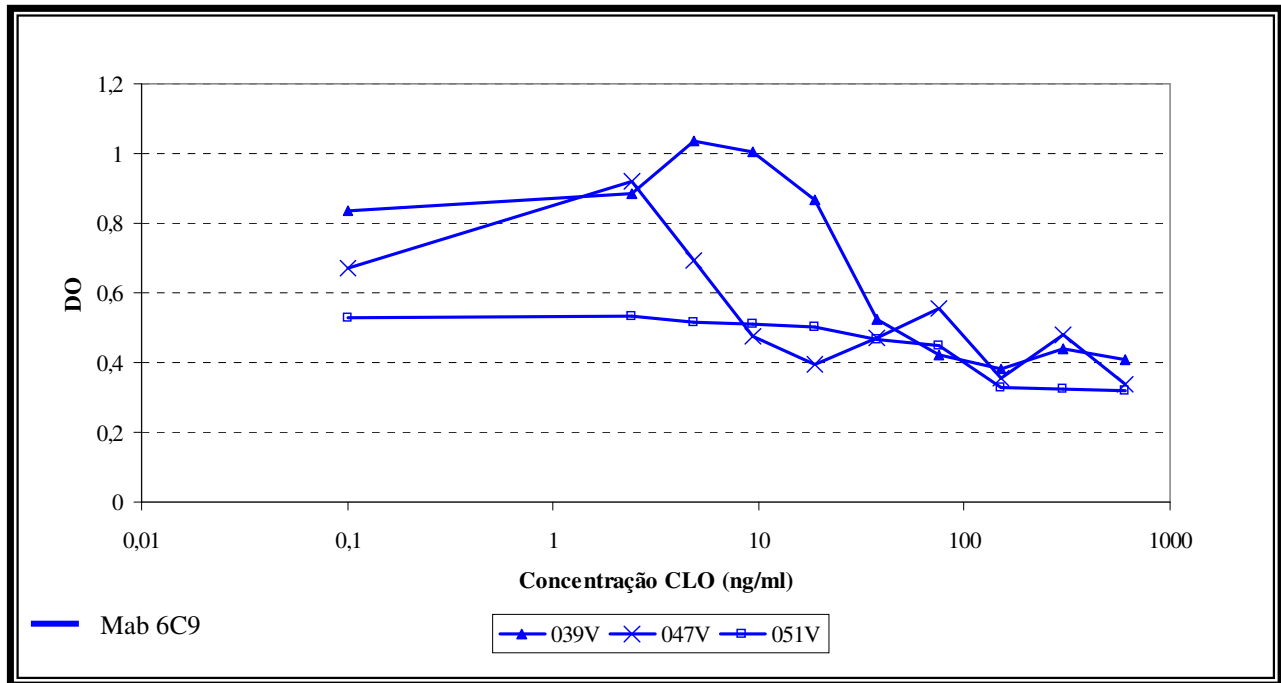


FIGURA 19 – CURVAS DE SENSIBILIDADE A CLOROQUINA DAS AMOSTRAS 039V, 047V E 051V.

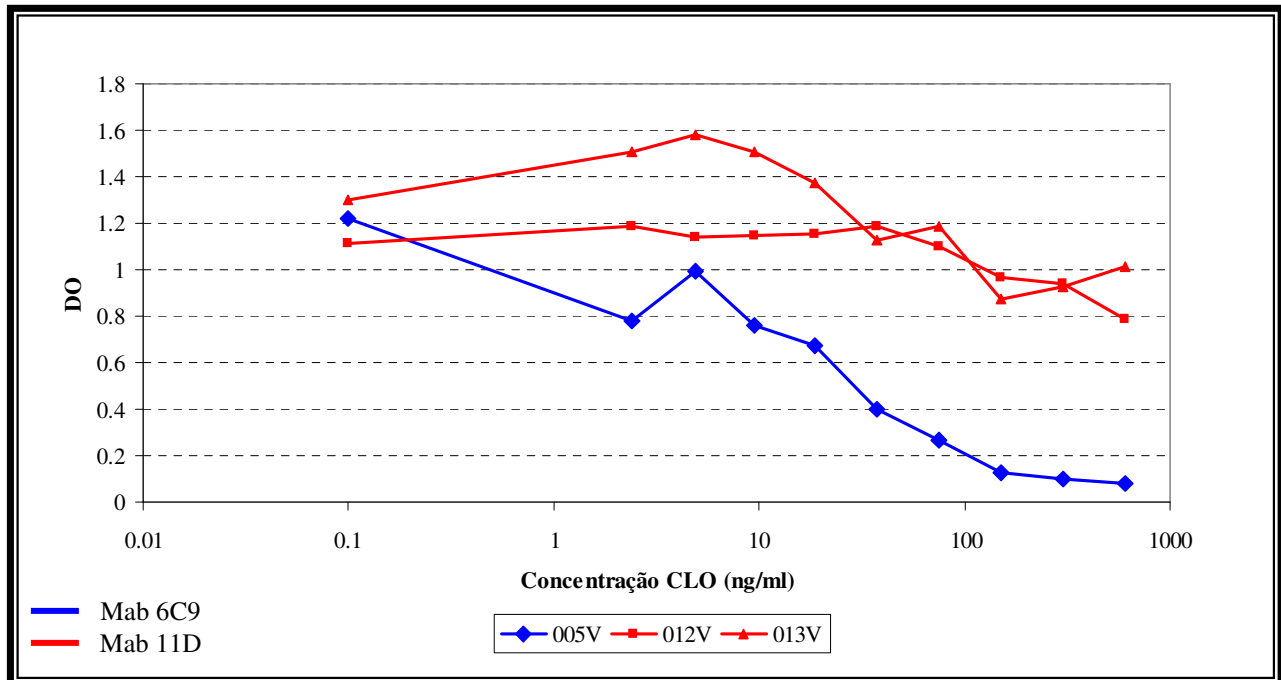


FIGURA 20 – CURVAS DE SENSIBILIDADE A CLOROQUINA DAS AMOSTRAS 005V, 012V E 013V.

