

**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**ISABEL DINIS FERREIRA**

**AVALIAR A EVOLUÇÃO DA SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* AO ARTESUNATO E  
ARTEMETER E DO PERFIL GENOTÍPICO DE POTENCIAIS MARCADORES  
GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *PLASMODIUM*  
*FALCIPARUM* DO NORTE DO BRASIL**

**PROJETO DE INVESTIGAÇÃO**

**ÁREA CIENTÍFICA DE DOENÇAS INFECCIOSAS**

**Realizado sob orientação do Professor Doutor José Gabriel Saraiva da Cunha**

**Elaborado de acordo com as normas de candidatura a Projetos de Investigação Científica e Desenvolvimento Tecnológico da Fundação para a Ciência e Tecnologia de 2012.**

**SETEMBRO / 2012**

**Avaliar a evolução da suscetibilidade *in vitro* ao artesunato e artemeter e do perfil genotípico de potenciais marcadores genéticos de resistência em populações naturais de *Plasmodium falciparum* do Norte do Brasil**

Isabel Dinis Ferreira<sup>1</sup> & José Gabriel Saraiva da Cunha<sup>1,2</sup>

1. Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

2. Serviço de doenças infecciosas dos Hospitais da Universidade de Coimbra - Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal

Endereço de correio eletrónico:

Isabel Dinis Ferreira: [ferreiraid@gmail.com](mailto:ferreiraid@gmail.com)

Professor Doutor José Gabriel Saraiva da Cunha: [saraiva@huc.min-saude.pt](mailto:saraiva@huc.min-saude.pt)

---

**ÍNDICE**


---

<b>Índice.....</b>	<b>3</b>
<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Identificação do projeto.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Instituições envolvidas.....</b>	<b>6</b>
<b>3. Componente científica.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1.a Sumário em Português.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1.b Sumário em Inglês.....</b>	<b>9</b>
<b>3.2. Descrição técnica.....</b>	<b>12</b>
<b>3.2.1. Revisão da literatura.....</b>	<b>12</b>
<b>3.2.2. Plano e Métodos.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2.3. Tarefas.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2.4. Calendarização e Gestão do Projeto.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.4.a Descrição da Estrutura de Gestão.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.4.b Lista de <i>Milestones</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.4.c Cronograma.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>29</b>
<b>3.4. Publicações anteriores.....</b>	<b>35</b>
<b>3.5. Resubmissão de projetos.....</b>	<b>36</b>
<b>4. Equipa de investigação.....</b>	<b>36</b>
<b>5. Outros Projetos.....</b>	<b>36</b>
<b>6. Indicadores previstos.....</b>	<b>37</b>
<b>7. Orçamento.....</b>	<b>38</b>
<b>8. Justificação do orçamento.....</b>	<b>39</b>
<b>9. Anexos.....</b>	<b>42</b>
<b>10. Conflito de interesse.....</b>	<b>42</b>
<b>Anexo 1 – Cronograma.....</b>	<b>43</b>
<b>Anexo 2 – Normas de candidatura à FCT e formulário.....</b>	<b>44</b>

---

**LISTA DE ABERVIATURAS**

---

**ACT** - Combinação terapêutica com derivados da artemisinina

**ARM** - Artemeter

**ARS** - Artesunato

**CHUC** - Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**EDTA** - Ácido etileno diamino tetra acético

**FCT** - Fundação para a Ciência e a Tecnologia

**FMUC** - Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

**HUC** - Hospitais da Universidade de Coimbra

**IC50** - Concentração que inibe o crescimento de 50% dos parasitas

**µl** - Microlitro

**µm** - Micrómetro

**mg** - Miligrama

**ml** - Mililitro

**nM** - Nanomolar

**O.M.S.** - Organização Mundial de Saúde

**P** - Valor da significância estatística

**PCR** - Reação de polimerização em cadeia (*Polymerase Chain Reaction*)

**PfATPase6** - Proteína *Plasmodium falciparum calcium-transporting ATPase*

*pfATPase6* - *Plasmodium falciparum calcium-transporting ATPase gene*

*pfcr1* - *Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter gene*

*pfmdr1* - *Plasmodium falciparum multidrug resistance 1 gene*

**RFLP** - *Restriction fragment length polymorphism*

**SERCA** - Enzima retículo sarco/endoplasmático Ca<sup>2+</sup> ATPase

## 1. IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO

---

**Domínio científico:** Ciências da Vida e da Saúde

**Área científica principal:** Imunologia e infecção - Microbiologia e Infecção

**Área científica secundária:** Ciências Biológicas - Biologia Microbiana

**Acrônimo:** ARS/ARM/FMUC

**Título do projeto (em português):** Avaliar a evolução da suscetibilidade *in vitro* ao artesunato e artemeter e do perfil genotípico de potenciais marcadores genéticos de resistência em populações naturais de *Plasmodium falciparum* do Norte do Brasil.

**Título do projeto (em inglês):** To assess the evolution of *in vitro* susceptibility to artesunate and artemether and genotypic profile of potential genetic markers of resistance in natural populations of *Plasmodium falciparum* from Northern Brazil.

**Financiamento solicitado:** 76.139,41 €

**Palavra-chave 1:** *Plasmodium falciparum* (*Plasmodium falciparum*)

**Palavra-chave 2:** Suscetibilidade *in vitro* (*in vitro* susceptibility)

**Palavra-chave 3:** Derivados da artemisinina (artemisinin derivatives)

**Palavra-chave 4:** Marcadores genéticos de resistência (molecular markers of resistance)

**Data de início do projeto:** 01-01-2013

**Duração do projeto em meses:** 12 meses

## 2. INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

---

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Azinhaga de Santa Comba, Celas

3000-548 Coimbra

**Unidade de Investigação:** Serviço de Doenças Infecciosas dos HUC-CHUC

Praceta Prof. Mota Pinto

3000-075 Coimbra

**Instituição de Acolhimento:** Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Azinhaga de Santa Comba, Celas

3000-548 Coimbra

---

### 3. COMPONENTE CIENTÍFICA

---

#### 3.1. SUMÁRIO

---

##### 3.1.a Português

A malária continua a ser uma das maiores ameaças para a saúde pública e desenvolvimento económico das regiões tropicais e subtropicais do mundo. Em 2010, causou 216 milhões de casos de doença e aproximadamente 655 000 mortes [1]. No Brasil cerca de 20% da população vive em zonas de risco de transmissão, sendo o Estado do Pará onde ocorre o maior número de casos [2].

Uma das medidas de controlo da doença é o recurso a antimaláricos. No entanto, a resistência do *Plasmodium falciparum* à maioria dos antimaláricos em uso tornou-se num dos maiores obstáculos ao controlo eficaz da doença. Para contornar o problema da resistência aos antimaláricos a Organização Mundial de Saúde (O.M.S.) recomenda desde 2006 a combinação terapêutica com derivados da artemisinina (ACTs) como tratamento de primeira linha na malária não complicada por *Plasmodium falciparum*, sendo actualmente utilizada em 84 dos 106 países e territórios endémicos [1]. No Brasil essa recomendação foi implementada em 2007, sendo usadas as combinações Artemeter/Lumefantrina e Artesunato/Mefloquina [2].