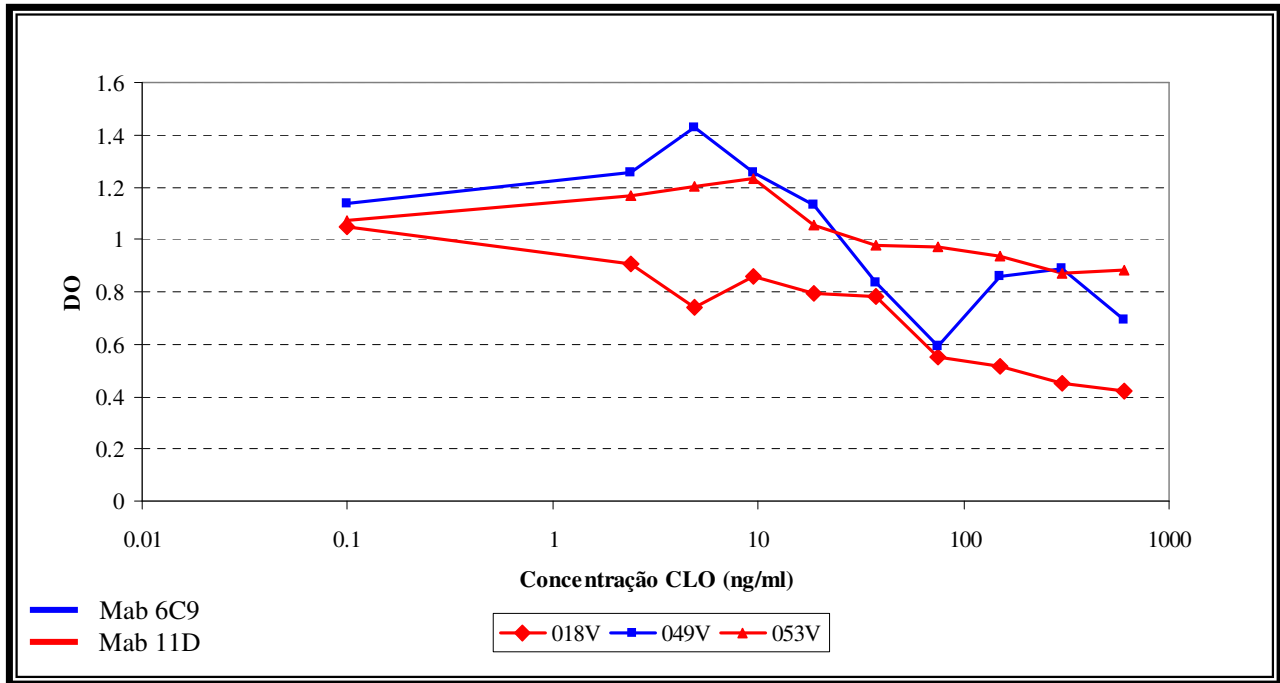


FIGURA 21 – CURVAS DE SENSIBILIDADE A CLOROQUINA DAS AMOSTRAS 018V, 049V E 053V.

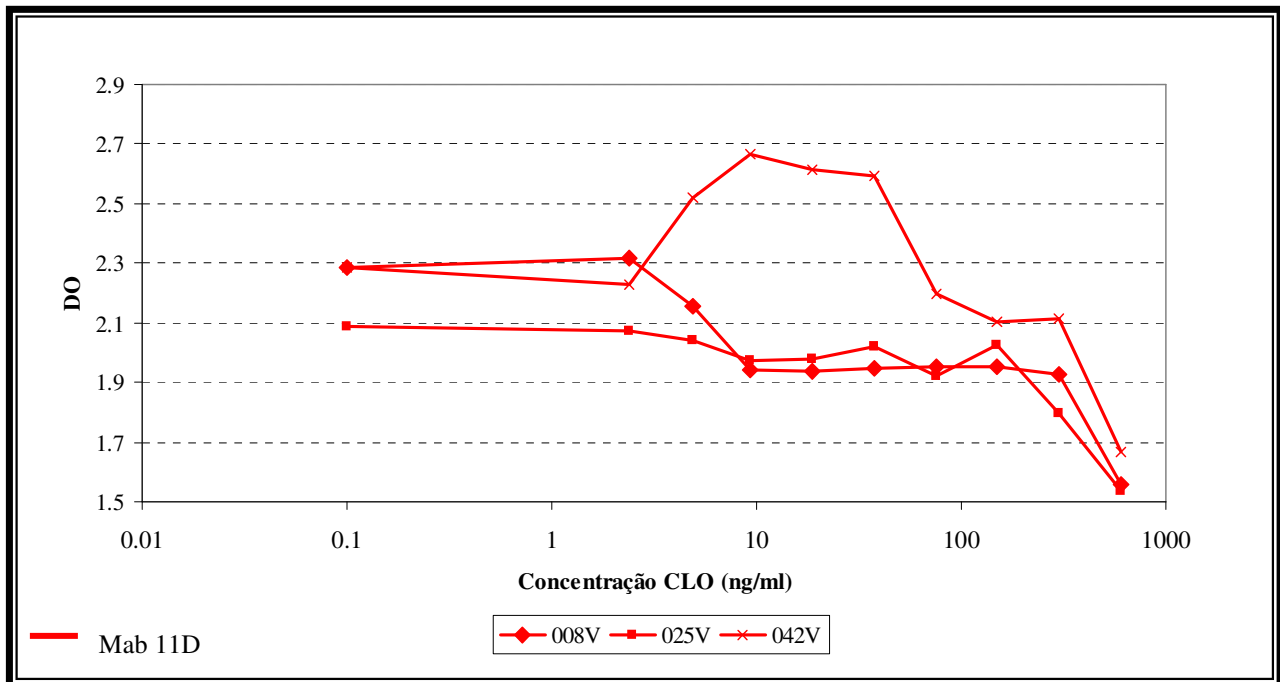


FIGURA 22 – CURVAS DE SENSIBILIDADE A CLOROQUINA DAS AMOSTRAS 008V, 025V E 042V.

Não houve uma relação entre a parasitemia inicial e o sucesso da cultura, ou seja, amostras com maior parasitemia não necessariamente cresceram bem e permitiram o estabelecimento de curvas interpretáveis.

Das 18 amostras que produziram curvas não interpretáveis, mais da metade correspondeu as 10 amostras consecutivas 027V a 038V, sugerindo que possa ter havido algum problema, não identificado, nos dias em que essas culturas foram feitas. Aparentemente, o problema não foi relacionado ao crescimento/maturação do parasito, uma vez que em todos esses casos a parasitemia aumentou após 48 horas de cultivo *in vitro*.

A FIGURA 23 mostra a distribuição dos valores de IC50 das 26 amostras que produziram curvas interpretáveis. Para definir o status de sensível ou resistente de cada amostra, utilizamos como limiar a concentração de 100nM de cloroquina, que é o limiar já bem estabelecido para *P. falciparum*. Observamos que 12 (46,2%) das 26 amostras interpretáveis apresentaram valores de IC50 acima desse limiar, sendo consideradas assim resistentes a cloroquina.

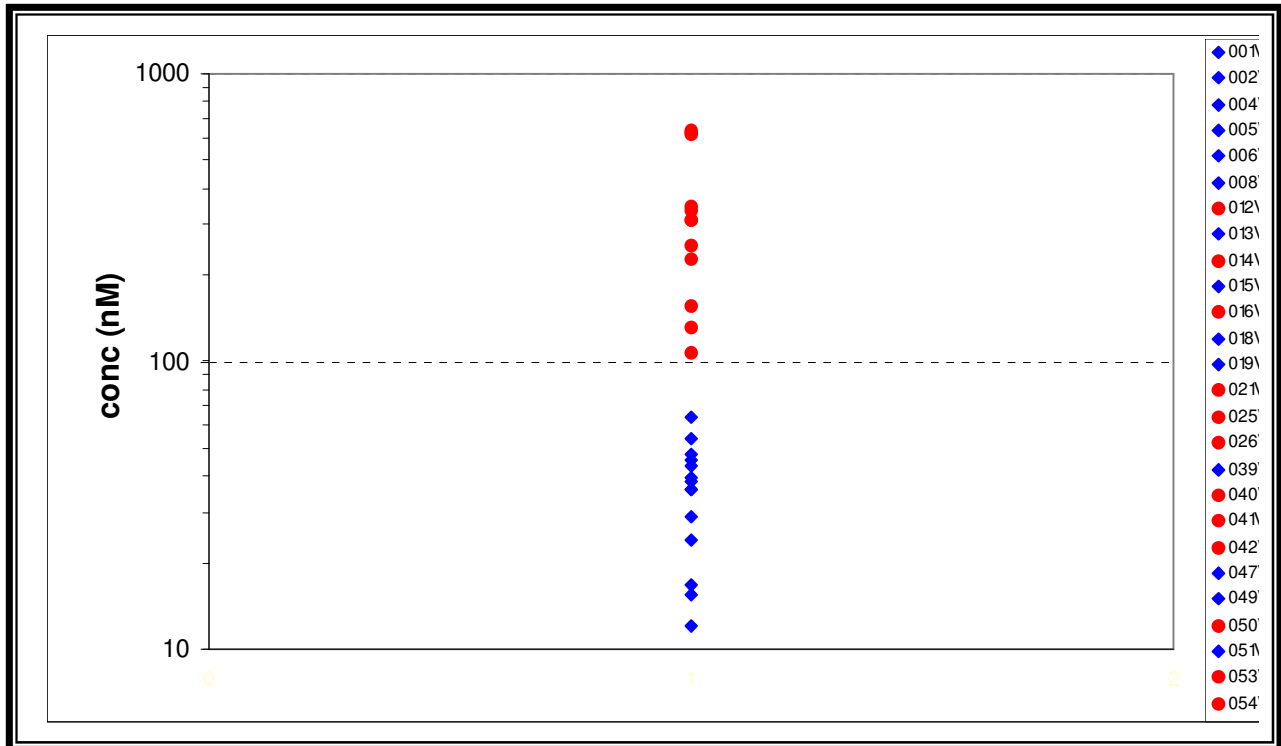


FIGURA 23 – DISTRIBUIÇÃO DAS IC₅₀ DE CLOROQUINA DE ISOLADOS DE *PLASMODIUM VIVAX* OBTIDOS DE PACIENTES DE TUCURUÍ, ESTADO DO PARÁ.

6. DISCUSSÃO

Nesse trabalho, demonstramos a viabilidade de execução de um teste simples para estudo de sensibilidade do *Plasmodium vivax in vitro* à cloroquina em condições de campo, com infraestrutura mínima. O *P. vivax* é a espécie plasmodial mais prevalente nas Américas e no Brasil, responsável por cerca de 3 em cada 4 casos de malária no País. A droga de escolha para tratamento de malária por *P. vivax* é a cloroquina, um esquizotocida sanguíneo, administrada em associação com primaquina, um esquizotocida tecidual, uma vez que esse parasito apresenta formas latentes (hipnozoítos) no fígado.

As avaliações *in vitro* de sensibilidade de *P. falciparum* a antimaláricos são rotineiras há muitos anos, e têm permitido monitorar o aparecimento e dispersão de isolados resistentes a várias drogas nos locais onde esses estudos são feitos. O fato de os estudos serem concentrados em *P. falciparum* é condicionado por três fatores principais: *i*) a morbi-letalidade da infecção por esse parasito; *ii*) a facilidade com que esse parasito desenvolve resistência a diferentes drogas; *iii*) o conhecimento das condições básicas necessárias para a condução de cultura de curto e mesmo de longo prazo para esse parasito.