Apesar de todos os esforços, a resistência aos ACTs já foi demonstrada no Camboja [3,4,5], local onde surgiu também a resistência à cloroquina nos anos 50 e posteriormente à sulfadoxina-pirimetamina e à mefloquina [6], existindo também indícios da sua emergência em Myanmar, Tailândia e Vietname. Caso a resistência aos ACTs se alastre para outras áreas geográficas, como aconteceu com outros antimaláricos, as consequências serão catastróficas, uma vez que não haverá alternativas terapêuticas eficazes disponíveis nos próximos anos. Este facto faz com que a

prevenção da disseminação da resistência e o controle do seu aparecimento em novas áreas sejam fundamentais no combate eficaz da doença. A monitorização da resistência tem como finalidade a identificação precoce da resistência permitindo uma atuação atempada e eficaz, podendo ser realizada através da avaliação da suscetibilidade *in vitro* de populações naturais de *P. falciparum* e pelo estudo de marcadores moleculares de resistência [7]. Apesar do mecanismo de resistência à artemisinina não estar esclarecido, os genes *pfprt*, *pfmdr1* e *pfATPase6* têm sido investigados no contexto da modulação da suscetibilidade à artemisinina e seus derivados, existindo indícios do seu envolvimento por amplificação génica e mutações na sequência dos genes [8,9,10]. Estes dados levam a que sejam utilizados como potenciais marcadores moleculares de resistência [2,11,12].

Este projeto pretende realizar uma monitorização da resistência aos ACTs no Norte do Brasil, avaliando a evolução da suscetibilidade *in vitro* ao artesunato e artemeter e do perfil genotípico de potenciais marcadores genéticos de resistência, (genes *pfprt*, *pfmdr1* e *pfATPase6*), seis anos após a introdução dos ACTs como tratamento de primeira linha na malária não complicada por *P. falciparum*, tendo como referência de suscetibilidade *in vitro* basal e perfil genotípico um trabalho realizado por Ferreira *et al* em 2005 [11], antes da introdução oficial destas combinações terapêuticas. Desta forma pretende-se verificar se a introdução em larga escala dos ACTs alterou a suscetibilidade *in vitro* e perfil genotípico do *P. falciparum* nessa região.

Os objetivos deste projeto são:

1-Avaliar a suscetibilidade *in vitro* ao artesunato e artemeter em isolados de *Plasmodium falciparum* do Estado do Pará, Brasil.

2- Pesquisar polimorfismos genéticos nos genes *pfprt*, *pfmdr1* e *pfATPase6* por PCR-RFLP, em todos os isolados.



3-Pesquisar o número de cópias do gene *pfmdr1* por PCR em Tempo Real nos isolados com menor suscetibilidade *in vitro* ao artesunato e artemeter.

4-Avaliar a correlação dos polimorfismos genéticos dos genes *pfprt*, *pfmdr1* e *pfATPase6* com os valores da suscetibilidade *in vitro* ao artesunato e artemeter.

5-Avaliar a evolução da suscetibilidade *in vitro* ao artesunato e artemeter, comparando com os valores da suscetibilidade *in vitro* de 2005 [11].

6-Avaliar a evolução do perfil genotípico, polimorfismos genéticos nos genes *pfprt*, *pfmdr1* e *pfATPase6* e número de cópias do gene *pfmdr1*, utilizando como referência os resultados dum trabalho realizado em 2005 por Ferreira *et al* [11].

Os resultados deste projeto irão contribuir para um melhor controlo da malária, nomeadamente no contexto da resistência, indo ao encontro dos objetivos da O.M.S. na luta contra a resistência aos ACTs.

### **3.1.b Inglês**

Malaria remains a major threat to public health and economic development of tropical and subtropical regions of the world. There were 216 million cases of malaria and nearly 655,000 deaths in 2010 [1]. In Brazil, about 20% of the population lives in areas at risk of transmission, and the Pará State count the largest number of cases [2].

One of the measures of disease control is the use of antimalarials. However, resistance of *Plasmodium falciparum* to most antimalarials in use has become a major problem to effective disease control. To circumvent the problem of antimalarial drugs resistance the World Health Organization recommends since 2006 the artemisinin-based combination therapy (ACTs) as first-line treatment for uncomplicated malaria caused by

*Plasmodium falciparum*, it is currently used in 84 of 106 countries and endemic areas [1]. In Brazil this recommendation was implemented in 2007, the combinations used are Artemether / Lumefantrine and Artesunate / Mefloquine [2].

Despite all efforts, ACTs resistance emerged in Cambodia [3,4,5], where it also emerged chloroquine resistance in the 50s and after sulfadoxine-pyrimethamine resistance and mefloquine resistance [6]. There is also evidence of its emergence in Myanmar, Thailand and Vietnam. If ACTs resistance spreads to other geographic areas, as happened with other antimalarial drugs, the consequences will be catastrophic, since there are no effective treatment options available in the coming years. This fact makes the prevention of resistance spread and control of its emergence in new areas critical in effective fight against the disease. Monitoring the resistance aims an early identification of resistance allowing a timely and effective action; it can be performed by evaluating the *in vitro* susceptibility of natural populations of *P. falciparum* and the use of molecular markers of resistance [7]. Although the mechanism of resistance to artemisinins is not understood, *pfprt*, *pfmdr1* and *pfATPase6* genes have been investigated in the context of modulation of artemisinins susceptibility, there is evidence of their involvement by gene amplification and mutations in the gene sequence [8,9,10], reason why they have been used as potential markers of resistance [2,11,12].

This project intends to monitor ACTs resistance in Northern Brazil, assessing the evolution of the *in vitro* susceptibility to artesunate and artemether and genotypic profile of potential genetic markers of resistance (*pfprt*, *pfmdr1* and *pfATPase6* genes), six years after ACTs introduction as first-line treatment for uncomplicated malaria caused by *Plasmodium falciparum*, using as reference baseline *in vitro* susceptibility and genotypic profile a study made by Ferreira *et al* in 2005 [11], before the official introduction of these combination therapies. Therefore we intend to check if the large-

scale introduction of ACTs changed *in vitro* susceptibility and genotypic profile of *P. falciparum* in this region.

The goals of this project are:

1-To evaluate the *in vitro* susceptibility to artesunate and artemether in *Plasmodium falciparum* isolates from Pará State, Brazil.

2 - Search for genetic polymorphisms in *pfprt*, *pfmdr1* and *pfATPase6* genes using PCR-RFLP in all isolates.

3-To evaluate *pfmdr1* gene copy number using real time PCR in the isolates with lower *in vitro* susceptibility to artesunate and artemether.

4-To evaluate the correlation between the genetic polymorphisms of *pfprt*, *pfmdr1* and *pfATPase6* genes and the values of *in vitro* susceptibility to artesunate and artemether.