No caso de *P. vivax*, o interesse por esse tipo de estudo sempre foi menor, pois esse parasito é menos letal, aparentemente não desenvolve com facilidade resistência aos antimaláricos e não cresce bem *in vitro*, mesmo em cultivos de curto prazo. Entretanto, essas condições estão mudando, o que tem justificado um interesse crescente por esse tipo de avaliação. A alta prevalência de *P. vivax* em muitas regiões do globo, inclusive no Brasil, e os relatos cada vez mais freqüentes de casos graves por malária vivax, aumentaram a preocupação em relação a esse parasito. Além disso, apesar de existirem poucos relatos de resistência de *P. vivax* à cloroquina, esse é um evento que preocupa as agências de controle de malária, em vista

da já extensa resistência de *P. falciparum* a essa droga e a existência de apenas um limitado arsenal terapêutico para malária. E, finalmente, até o presente momento não havia disponibilidade de um método de cultivo *in vitro* que permitisse tais avaliações. Com o desenvolvimento do método descrito nesse trabalho, as portas se abrem para que essas avaliações se tornem rotineiras.

De fato, todas as amostras apresentaram um aumento de parasitemia, mesmo que discreto, e/ou maturação de esquizontes após 48 horas de cultivo *in vitro*. Entretanto, existe uma dificuldade de se avaliar crescimento/maturação em cultivo de *P. vivax*. No caso de *P. falciparum*, que geralmente apresenta apenas formas em anel e trofozoítos jovens na circulação (trofozoítos maduros e esquizontes são seqüestrados nos vasos profundos), é fácil determinar se houve crescimento/maturação dos parasitos *in vitro*, pois a lâmina inicial apresenta-se apenas com formas jovens e a lâmina pós-cultivo (geralmente 30 horas no microteste e 42-48 horas em ensaios imunoenzimáticos) apresenta um grande percentual de formas maduras. No caso de *P. vivax*, a avaliação de maturação é dificultada, pois tanto a lâmina inicial quanto a pós-cultivo apresentam formas jovens e maduras, devido à característica intrínseca desse parasito de não promover o seqüestro de suas formas maduras nos vasos sanguíneos, havendo assim a presença de formas maduras na circulação periférica. Também pode haver dificuldade para avaliar crescimento do parasito, pois o rompimento de um ou outro esquizonte no início da cultura pode levar a um aumento de parasitemia sem necessariamente significar que o parasito de fato cresceu bem ao fim de 48 horas.

Mas o crescimento/maturação do parasito pode ser avaliado pela produção de pLDH, uma vez que somente parasitos viáveis e que se desenvolvam *in vitro* continuarão a produzir essa proteína. E nesse trabalho mostramos que, das 44 amostras colocadas em cultivo de curto prazo, 36 produziram níveis detectáveis de pLDH *in vitro*, mesmo em baixas parasitemias (como 0,08%) e, dessas 36 amostras, 26 apresentaram curvas interpretáveis para determinação de IC50

de cloroquina. O rendimento de 59,1% das culturas parece bastante razoável, em função de alguns aspectos. Em primeiro lugar, em trabalho semelhante realizado na África com cultivos de curto prazo de isolados frescos de *P. falciparum*, espécie que cresce bem *in vitro*, o sucesso das culturas foi de 82% (36 de 44 amostras) (MORENO *et al.*, 2001). E, em um trabalho piloto na Fundação de Medicina Tropical em Manaus, o rendimento das culturas de *P. vivax* foi de apenas 52% (14 de 27 amostras) (Leonardo Carvalho, comunicação pessoal). É necessário levar em consideração ainda as condições mínimas de infra-estrutura nas quais esse trabalho foi conduzido. Particularmente, o tempo relativamente longo (ate 8 horas) entre a coleta das amostras e a colocação dos parasitos em cultivo, agravado pelas altas temperaturas locais, podem ter sido fatores importantes no insucesso de algumas culturas. Tais condições são, entretanto, comuns nas localidades endêmicas brasileiras (essencialmente, a Amazônia) onde trabalhos desse tipo poderão ser realizados, e um rendimento de 59% das amostras nessas condições parece bastante razoável, comprovando a exequibilidade do método em áreas de infra-estrutura limitada. Além disso, é possível ainda melhorar alguns aspectos com relativa facilidade. Amostras que demorem a ser processadas, por exemplo, podem ser mantidas refrigeradas (por exemplo, em caixas de isopor com *gelo*), o que seguramente preserva melhor os parasitos até o momento do cultivo.

Os dados em si de sensibilidade dos isolados à cloroquina revelam uma situação preocupante, uma vez que 46,2% das amostras apresentaram IC50 acima do limiar de concentração de cloroquina de 100nM. Esse limiar, utilizado para separar isolados sensíveis de isolados resistentes, foi adotado em função do limiar estabelecido para *P. falciparum*. Isso porque já foi bem determinado (BRASSEUR *et al.*, 2001; DRUILLHE *et al.*, 2001) que amostras de pacientes que respondem bem ao tratamento com cloroquina apresentam valores de IC50 *in vitro* abaixo desse limiar, e amostras de pacientes que apresentam falha terapêutica tem valores IC50 *in vitro* acima do limiar.

Não existe ainda, para *P. vivax*, um limiar de sensibilidade/resistência bem determinado, uma vez que avaliações *in vitro* de sensibilidade não eram factíveis para essa espécie até recentemente, e nossos dados mostram que isso pode ser feito. Entretanto, na ausência de um valor determinado para *P. vivax*, utilizamos como referência o limiar já determinado para *P. falciparum*, de 100nM. De qualquer maneira, dos 12 isolados com IC50 acima de 100nM, 9 (75%) apresentaram IC50 acima de 200nM, sendo que 7 (58,3%) com IC50 acima de 300nM, o que mostra que, de fato, para grande parte das amostras testadas, foi necessária uma concentração elevada de cloroquina para matar o parasito. Esses dados são semelhantes aos obtidos no ensaio piloto em Manaus, no qual foi observado que 42% das amostras testadas apresentavam IC50 acima de 100nM de cloroquina. Se essa tendência se revelar verdadeira, esses dados podem estar testemunhando o surgimento de isolados resistentes de *P. vivax* a cloroquina em Tucuruí e também em Manaus e, provavelmente, em outras localidades da Amazônia brasileira.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) tem desestimulado o uso de limiares de concentração para definir o perfil de sensibilidade de isolados plasmodiais, uma vez que o único bem estabelecido é justamente o limiar de 100nM de cloroquina para isolados de *P. falciparum*. Limiares de concentração de outras drogas, como quinina, mefloquina e artemisinina, têm sido estabelecidos, mas carecem de ampla comprovação para serem validados, servindo apenas como referencial. A OMS tem assim estimulado, ao invés da determinação de valores absolutos em cortes transversais, a realização de estudos longitudinais, onde o perfil de sensibilidade de isolados de uma determinada área é avaliado periodicamente. Se a IC50 de grupos de isolados aumenta – não importando qual o valor absoluto – com o tempo em uma área determinada, isso poderá indicar a emergência de resistência naquela área. Assim, novos estudos nessa área de Tucuruí poderão ser conduzidos para verificar a evolução do perfil local de sensibilidade de *P. vivax* à cloroquina.

Os métodos *in vitro* não determinam, à priori, se um isolado é sensível ou resistente a uma determinada droga, uma vez que a eficácia de uma droga vai depender de vários fatores inerentes ao paciente, como aderência correta ao tratamento, absorção e biodisponibilidade da droga, existência de um certo grau de imunidade do hospedeiro, entre outros. Entretanto, eles podem fornecer informações valiosíssimas para as agências de controle de malária, indicando a potencial emergência de resistência a drogas antes que elas possam ser detectadas clinicamente. Podem ser ainda utilizados como método de triagem de novas drogas antimaláricas. No caso de *P. vivax*, o DELI-teste baseado na detecção de pLDH é atualmente o único método capaz de prover tais informações. Por esse motivo, esse trabalho vem contribuir para os esforços de controle da malária em nosso País.

5. CONCLUSÕES

- O anticorpo monoclonal 11D, por ser espécie-específico, é o melhor para ensaios *in vitro* que visem a detecção e mensuração da pLDH de *P. vivax*;
- A observação do limiar de IC50 acima de 100nM na maioria dos isolados estudados demonstra que o *Plasmodium vivax* parece estar desenvolvendo resistência à cloroquina, justificando o monitoramento continuado da sensibilidade desse parasito aos antimaláricos;
- Estudos associados de sensibilidade *in vivo* e *in vitro* são necessários para se estabelecer o limiar de concentração de cloroquina (e eventualmente de outras drogas) que diferencie isolados de *P. vivax* sensíveis de resistentes;
- O DELI-teste mostrou um bom desempenho em condições de campo, sendo assim recomendada sua utilização em estudos semelhantes em Tucuruí e em outras localidades da Amazônia Legal.

8. FERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALECRIM, M. G C.; ALECRIM, W.; MACÊDO, V. Plasmodium vivax resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 32(1): 67-68, 1999.

AMÉRICO, A. P. L; MARTINS, A. G.; GUZZO JÚNIOR, P. S. **A experiência do Pará com os programas de controle da incidência de malária** [Monografia de Especialização]. Belém (PA): Universidade Estadual do Pará; 2005. 67p.

BAIRD, J. K. *et al.* Survey of resistance to chloroquine of falciparum and vivax malaria in Palawan, the Philippines. **Transactions the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, 90: 413-414, 1996.

BAIRD, J. K. Chloroquine resistance in Plasmodium vivax. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 48(11): 4075-4083, 2004.

BASCO, L. K. *et al.* Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax: lactate dehydrogenase activity and its for in vitro drug susceptibility assay. **Experimental Parasitology**, 80: 260-271, 1995

BLOLAND, P. **Drug resistance in malaria**. World Health Organization. Department of communicable disease surveillance³ and response, 2001

BRASSEUR, P *et al.* Evaluation de la sensibilité in vitro de Plasmodium falciparum aux antimalariques par um test colorimetrique (DELI-microtest). **Médecine Tropicale**, 61(6): 545-547, 2001.

BROWN, W. M. *et al.* Comparative structural analysis and kinetic properties of lactate dehydrogenases from four species of human malarial parasites. **Biochemistry**, 43: 6219-6229, 2004

CHOTIVANICH, K. *et al.* Ex-vivo short-term culture and developmental assessment of *Plasmodium vivax*. **Transactions the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, 95: 677-680, 2001.

CHOTIVANICH, K. *et al.* In vitro efficacy of antimalarial drugs against *Plasmodium vivax* on the Western Border of Thailand. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, 70(4): 395-397, 2004

COUTO, A. A. *et al.* Evolução da resistência in vitro do *Plasmodium falciparum* às drogas antimaláricas em duas áreas da Amazônia Brasileira com distintas características sócio-econômicas e geográficas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 28(4): 357-365, 1995.

COUTO, A. A. **Caracterização de cepas de *Plasmodium falciparum* e monitorização longitudinal da resistência às drogas em duas áreas da Amazônia brasileira.** [Tese de doutorado]. Belém, Universidade Federal do Pará, 2001

DE SOUZA, J. M. A phase I clinical trial of mefloquine in Brazilian male subjects. **Bull. World Health Organization**, 61(5): 809-814, 1983a.

DE SOUZA, J. M. A phase II clinical trial of mefloquine in Brazilian male subjects. **Bull. World Health Organization**, 61(5): 815-820, 1983b

DE SOUZA, J. M. *et al.* An open, randomized, phase III clinical trial of mefloquine and of quinine plus sulfadoxine-pyramethamine in treatment of symptomatic *falciparum* malaria in Brazil. **Bull. World Health Organization**, 63(3): 603-609, 1985a.