5-To evaluate the progress of *in vitro* susceptibility to artesunate and artemether, compared with the values of *in vitro* susceptibility from 2005 [11].

6-To evaluate the genotypic profile, genetic polymorphisms in *pfprt*, *pfmdr1* and *pfATPase6* genes and copy number of the *pfmdr1* gene, using as reference the results of a study conducted in 2005 by Ferreira *et al* [11].

The results of this project will contribute for a better control of malaria, mainly in the context of resistance, meeting the objectives of the World Health Organization in the fight against ACTs resistance.

## 3.2. DESCRIÇÃO TÉCNICA

---

### 3.2.1. Revisão da literatura

A taxa de mortalidade devido a malária diminuiu mais de 25% desde 2000 em todo o mundo [1], parte desse sucesso deve-se à implementação da recomendação pela O.M.S. das combinações terapêuticas com derivados da artemisinina (ACTs) como tratamento de primeira linha na malária não complicada por *Plasmodium falciparum*. Atualmente é o tratamento mais eficaz na luta contra a malária, no entanto essa eficácia foi assombrada com o aparecimento de resistência no Camboja [3,4,5]. A importância deste facto levou a O.M.S. a desenvolver um plano, *Global plan for artemisinin resistance containment*, com o objetivo geral de proteger os ACTs como tratamento altamente eficaz no tratamento da malária por *P. falciparum*. De forma a atingir esse objetivo delinearão várias recomendações, sendo uma delas o maior investimento na investigação relacionada com a resistência à artemisinina [13].

O mecanismo de resistência à artemisinina e derivados não é conhecido. No entanto, os genes *pfcr1* (*Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter gene), *pfmdr1* (*Plasmodium falciparum* Multidrug Resistance 1 gene) e *pfATPase6* (*Plasmodium falciparum* calcium-transporting ATPase gene) têm sido investigados no contexto da modulação da suscetibilidade à artemisinina e seus derivados, com a finalidade de identificar um marcador molecular de resistência para estes fármacos.

O gene *pfcr1* codifica a Proteína *Plasmodium falciparum* Chloroquine resistance transporter, uma proteína integral da membrana, que pertence à superfamília dos transportadores de drogas/metabolitos. Vários estudos demonstraram que este gene desempenha um papel importante na resistência do *P. falciparum* à cloroquina, nomeadamente a mutação *pfcr1* K76T [8]. No contexto da modulação da suscetibilidade

à artemisinina e seus derivados estudos de transfeção genética demonstraram que determinadas mutações no gene *pfert* aumentam a suscetibilidade a esta classe de antimaláricos [8]. Um estudo recente mostrou associação entre o polimorfismo *pfert* K76T e a diminuição da suscetibilidade ao artemeter em populações naturais de *P. falciparum* [14].

O gene *pfmdr1* codifica uma proteína transportadora, a *P-glicoprotein homologue 1*, localizada na membrana do vacúolo digestivo do parasita. Este gene tem sido relacionado com a resistência a vários antimaláricos, como cloroquina, amodiaquina, mefloquina e artemisinina e seus derivados, podendo modular a suscetibilidade aos diversos antimaláricos por dois mecanismos: amplificação génica e/ou mutações na sequência do gene [15]. No caso da artemisinina e seus derivados, parece existir uma forte associação entre amplificação do gene *pfmdr1*, a ausência de mutações no gene e a diminuição da suscetibilidade aos derivados da artemisinina em populações naturais de *P. falciparum*, dados suportados por estudos genéticos [15]. Estudos realizados em populações naturais de *P. falciparum* verificaram uma correlação entre a diminuição da suscetibilidade *in vitro* à artemisinina e artesunato e o aumento no número de cópias do gene *pfmdr1* [16, 17, 18, 19]. Um estudo revelou que a disrupção genética (*knock-out*) do nº de cópias de 2 para 1 do gene *pfmdr1*, na estirpe resistente à mefloquina FCB, resultou num aumento da suscetibilidade à artemisinina *in vitro*, reforçando a ideia que o número de cópias deste gene possui capacidade de modular este fenótipo [20]. Adicionalmente, mutações pontuais no gene *pfmdr1* têm sido associadas a mudanças de suscetibilidade dos parasitas da malária à artemisinina e derivados [14, 18, 21, 22].

O gene *pfATPase6* codifica uma ATPaseCa<sup>2+</sup> tipo SERCA do *Plasmodium* que foi proposto como um principal alvo terapêutico dos derivados da artemisinina [23]. A teoria mais consistente sobre o mecanismo que pode modular a suscetibilidade da

artemisinina sugere que a resistência depende de alterações na ATPaseCa<sup>2+</sup> do tipo SERCA do *Plasmodium falciparum* [10, 24]. Uhlemann *et al.* demonstraram que alterações em aminoácidos da proteína PfATPase6 (Proteína *Plasmodium falciparum* calcium-transporting ATPase) modulam a suscetibilidade *in vitro* à artemisinina num sistema heterólogo, tendo verificado que a ação inibitória da artemisinina na atividade da PfATPase6 em oocistos de *Xenopus laevis* é influenciada por mutagênese dirigida (L263E) [24]. Adicionalmente, foi identificada uma mutação, S769N, no gene *pfATPase6* em 6 de 7 isolados da Guiana Francesa, com reduzida suscetibilidade *in vitro* ao artemeter: esses isolados apresentavam uma média de valores de IC50 20 vezes superior ao valor máximo apresentado pelos outros isolados estudados [10]. No entanto, um estudo experimental com linhas de *P. falciparum* transgênicas, revelou falta de associação entre a mutação S769N e a resistência à artemisinina e derivados [25]; talvez essa mutação só tenha significado em populações naturais. Na sequência do trabalho de Jambou *et al.*, foram realizados vários estudos com populações naturais do Norte do Brasil, região geograficamente próxima da Guiana Francesa, antes da introdução em larga escala dos ACTs nessa região, onde foram identificados vários polimorfismos [2, 11, 26, 27, 28].

Este projeto de investigação será inovador ao realizar um estudo dos potenciais marcadores moleculares de resistência à artemisinina e derivados após a introdução em larga escala dos ACTs, permitindo realizar estudos comparativos com trabalhos anteriores para avaliar se a introdução dos ACTs selecionou polimorfismos alterando a prevalência anteriormente encontrada. Adicionalmente pretende avaliar a suscetibilidade *in vitro* ao artesunato e artemeter atual, bem como a sua evolução.

### **3.2.2. Plano e Métodos**

Neste projeto pretende-se avaliar a evolução da suscetibilidade *in vitro* ao artesunato e artemeter e do perfil genotípico de potenciais marcadores genéticos de resistência (genes *pfcr1*, *pfmdr1* e *pfATPase6*) no Estado do Pará Brasil, seis anos após a introdução dos ACTs como tratamento de primeira linha na malária não complicada por *P. falciparum*, tendo como referência de suscetibilidade *in vitro* basal e perfil genotípico um trabalho realizado antes da introdução destas combinações terapêuticas, verificando se a introdução em larga escala dos ACTs alterou a suscetibilidade *in vitro* e perfil genotípico do *P. falciparum* nessa região.

O trabalho desenvolvido neste projeto será realizado em três fases ocorrendo em dois locais distintos, uma primeira fase que contempla a seleção, colheita dos isolados e realização dos testes de avaliação da suscetibilidade *in vitro* (microteste da O.M.S.) decorrerá no Estado do Pará no Brasil, mais especificamente em Tucuruí, e a segunda e terceira fases que incluem a fenotipagem relativamente à suscetibilidade *in vitro* ao artesunato e artemeter, genotipagem e análise estatística será realizado no Serviço de Doenças Infecciosas dos HUC-CHUC, Portugal.

#### **Fase 1-Seleção, colheita dos isolados e realização dos microtestes**

Esta fase do trabalho inicia-se com a seleção e colheita dos isolados de *P. falciparum* (Tarefa 1) e será realizada no local onde se efetua o diagnóstico de malária em Tucuruí, Estado do Pará no Brasil, seguindo-se a realização dos testes de avaliação de suscetibilidade *in vitro* ao artesunato e artemeter (Tarefa 2) que serão materializados num laboratório cedido para esse efeito. Esta fase terá a duração de dois meses, Janeiro e Fevereiro de 2013, época de chuva nesta região e de maior número de casos de doença.

## **Fase 2- Fenotipagem e genotipagem dos isolados**

Na segunda fase, será realizada a leitura dos testes *in vitro* e determinação da concentração de fármaco que inibe o crescimento de 50% dos parasitas (IC50 nM), ou seja, a fenotipagem relativamente à suscetibilidade *in vitro* ao artesunato e artemeter dos isolados (Tarefa 3). Posteriormente, realiza-se a análise genotípica que inclui: a pesquisa de polimorfismos genéticos nos genes *pfert*, *pfmdr1* e *pfATPase6* por PCR-RFLP (Tarefa 4) e a pesquisa do número de cópias do gene *pfmdr1* por PCR em Tempo Real nos isolados com os IC50 mais elevados (Tarefa 5). Após conclusão da caracterização fenotípica relativamente à suscetibilidade *in vitro* ao artesunato e artemeter e genotípica dos isolados colhidos, irá proceder-se à avaliação da correlação dos polimorfismos genéticos dos genes *pfert*, *pfmdr1* e *pfATPase6* com os valores da suscetibilidade *in vitro* ao artesunato e artemeter dos isolados (Tarefa 6).

## **Fase 3-Avaliar a evolução do perfil fenotípico e genotípico**

Na terceira fase será avaliada a evolução da suscetibilidade *in vitro* ao artesunato e artemeter (Tarefa 7), e a evolução do perfil genotípico, polimorfismos genéticos nos genes *pfert*, *pfmdr1* e *pfATPase6* e número de cópias do gene *pfmdr1* (Tarefa 8). A avaliação da evolução será realizada através dum estudo comparativo entre os valores de suscetibilidade *in vitro* e perfil genotípico dos isolados obtidos neste trabalho, seis anos após a introdução dos ACTs como tratamento de primeira linha na malária não complicada por *P. falciparum*, e os valores de referência de suscetibilidade *in vitro* basal e perfil genotípico de isolados antes da introdução dos ACTs, recorrendo a um trabalho realizado por Ferreira *et al* em 2005 [11]. Pretendendo-se verificar se introdução em larga escala dos ACTs levou a alterações na suscetibilidade *in vitro* e perfil genotípico dos isolados nesta região do globo.



### **3.2.3. Tarefas**

#### **Tarefa 1**

**Designação da tarefa** - Seleção e colheita dos isolados de *P. falciparum*.

**Data de início de atividade** - 01-01-2013

**Duração da tarefa (em meses)** - 2

**Pessoa\*mês** - 2

#### **Descrição da tarefa e resultados esperados**

O processo de seleção dos isolados será realizado no local onde se dirigem os indivíduos com sintomas de malária como episódios de calafrios, febre e sudorese, cefaleias e mialgias para pesquisar a infecção por *Plasmodium spp.* Os utentes são inicialmente observados pelas equipas médicas locais, sendo a pesquisa de parasitas efetuada por microscopia ótica através da observação de esfregaços sanguíneos fixados com metanol (Sigma-Aldrich®) e gota espessa, corados com Giemsa a 20% (Fluka®). Esta amostra de sangue é colhida por punção digital, efetuada com lancetas. Após confirmação de mono-infecção por *P. falciparum*, será efetuado um inquérito a cada indivíduo, baseado nos critérios de inclusão predefinidos pela O.M.S. relativos a testes de avaliação da suscetibilidade *in vitro*: 1) mono-infecção por *P. falciparum*; 2) parasitémia entre 1 000 – 80 000 parasitas / ml de sangue; 3) não possuir sinais clínicos de outras infeções; 4) respeitar os períodos de toma dos antimaláricos: quinino, artemisinina e derivados - 7 dias; 4 - aminoquinoléínas - 14 dias; pirimetamina e/ou sulfaminas - 28 dias e mefloquina - 56 dias. Aos indivíduos passíveis de inclusão no estudo, serão explicados os objetivos do trabalho e obtido consentimento informado. A

inclusão no estudo de menores de dezoito anos deverá ser devidamente autorizada pelos pais.

A colheita das amostras de sangue dos indivíduos selecionados para o estudo será realizada por técnicos de saúde credenciados da instituição local. Serão colhidos cerca de 5 ml de sangue venoso de cada indivíduo em S-Monovettes® Haematology EDTA K<sub>3</sub> de 9 ml (Sarstedt™). Todos os indivíduos selecionados serão tratados de acordo com as normas de saúde locais imediatamente após a colheita de sangue venoso: combinação fixa de artemeter+lumefantrina ou artesunato+mefloquina durante 3 dias. Do volume total de sangue venoso colhido aproximadamente 500 µl serão colocados em papel de filtro *Whatman* nº 4, devidamente identificados e secos à temperatura ambiente que serão posteriormente acondicionados individualmente em embalagens plásticas e armazenados à temperatura ambiente em contentores com sílica gel. O sangue restante será usado para os testes de avaliação da suscetibilidade *in vitro* ao artesunato e artemeter.

Nesta tarefa pretende-se fazer a colheita de aproximadamente 100 isolados de *P. falciparum*. O sangue em papel de filtro será posteriormente utilizado para análise genética.