DE SOUZA, J. M. *et al.* A phase I clinical trial of Fansimef (mefloquine plus sulfadoxine-pyramethamine) in Brazilian male subjects. **Bull. World Health Organization**, 63(3): 611-615, 1985b.

DE SOUZA, J. M. *et al.* Malária. In: Leão, R. N. Q. *et al.* **Doenças Infeciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico**. Belém: Cejup, 1997. p. 645-669.

DE SOUZA, J. M. *et al.* Malaria. In: **PRONAP**. Ciclo VII, número 4, Sociedade Brasileira de Pediatria, São Paulo, 2004. pág. 33.

DEJARDINS, R. E. *et al.* Quantitative Assessment of antimalarial activity in vitro by semiautomated microdilution technique. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 16(6) 1710-1719, 1979

DRUILHE, P. *et al.* A colorimetric in vitro drug sensitivity assay for Plasmodium falciparum based on a highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal Medicine and Hygiene**, 64(5): 233-241, 2001.

FAROOQ, U. & MAHAJAN, R. C. Drug resistance in malaria . **Journal Vectors Borne Disease**, 41: 45-53, 2004

FERREIRA, E. I. Antimaláricos. In: Silva, P. **Farmacologia**. 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 1163-1172.

FERREIRA, M. S. Malária. In: Veronesi, R.; Focaccia, R. **Tratado de Infectologia**. 2ª ed. Vol. 2. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 1280-1309.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual de terapêutica da malária**. Brasília: Funasa, 2001.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Sistema de informação de malária (SISMAL)**.

Arquivos da SESPA. Belém: Funasa, 2002.

GOLENDA, C. F.; LI, J.; ROSENBERG, R. Continuous in vitro propagation of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. **National Academy of Sciences**, 94: 6786-6791, 1997

GINSBURG, H. Should chloroquine be laid to rest? **Acta Tropica**, 96: 16-23, 2005

GOMEZ, M. S. *et al.* Substrate and cofactor specificity and selective inhibition of lactate dehydrogenase from the malarial parasite *P. falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 90: 235-246, 1997.

HASTINGS, I. M. The origins of antimalarial drug resistance. **Trends in Parasitology**, 20(11): 512-518, 2004

HAWLEY, S. R. *et al.* Relationship between antimalarial drug activity, accumulation and inhibition of heme polymerization in *Plasmodium falciparum* in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 42(3): 682-686, 1998.

HYDE, J. E. Mechanisms of resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs. **Microbes and Infection**, 4: 165-174, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Dados populacionais do município de Tucuruí, Estado do Pará**. [on line], disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/xtras/perfil.php?codmun=150810&r=2>. acesso em 08 de maio de 2006.

KIRK, K. SALIBA, K. J. Chloroquine resistance and the pH of the malaria parasite's digestive vacuole. **Drug Resistance Updates**, 4: 335-338, 2001.

KROGSTAD, D. J.; SCHLESINGER, P. H.; HERWALDT, B. Antimalarial Agents: mechanism of chloroquine resistance. **Antimalarial Agents and Chemoterapy**, 32(6): 799-801, 1988

LADISLAU, J. L. B. **Avaliação do Plano de Intensificação das Ações de Controle de Malária na Amazônia Legal no contexto da descentralização** [Dissertação de Mestrado]. Brasília. Escola Nacional de Saúde Pública, 2004.

LEAL, O. *et al.* Resposta clínico-parasitológica ao tratamento com quinino associado à doxiciclina em casos de malária falciparum não-complicada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36(6): 751-754, 2003.

MAKLER, M. T. *et al.* Parasite lactate desidrogenase as an assay for Plasmodium falciparum drug sensitivity. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, 48(6): 739-741, 1993.

MARQUEZ A.C. **Trajetória de um sanitarista** - 1ª edição. Brasília: OPAS, 1998.

MAY, J.; MEYER, C. G. Chemoreistance in falciparum malaria. **Trends in Parasitology**, 19(10): 435-436, 2003

MESHNICK, S. R.; DOBSON, M. J. **The history of antimalarial drugs**. In: Rosenthal, P.J., ed. Antimalarial chemotherapy: mechanisms of action, modes of resistance and new directions in drug development. Tolowa, NJ,: Humana Press, 2001: 15-25.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relatório executivo do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Série A, Normas e Manuais Técnicos**. Brasília - Ministério da Saúde: 2005a

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação epidemiológica da malária no Brasil. Brasília -** Ministério da Saúde: 2005b.

MOODY, A.. Rapid diagnostic tests for malaria parasit. **Clinical Microbiology Reviews**, 15(1): 66-78, 2002.

MORENO, A. *et al.* Use of the DELI-microtest to determine the drug sensitivity of Plasmodium falciparum in Bukina Faso. **Annals Tropical Medicine and Parasitology**, 95(3): 309-312, 2001a.

MORENO, A. *et al.* Evaluation under conditions of the colourimetric DELI-microtest for the assessment of Plasmodium falciparum drug resistance. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 95: 100-103, 2001b.

NOEDL, H. **Drug resistance in malaria.** Ano de 2002. Disponível em <<http://homepage.univie.ac.at/harald.noedl/malaria/drugresmal.html>>. Acesso em: 25 mar. 2005.

NOEDL, H.; WONGSRICHANALAI, C.; WERNSDORFER, W. Malaria drug-sensitivity testing: new assays, new perspectives. **Trends in Parasitology**, 19(4): 175-181, 2003.

NOMURA, T. *et al.* Evidence for different mechanisms of chloroquine resistance in 2 Plasmodium species that cause human malaria. **The Journal of Infections Disease**, 183: 1653-1661, 2001

OLLIARO, P. Drug resistance ampres our capacity to Roll Back Malaria. **Clinical Infectious disease**, 41: 247-257, 2005

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. **Informe de la situación de los programas regionales de malaria en las américas.** Washington D.C.: OPS, 2001.11p.

PIPER, R. *et al.* Immunocapture diagnostic assays for malaria using Plasmodium lactate dehydrogenase (pLDH). **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, 60(1), 109-118, 1999.