**Membros da equipa de investigação que participam na tarefa-**Isabel Ferreira

## **Tarefa 2**

**Designação da tarefa** - Realização dos testes de avaliação de suscetibilidade *in vitro* ao artesunato e artemeter.

**Data de início de atividade** - 01-01-2013

**Duração da tarefa (em meses) - 2****Pessoa\*mês - 2****Descrição da tarefa e resultados esperados**

Esta tarefa será realizada num laboratório cedido para essa finalidade, em Tucuruí. Os testes *in vitro* serão realizados segundo a metodologia de MARK III, O.M.S. [29]. Inicialmente devem ser preparadas as soluções de trabalho dos fármacos da seguinte forma: 1) dissolução do artesunato em etanol a 70% (Sigma-Aldrich®) e do artemeter em metanol (Sigma-Aldrich®); 2) esterilização das soluções por filtração (filtros 0,2 µm, Millipore™); 3) preparação das concentrações finais do artesunato (0.05nM, 0.15nM, 0.45nM, 1.35nM, 4.0nM, 12.2nM, 36.5nM) e do artemeter (0.2nM, 0.6 nM, 1.8 nM, 5.4 nM, 16.2 nM, 48.6 nM, 146 nM), por diluições sucessivas em meio de cultura [RPMI 1640 (Gibco™) 10,44 gr/L, HEPES 25mM (Sigma-Aldrich®) 5,94 gr/L, Hipoxantina (Sigma-Aldrich®) 0,05 gr/L, ALBUMAX II (Gibco™) 5 gr/L, NaHCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich®) 5% 38 ml/L]. Segue-se a preparação da amostra a ser utilizada nos testes de avaliação da suscetibilidade *in vitro*: o sangue infetado é sujeito a duas “lavagens” com meio de cultura para retirar o plasma e os glóbulos brancos, após as quais lhe é adicionado meio de cultura na proporção de 1:1. Quando necessário, o sangue será diluído com eritrócitos não parasitados de modo a que a parasitemia inicial se aproxime de 0,5% (0,3% - 0,8%).

Para realização dos testes *in vitro* serão utilizadas Placas MicroWell™ 96, com poços de fundo plano, com tampa (VWR®). Em cada poço serão colocados 90 µl de cada fármaco à concentração desejada, no sentido vertical por ordem crescente de concentração. Seguidamente será colocado em cada poço 10 µl de

sangue infetado de cada isolado. Serão efetuados duplicados de cada fármaco para cada uma das amostras. Após a preparação das placas, estas serão sujeitas a incubação durante 24-30 horas, numa estufa a 37°C ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ) com 5% de CO<sub>2</sub>. A variação de tempo está relacionada com o grau de desenvolvimento dos trofozoítos no início do ensaio, do qual depende a sua maturação até ao estadio de esquizonte. Decorrida a incubação, aspira-se e rejeita-se o sobrenadante de cada poço e efetuam-se gotas espessas em lâminas usando o *pellet* correspondente. As lâminas são deixadas a secar durante 24 horas, fixadas com acetona (Sigma-Aldrich®) e coradas com Giemsa 1% (Sigma-Aldrich®) durante 1 hora.

O objetivo desta parte do trabalho será realizar com sucesso o maior número de testes *in vitro* dos isolados colhidos, evitando contaminações.

**Membros da equipa de investigação que participam na tarefa**-Isabel Ferreira

### **Tarefa 3**

**Designação da tarefa** - Fenotipagem relativamente à suscetibilidade *in vitro* ao artesunato e artemeter dos isolados.

**Data de início de atividade** - 01-03-2012

**Duração da tarefa (em meses)** - 2

**Pessoa\*mês** - 2

### **Descrição da tarefa e resultados esperados**

A leitura dos testes *in vitro* será realizada por microscopia ótica, pela contagem do número de esquizontes viáveis, com 3 ou mais núcleos, num total de 200 eritrócitos parasitados. O teste *in vitro* será incluído no estudo quando a cultura controlo (sem fármaco), apresentar um número de esquizontes viáveis

superior a 10%, confirmando o crescimento do parasita nas condições de cultura em que decorrem os ensaios. Os testes contaminados com bactérias ou fungos ou sem crescimento visível dos parasitas nos controlos (sem fármaco) serão eliminados do estudo. O resultado da leitura dos microtestes será representado em valores de IC50 nM ou seja a concentração de fármaco que inibe o crescimento de 50% dos parasitas, sendo estes valores determinados por análise log-probit ou regressão linear (Microsoft Office Excel 2007, Microsoft Corporation, USA).

No final desta fase teremos os valores dos IC50 dos isolados ou seja a sua suscetibilidade *in vitro* em relação ao artesunato e artemeter; pretende-se verificar se existem isolados com IC50 elevados o que será indicativo de diminuição da suscetibilidade *in vitro*.

**Membros da equipa de investigação que participam na tarefa-Isabel Ferreira**

#### **Tarefa 4**

**Designação da tarefa** - Pesquisa de polimorfismos genéticos nos genes *pfert*, *pfmdr1* e *pfATPase6* por PCR-RFLP.

**Data de início de atividade** - 01-05-2012

**Duração da tarefa (em meses)** - 3

**Pessoa\*mês** - 3

#### **Descrição da tarefa e resultados esperados**

A pesquisa de polimorfismos genéticos nos isolados será realizada por PCR-RFLP descritos e otimizados previamente por Ferreira *et al* [11,12], os clones de referência HB3, 3D7 e Dd2 serão utilizados como controlos nas diversas reações.

Serão analisados: no gene *pfATPase6* os polimorfismos R37K, G639D e S769N; no gene *pfmdr1* os polimorfismos N86Y, N1042D e D1246Y; e no gene *pfert* os polimorfismos N75E e K76T. A pesquisa de polimorfismos genéticos envolverá várias etapas:

1- Extração de DNA a partir do sangue em papel de filtro dos isolados e dos clones de referência de *P. falciparum*, utilizando um método de extração com Chelex® - 100 (Bio Rad®) [11].

2- Amplificação das amostras por PCR utilizando *primers* específicos para as sequências pretendidas; os *primers* e as condições da reação foram otimizados e descritos previamente por Ferreira *et al* [11,12]. Para realizar os PCR será utilizado um Kit: *Taq PCR Kit* (New England BioLabs™). Os *primers* serão sintetizados por encomenda à empresa MWG-Biotech AG.

3- Digestão do produto de PCR com a respectiva enzima de restrição (New England BioLabs™), que reconhece especificamente um local de restrição originado ou abolido por determinado polimorfismo, será realizada segundo o protocolo dos fornecedores dos reagentes.

4- Visualização dos produtos resultantes das digestões com as enzimas de restrição, por eletroforese em gel de agarose a 3% com brometo de etídio (Sigma-Aldrich®) a uma concentração final de 0,1 mg/ml, que permitirá a visualização do DNA sob luz ultravioleta e identificação dos polimorfismos. Será utilizado o marcador de peso molecular *Quick-Load® 50 bp DNA Ladder* (New England BioLabs™).

Com os resultados obtêm-se as prevalências dos diferentes alelos estudados, que serão utilizados para estudos comparativos com outros trabalhos realizados na

região da Amazônia e com as prevalências alélicas de populações parasitárias de África e do Sudeste Asiático.

**Membros da equipa de investigação que participam na tarefa**-Isabel Ferreira

### **Tarefa 5**

**Designação da tarefa** - Pesquisa do número de cópias do gene *pfmdr1* por PCR em Tempo Real nos isolados com IC50 mais elevado.

**Data de início de atividade** - 01-08-2013

**Duração da tarefa (em meses)** - 2

**Pessoa\*mês** - 2

### **Descrição da tarefa e resultados esperados**

A estimativa do número de cópias será realizada por PCR em Tempo Real com deteção com *SYBR Green I*, utilizando como método de quantificação o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , metodologia descrita e otimizada previamente por Ferreira *et al* [30]. Como controlo multicópias será utilizado DNA do clone de *P. falciparum* Dd2 por possuir 4 cópias do gene *pfmdr1*. Cada isolado será analisado em 3 experiências independentes, sendo o resultado final a média do nº de cópias resultante dos três ensaios.

As reações de PCR em Tempo Real serão efetuadas no aparelho *Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems™), utilizando placas de 96 poços *MicroAmp® Optical* (Applied Biosystems™) e um *kit* específico para PCR em tempo real: *qPCR™ Core Kit for SYBR Green I®* (Eurogentec™).

O resultado esperado deste ensaio será obter o número de cópias do gene *pfmdr1* nos isolados com IC50 mais elevado ou seja com menor suscetibilidade *in vitro*, verificando se existe amplificação do gene.

**Membros da equipa de investigação que participam na tarefa-Isabel Ferreira**

### **Tarefa 6**

**Designação da tarefa** - Avaliar a correlação dos polimorfismos genéticos dos genes *pfprt*, *pfmdr1* e *pfATPase6* com os valores da suscetibilidade *in vitro* ao artesunato e artemeter dos isolados.

**Data de início de atividade** - 01-10-2013

**Duração da tarefa (em meses)** - 1

**Pessoa\*mês** - 1

### **Descrição da tarefa e resultados esperados**

A avaliação duma possível correlação entre os diferentes polimorfismos estudados e a suscetibilidade *in vitro* dos isolados ao artesunato e artemeter, será realizada pelo teste de *Fisher*. Este teste permite calcular o valor da probabilidade exata para a determinação da associação entre duas variáveis, sendo estas a suscetibilidade aos antimaláricos e os diferentes polimorfismos analisados. Os dados serão agrupados numa tabela de contingência de duas entradas e será analisada a significância estatística pelo teste de *Fisher*, recorrendo a um programa disponível *online*, as associações serão consideradas estatisticamente significativas quando o valor de  $P \leq 0,05$ .

**Membros da equipa de investigação que participam na tarefa-Isabel Ferreira**



**Tarefa 7**

**Designação da tarefa** - Avaliar a evolução da suscetibilidade *in vitro* ao artesunato e artemeter.

**Data de início de atividade** - 01-11-2013

**Duração da tarefa (em meses)** - 1

**Pessoa\*mês** - 1

**Descrição da tarefa e resultados esperados**

A avaliação da evolução será realizada através dum estudo comparativo entre os valores de suscetibilidade *in vitro* ao artesunato e artemeter dos isolados obtidos neste trabalho, seis anos após a introdução dos ACTs como tratamento de primeira linha na malária não complicada por *P. falciparum*, e os valores de referência de suscetibilidade *in vitro* basal de isolados antes da introdução dos ACTs, recorrendo a um trabalho realizado em 2005 por Ferreira *et al* [11]. Pretendendo-se verificar se introdução em larga escala dos ACTs levou a alterações na suscetibilidade *in vitro* dos isolados na região.

Para realizar esse estudo comparativo calcula-se o valor da média geométrica dos IC50 do artesunato e artemeter dos isolados, depois procede-se à comparação com o valor da média geométrica dos IC50 do artesunato e artemeter obtidos em 2005, que foi 0,85 nM e 3,0 nM respetivamente [11].

**Membros da equipa de investigação que participam na tarefa**-Isabel Ferreira

**Tarefa 8**

**Designação da tarefa** - Avaliar a evolução do perfil genotípico, polimorfismos genéticos nos genes *pfcr1*, *pfmdr1* e *pfATPase6* e número de cópias do gene *pfmdr1*.

**Data de início de atividade** - 01-12-2013

**Duração da tarefa (em meses)** - 1

**Pessoa\*mês** - 1

**Descrição da tarefa e resultados esperados**

A avaliação da evolução será realizada através dum estudo comparativo entre o perfil genotípico dos isolados (polimorfismos analisados e número de cópias do gene *pfmdr1*) obtidos neste trabalho, seis anos após a introdução dos ACTs como tratamento de primeira linha na malária não complicada por *P. falciparum*, e o perfil genotípico de isolados antes da introdução dos ACTs, recorrendo a um trabalho realizado em 2005 por Ferreira *et al* [11]. Pretendendo-se verificar se introdução em larga escala dos ACTs levou a alterações no perfil genotípico dos isolados na região.

O estudo comparativo será realizado entre as prevalências dos alelos estudados nos isolados e as prevalências alélicas obtidas em 2005: gene *pfmdr1* 100% 86N, 89% 1042D e 100% 1246Y; gene *pfcr1* 100% 75N e 100% 76T; gene *pfATPase6* 89% 37R, 85% 639D e 100% 769N [11]. Também será comparado o número de cópias do gene *pfmdr1* dos isolados com IC50 mais elevado, que no estudo anterior foi de uma cópia única [11].

**Membros da equipa de investigação que participam na tarefa**-Isabel Ferreira

### **3.2.4. Calendarização e Gestão do Projeto**

#### **3.2.4.a Descrição da Estrutura de Gestão**

O projeto terá início em Janeiro de 2013, será desenvolvido e realizado pela Investigadora Isabel Ferreira sob orientação e supervisão do Prof. Doutor Saraiva da Cunha. O ponto de partida dos trabalhos será no Brasil onde serão realizadas as tarefas 1 e 2. Em Portugal serão realizadas as restantes tarefas, no final da tarefa 3, em Abril 2013, estará concluída a caracterização dos isolados relativamente à suscetibilidade *in vitro* aos fármacos testados e no final de Setembro de 2013 a caracterização genotípica dos isolados relativamente aos genes analisados estará finalizada. Estes resultados serão apresentados no XXI Congresso Latinoamericano de Parasitologia que decorrerá em Outubro de 2013 no Equador. Nos meses de Outubro a Dezembro serão realizadas as análises comparativas e estatísticas, e também serão preparados um artigo científico para publicação e um relatório de atividades para a FCT.

#### **3.2.4.b Lista de *Milestones***

##### ***Milestone M1***

Data: 30-04-2013

Designação: Caracterização da suscetibilidade *in vitro* dos isolados.

Descrição: Nesta data estará finalizada a caracterização dos isolados relativamente à suscetibilidade *in vitro* ao artesunato e artemeter.

***Milestone M2***

Data: 30-09-2013

Designação: Caracterização do perfil genotípico dos isolados.