PRADINES, B. *et al.* In vitro activities of benflumetol against 158 Senegalese isolates of Plasmodium falciparum in comparison with those of standard antimalarial drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 43: 418-420, 1999.

REYES, S; OSANAI, C. H; PASSOS, A. D. Resistência in vivo do Plasmodium falciparum às 4-aminoquinolinas e a associação sulfadoxina + pirimetamina II. Estudos em Manaus, Amazonas 1983-1984. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, 38: 37-44, 1986.

RIECKMANN, K. H. *et al.* Drug sensitivity of Plasmodium falciparum. An in-vitro microtechnique. **The Lancet**, 1: 22-23, 1978.

RIECKMANN, K. H.; DAVIS, D. R.; HUTTON, D. C. Plasmodium vivax resistance to chloroquine?. **The Lancet**, 334(8673), 1183-1184, 1989.

RIDLEY, R. G. Malaria: dissecting chloroquine resistance. **Current Biology**, 8: R346-R349, 1998.

RUSSELL, B. M. *et al.* Simple in vitro assay for determining the sensitivity of Plasmodium vivax isolates from fresh human blood to antimalarials in areas where P. vivax is endemic. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 47(1): 170-173, 2003.

SÁ, J. M. *et al.* 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**, 109: 256-259, 2005

SANCHEZ, M. C. A. Testes sorológicos. In: Ferreira, A. W.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico Laboratorial: avaliação das principais doenças infecciosas e parasitárias e auto-imunes**. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 263-272.

SCHLESINGER, P. H.; KROGSTAD, D. J.; HERWALDT, B. L. Antimalarial agents: mechanisms of action. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 32(6): 793-798, 1988

SINGER, B. H.; CASTRO, M. C. Agrucultural colonization and malaria on the Amazon Frontier. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 954: 184-222, 2001

SISTEMA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Sistema de Vigilância Epidemiológica em malária (SIVEP-MALÁRIA): relatório de resumo epidemiológico**. SESP. Belém: 2005

SUH, K. N.; KAIN, K. C.; KEYSTONE, J. S. Malaria. **CAMS**. 170(11): 1693-1702, 2004.

TALISUNA, A. O.; BLOLAND, P.; D'ALESSANDRO, U. History, dynamics and public health importance of malaria parasite resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, 17(1): 235-254, 2004.

TOSTA, C. E.; LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E. Malária. In: **Bogliolo**, I. Brasileiro Filho, G. Patologia. 6a ed.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 1250-1262.

TRACY, J.; WEBSTER JUNIOR, L. T. Fármacos Usados na Quimioterapia das Infecções por Protozoários: Malária. In: Goodman, L. S.; Gilman, A. Goodman&Gilman: **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 803-822.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, 193(4254): 673-675, 1976.

TRAPE, J. F. The public health impact of chloroquine resistance in Africa. **American Journal Medicine and Hygiene**, 64(1,2)S: 12-17, 2001.

VIANA, G. M. R. **Caracterização molecular dos genes do Plasmodium falciparum associados à resistência da cloroquina em amostras da região amazônica brasileira.** [Dissertação de mestrado]. Belém, Universidade federal do Pará, 2002.

WELLEMS, T. E.; PLOWE, C. Chloroquine-resistance. **The Journal of Infections Disease**, 184: 770-776, 2001.

WERNSDORFER W. H. Epidemiology of drug resistance in malaria. **Acta Tropica**, 56: 143-156, 1994

WHITE, N. J. Antimalarial drug resistance and combination chemotherapy. **The Royal Society**, 345: 739-749, 1999

WHITE, N. J. Antimalarial drug resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, 113(8): 1084-1092, 2004

WHITBY, M. *et al*, Chloroquine-resistant Plasmodium vivax. **The Lancet**, ii: 1935, 1989.

WONGRISCHANALAI, C. *et al*. In vitro susceptibility of Plasmodium falciparum isolates from Myanmar to antimalarial drugs. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, 65(5): 450-455, 2001

WONGRISCHANALAI, C. *et al*. Epidemiology of drug-resistant malaria. **The Lancet**, 2: 209-218, 2002

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Malaria. Fact Sheet 94**, [online] Washington: WHO; 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/inf-fs/en/fact094.html>> Acesso em 05 de jan. de 2005.

ANEXOS

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - MALÁRIA

Instituições : Fundação Oswaldo Cruz, RJ ; Instituto Evandro Chagas, PA ; Fundação Instituto de Medicina Tropical do Amazonas, AM.

Título do Projeto de Pesquisa para a População : Estudo da resistência do parasita da malária ao tratamento no Brasil.

Título Oficial do Projeto Pesquisa : Implantação de um teste colorimétrico (DELI-test) para avaliação da quimio-resistência dos plasmódios aos antimaláricos em áreas endêmicas brasileiras.

Investigador Principal : Dr. Cláudio Tadeu Daniel Ribeiro.

Colaboradores : Dra. Maria de Fátima Ferreira da Cruz, Dra. Dalma Maria Banic, Dr. Leonardo José de Moura Carvalho, Dr. José Maria de Souza, Dra Edna Ishikawa, Dra Ana Paula Laredo Américo, Dra. Maria da Graças Costa Alecrim, Dr. Wilson Alecrim, Dra Yonne Chehuan, Dr. Philippe Brasseur, Dra Nubia Meneses, Dra Ana Valéria Amorim, Dra Márcia Ferro.

Endereço : Laboratório de Pesquisas em Malária - Departamento de Imunologia - IOC/Fiocruz. Avenida Brasil 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - CEP 21.045-900.

Telefax : (21) 3865-8145

EU, _____

fui informado de que esse estudo é para obter mais conhecimento sobre minha doença, que se chama malária. A minha participação será apenas para doar sangue antes e/ou durante o meu tratamento. O tratamento será igual ao normalmente usado para casos desse tipo. Os resultados desse estudo não me beneficiarão diretamente, mas poderão, no futuro, beneficiar outras pessoas com malária.