Descrição: Nesta data estará finalizada a caracterização genotípica dos isolados relativamente aos genes estudados.

***Milestone M3***

Data: 31-12-2013

Designação: Avaliação da evolução dos IC50 e polimorfismos.

Descrição: Nesta data estará finalizada a avaliação da evolução da suscetibilidade *in vitro* ao artesunato e artemeter e do perfil genotípico de potenciais marcadores genéticos de resistência em isolados de *Plasmodium falciparum* do Norte do Brasil.

**3.2.4.c Cronograma – Anexo 1**

---

### 3.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Referência	Ano	Publicação
1	2011	World Health Organization. World malaria report 2011. WHO 2011.
2	2012	Brasil LW, Areas AL, Melo GC, Oliveira CM, Alecrim MG, Lacerda MV, O'Brien C, Oelemann WM, Zalis MG. Pfatp6 molecular profile of Plasmodium falciparum isolates in the western Brazilian Amazon. Malar J. 2012 Apr;11:111.
3	2009	Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyto AP, Tarning J, Lwin KM, Ariey F, Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NP, Lindegardh N, Socheat D, White NJ. Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. N Engl J Med. 2009 Jul;361(5):455-67.
4	2008	Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM. Artemisinin Resistance in Cambodia 1 (ARC1) Study Consortium. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. N Engl J Med. 2008 Dec;359(24):2619-20.
5	2010	Noedl H, Se Y, Sriwichai S, Schaecher K, Teja-Isavadharm P, Smith B, Rutvisuttinunt W, Bethell D, Surasri S, Fukuda MM, Socheat D, Chan Thap L. Artemisinin resistance in Cambodia: a clinical trial designed to address an emerging problem in Southeast Asia. Clin Infect Dis. 2010 Dec;51(11):e82-9.

---

- 
- 6      **2010** White NJ. Artemisinin resistance-the clock is ticking. *Lancet*. 2010 Dec;376(9758):2051-2.
- 
- 7      **2009** World Health Organization. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. WHO. 2009.
- 
- 8      **2002** Sidhu AB, Verdier-Pinard D, Fidock DA. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by *pfcr*t mutations. *Science*. 2002 Oct;298(5591):210-3.
- 
- 9      **2003** Pickard AL, Wongsrichanalai C, Purfield A, Kamwendo D, Emery K, Zalewski C, Kawamoto F, Miller RS, Meshnick SR. Resistance to antimalarials in southeast Asia and genetic polymorphisms in *pfmdr1*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Aug;47(8):2418-23.
- 
- 10     **2005** Jambou R, Legrand E, Niang M, Khim N, Lim P, Volney B, Ekala MT, Bouchier C, Esterre P, Fandeur T, Mercereau-Puijalon O. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet*. 2005 Dec;366(9501):1960-3.
- 
- 11     **2008** Ferreira ID, Martinelli A, Rodrigues LA, Nascimento JMS, do Carmo EL, do Rosário VE, Póvoa MM, Cravo P. *Plasmodium falciparum* from Pará state (Brasil) shows satisfactory in vitro response to artemisinin derivatives and absence of the S769N mutation in the SERCA-type PfATPase6. *Trop Med Int Health*. 2008 Feb;13(2):199-207.
- 
- 12     **2007** Ferreira ID, Lopes D, Martinelli A, Ferreira C, do Rosário VE, Cravo P. In vitro assessment of artesunate, artemether and
-

- 
- amodiaquine susceptibility and molecular analysis of putative resistance-associated mutations of *Plasmodium falciparum* from São Tomé & Príncipe. *Trop Med Int Health*. 2007 Mar;12(3):353-62.
- 
- 13**     **2011** World Health Organization. Global plan for artemisinin resistance containment (GPARC). WHO. 2011.
- 
- 14**     **2012** Bustamante C, Folarin OA, Gbotosho GO, Batista CN, Mesquita EA, Brindeiro RM, Tanuri A, Struchiner CJ, Sowunmi A, Oduola A, Wirth DF, Zalis MG, Happi CT. In Vitro-Reduced Susceptibility to Artemether in *P. falciparum* and Its Association With Polymorphisms on Transporter Genes. *J Infect Dis*. 2012 Aug;206(3):324-32.
- 
- 15**     **2005** Duraisingh MT, Cowman AF. Contribution of the *pfmdr1* gene to antimalarial drug-resistance. *Acta Trop*. 2005 Jun;94(3):181-90.
- 
- 16**     **2009** Lim P, Alker AP, Khim N, Shah NK, Incardona S, Doung S, Yi P, Bouth DM, Bouchier C, Puijalon OM, Meshnick SR, Wongsrichanalai C, Fandeur T, Le Bras J, Ringwald P, Arieu F. *Pfmdr1* copy number and artemisinin derivatives combination therapy failure in *falciparum* malaria in Cambodia. *Malar J*. 2009 Jan;8:11.
- 
- 17**     **2007** Alker AP, Lim P, Sem R, Shah NK, Yi P, Bouth DM, Tsuyuoka R, Maguire JD, Fandeur T, Arieu F, Wongsrichanalai C, Meshnick SR. *Pfmdr1* and in vivo resistance to artesunate-mefloquine in *falciparum* malaria on the Cambodian-Thai border. *Am J Trop Med Hyg*. 2007 Apr;76(4):641-7.
-

- 
- 18**     **2003**   Pickard AL, Wongsrichanalai C, Purfield A, Kamwendo D, Emery K, Zalewski C, Kawamoto F, Miller RS, Meshnick SR. Resistance to antimalarials in Southeast Asia and genetic polymorphisms in *pfmdr1*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Aug;47(8):2418-23.
- 
- 19**     **2004**   Price RN, Uhlemann AC, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, Patel R, Laing K, Looareesuwan S, White NJ, Nosten F, Krishna S. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet*. 2004 Jul;364(9432):438-47.
- 
- 20**     **2006**   Sidhu AB, Uhlemann AC, Valderramos SG, Valderramos JC, Krishna S, Fidock DA. Decreasing *pfmdr1* copy number in *Plasmodium falciparum* malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. *J Infect Dis*. 2006 Aug;194(4):528-35.
- 
- 21**     **2000**   Duraisingh MT, Jones P, Sambou I, von Seidlein L, Pinder M, Warhurst DC. The tyrosine-86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Mol Biochem Parasitol*. 2000 Apr;108(1):13-23.
- 
- 22**     **2000**   Duraisingh MT, Roper C, Walliker D, Warhurst DC. Increased sensitivity to the antimalarials mefloquine and artemisinin is conferred by mutations in the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*. 2000 May;36(4):955-61.
-