O procedimento será o seguinte: um volume de 5 ml de sangue será coletado em tubo vacutainer através da punção da veia do antebraço, podendo, em algum outro momento da pesquisa, eu ser solicitado para uma nova coleta de sangue. A retirada do meu sangue poderá ser feita por um médico, farmacêutico ou biólogo da equipe de investigadores. Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor local e/ou hematoma (“rouxidão”) no local da punção, com duração de 3 a 4 dias. Todos os cuidados apropriados serão tomados, como o uso de seringa, agulha e gaze descartável assim como álcool para assepsia local, entre outros. Quanto aos procedimentos de coleta não foram identificados riscos até o momento. Todo o material coletado e estocado (sangue parasitado, soro e plasma) assim como dados pessoais e epidemiológicos serão utilizados neste projeto, podendo vir a serem utilizados também em pesquisas futuras, desde que o projeto seja aprovado por Comitê de Ética, porém sempre resguardando a minha privacidade. As amostras biológicas e os dados do questionário ficarão sob a responsabilidade do Laboratório de Pesquisas em Malária do

Departamento de Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ. Os resultados desse e de estudos futuros serão relatados à minha pessoa e considerados confidenciais, podendo ser divulgados na forma de comunicação científica. Entretanto, não será permitida a minha identificação, o que garante a minha privacidade.

O pesquisador responsável colocou-me a par dessas informações estando à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver novas dúvidas. Também tenho toda a liberdade para contatar os demais pesquisadores envolvidos nesse estudo.

Minha participação nesse estudo é inteiramente voluntária e sou livre para recusar a participar do estudo ou me retirar em qualquer fase da pesquisa sem que isto possa afetar ou prejudicar o cuidado médico a que devo receber. Estou ciente que será aplicado um questionário para obter informações de dados pessoais e epidemiológicos.

Recebi uma cópia desse termo de consentimento, e pela presente consinto voluntariamente em participar no estudo, permitindo que os procedimentos descritos acima sejam realizados em minha pessoa.

Assinatura : _____ RG : _____

Testemunha : _____ RG : _____

Pesquisador : _____ Data _____

ANEXO II

REGISTRO N°

Data :

PROJETO : Implantação de um teste colorimétrico (DELI-test) para avaliação da quimio-resistência dos plasmódios aos antimaláricos em áreas endêmicas.

DADOS PESSOAIS

NOME :	SEXO : F M
IDADE :	NATURALIDADE :
ÚLTIMA PROCEDÊNCIA :	
ENDEREÇO ATUAL :	
NÚMERO DE RESIDENTES NO ENDEREÇO ATUAL :	
PROFISSÃO :	ONDE TRABALHA :
TEMPO :	QUANTO
TEM CASO DE MALÁRIA?	SIM NÃO
TEMPO DE RESIDÊNCIA NO ENDEREÇO ATUAL (ANOS) :	
TEMPO DE RESIDÊNCIA EM ÁREA ENDÊMICA (ANOS) :	

HISTÓRIA PREGRESSA DE MALÁRIA

INFECCÕES ANTERIORES DE MALÁRIA :	SIM	NÃO	QUANTAS? :
1 2-5 6-9 MAIS DE 9			
QUANTAS COMPROVADAS POR EXAME PARASITOLÓGICO :			
Espécies : <i>P. falciparum</i> <i>P. vivax</i> <i>P. malariae</i> Nenhuma Não lembra			
NÚMERO DE MALÁRIAS NO ANO 2005 :			
Espécies : <i>P. falciparum</i> <i>P. vivax</i> <i>P. malariae</i> Nenhuma Não lembra			
DATA DA ÚLTIMA INFECCÃO :			
Espécies : <i>P. falciparum</i> <i>P. vivax</i> <i>P. malariae</i> Não lembra			
LOCAL PROVÁVEL DE INFECCÃO :			
FEZ O TRATAMENTO COMPLETO? :	Sim Não	Qual?	
ESTÁ EM TRATAMENTO?	Sim Não	Qual?	
QUANDO TERMINOU DE TOMAR O MEDICAMENTO?	/ /		
JA FOI HOSPITALIZADO COM MALÁRIA :	Sim Não	Data :	
MALÁRIA GRAVE NA FAMÍLIA :	Sim Não	Data :	OBS :
RECENTEMENTE TEM OU TEVE ALGUÉM NA FAMÍLIA COM MALÁRIA?	Sim Não		
Data :			

EXPOSIÇÃO À INFECCÃO MALÁRICA

LOCALIZAÇÃO DA CASA				
Cidade	Periferia	Floresta	Coleção d'água	Nenhuma
TIPO DE CASA (PROTEÇÃO EM RELAÇÃO AO CONTATO COM MOSQUITO)				
Boa	Parcial	Nenhuma		
ATIVIDADES AO AMANHECER :				
ATIVIDADES AO ANOITECER :				
SABE COMO A MALÁRIA É TRANSMITIDA?				
Sim	Não	Foi informado	Foi informado, mas não acredita	
COMO? :				
USO DE MEDIDAS PROFILÁTICAS				
Mosquiteiro	Inseticida	antimaláricos	Outras	Nenhuma
Data da última borrifação de inseticida (FUNASA) :				

MALÁRIA ATUAL

SINTOMAS					
Febre	Cefaléia	Calafrios	Náusea/Vômito	Mialgia	Dor abdominal
Sudorese					
Artralgias	Diarréia	Dispnéia	Nenhum		
DATA DO INICIO DOS SINTOMAS :					
DIAGNÓSTICO :					
	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>		
PARASITEMIA :					
LOCAL PROVÁVEL DE INFECCÃO :					
RECEBEU TRANSFUSÃO DE SANGUE? :					
	Sim	Não	Data :		
É DOADOR DE SANGUE? :					
	Sim	Não	Data da última doação :		

COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Gota espessa	Distensão sangüínea	Plasma	Células	Parasitas
OBS :				