- 
- 23**     **2003** Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, Van Goethem ID, East JM, Lee AG, Kimura M, O'Neill PM, Bray PG, Ward SA, Krishna S. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2003 Aug;424(6951):957-61.
- 
- 24**     **2005** Uhlemann AC, Cameron A, Eckstein-Ludwig U, Fischbarg J, Iserovich P, Zuniga FA, East M, Lee A, Brady L, Haynes RK, Krishna S. A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinins. *Nat Struct Mol Biol*. 2005 Jun;12(7):628-9.
- 
- 25**     **2012** Cui L, Wang Z, Jiang H, Parker D, Wang H, Su XZ, Cui L. Lack of association of the S769N mutation in *Plasmodium falciparum* SERCA (PfATP6) with resistance to artemisinins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 May;56(5):2546-52.
- 
- 26**     **2010** Gama BE, Oliveira NKA, de Souza JM, Santos F, Carvalho LJM, Melo YFC, Rosenthal PJ, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz MF. Brazilian *Plasmodium falciparum* isolates: investigation of candidate polymorphisms for artemisinin resistance before introduction of artemisinin-based combination therapy. *Malar J*. 2010 Dec;9:355.
- 
- 27**     **2010** Jambou R, Martinelli A, Pinto J, Gribaldo S, Legrand E, Niang M, Pharath L, Volnay B, Ekala MT, Bouchier C, Fandeur T, Berzosa P, Benito A, Ferreira ID, Ferreira C, Vieira PP, Alecrim MG, Mercereau-Puijalon O, Cravo P. Geographic Structuring of the *Plasmodium falciparum* Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase (PfSERCA) Gene Diversity. *PLoS ONE*. 2010
-

---

Feb;5(2):e9424.

---

- 28**     **2011** Tanabe K, Zakeri S, Palacpac NM, Afsharpad M, Randrianarivelojosa M, Kaneko A, Marma AS, Horii T, Mita T. Spontaneous mutations in the Plasmodium falciparum sarcoplasmic/ endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (PfATP6) gene among geographically widespread parasite populations unexposed to artemisinin-based combination therapies. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Jan;55(1):94-100.
- 
- 29**     **1997** World Health Organization. Instructions for the Use of the *InVitro* micro-test kit for the assessment of the response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, mefloquine, quinine, amodiaquine, sulfadoxine/pyrimetamine and artemisinin. Document.1997 CTD/MAL/97.20. Geneva: WHO.
- 
- 30**     **2006** Ferreira ID, do Rosário VE, Cravo P. Real-time quantitative PCR with SYBR Green I detection for estimating copy numbers of nine drug resistance candidate genes in Plasmodium falciparum. Malar J. 2006 Jan;5:1.
-

---

### 3.4. PUBLICAÇÕES ANTERIORES

---

Referência	Ano	Publicação
11	2008	<b>Ferreira ID</b> , Martinelli A, Rodrigues LA, Nascimento JMS, do Carmo EL, do Rosário VE, Póvoa MM, Cravo P. Plasmodium falciparum from Pará state (Brasil) shows satisfactory in vitro response to artemisinin derivatives and absence of the S769N mutation in the SERCA-type PfATPase6. Trop Med Int Health. 2008 Feb;13(2):199-207.
12	2007	<b>Ferreira ID</b> , Lopes D, Martinelli A, Ferreira C, do Rosário VE, Cravo P. In vitro assessment of artesunate, artemether and amodiaquine susceptibility and molecular analysis of putative resistance-associated mutations of Plasmodium falciparum from São Tomé & Príncipe. Trop Med Int Health. 2007 Mar;12(3):353-62.
27	2010	Jambou R, Martinelli A, Pinto J, Gribaldo S, Legrand E, Niang M, Pharath L, Volnay B, Ekala MT, Bouchier C, Fandeur T, Berzosa P, Benito A, <b>Ferreira ID</b> , Ferreira C, Vieira PP, Alecrim MG, Mercereau-Puijalon O, Cravo P. Geographic Structuring of the Plasmodium falciparum Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca <sup>2+</sup> ATPase (PfSERCA) Gene Diversity. PLoS ONE. 2010 Feb;5(2):e9424.
30	2006	<b>Ferreira ID</b> , do Rosário VE, Cravo P. Real-time quantitative PCR with SYBR Green I detection for estimating copy numbers of nine drug resistance candidate genes in Plasmodium falciparum. Malar J. 2006 Jan;5:1.

---

---

### 3.5. RESSUBMISSÃO DE PROJETOS

---

Esta candidatura não é uma ressubmissão.

---

## 4. EQUIPA DE INVESTIGAÇÃO

---

### 4.1. LISTA DE MEMBROS

---

<b>Nome</b>	<b>Função</b>	<b>Grau</b>
Isabel Dinis Ferreira	Investigador responsável	Doutoramento
José Gabriel Saraiva da Cunha	Investigador	Agregação

---

**Total de membros: 2**

### 4.2. LISTA DE MEMBROS A CONTRATAR DURANTE A EXECUÇÃO DO PROJETO

---

Não serão contratados outros membros durante a execução do projeto.

---

## 5. OUTROS PROJETOS

---

### 5.1. PROJETOS FINANCIADOS

---

Sem projetos financiados.

### 5.2. CANDIDATURAS SIMILARES

---

Sem candidaturas similares.

### 5.3. PROJETOS A ASSOCIAR À LINHA DE INVESTIGAÇÃO DE EXCELÊNCIA

---

Não se aplica.

## 6. INDICADORES PREVISTOS

### INDICADORES DE REALIZAÇÃO PREVISTOS PARA O PROJETO

DESCRIÇÃO	2013	Total
A-Publicações		
Livros	0	0
Artigos em revistas internacionais	1	1
Artigos em revistas nacionais	0	0
B-Comunicações		
Comunicações em encontros científicos internacionais	1	1
Comunicações em encontros científicos nacionais	0	0
C-Relatórios	1	1
D-Organização de seminários e conferências	0	0
E-Formação avançada	0	0
Teses de Doutorado	0	0
Teses de Mestrado	0	0
Outras	0	0
F-Modelos	0	0
G-Aplicações computacionais	0	0
H-Instalações piloto	0	0
I-Protótipos laboratoriais	0	0
J-Patentes	0	0
L-Outros	0	0

### AÇÕES DE DIVULGAÇÃO DA ATIVIDADE CIENTÍFICA

Não serão realizadas ações de divulgação da atividade científica no âmbito deste projeto

## 7. ORÇAMENTO

### ORÇAMENTO GLOBAL

<b>Descrição</b>	<b>2013</b>	<b>Total</b>
Recursos Humanos	19.293,73	19.293,73
Missões	12.000,00	12.000,00
Consultores	0,00	0,00
Aquisição de bens e serviços	6.091,40	6.091,40
Registo de patentes	0,00	0,00
Adaptação de edifícios e instalações	0,00	0,00
Gastos gerais	7.474,28	7.474,28
<b>TOTAL DESPESAS CORRENTES</b>	<b>44.859,41</b>	<b>44.859,41</b>
Equipamento	31.280,00	31.280,00
<b>Total</b>	<b>76.139,41</b>	<b>76.139,41</b>

### PLANO DE FINANCIAMENTO

<b>Descrição</b>	<b>2013</b>	<b>Total</b>
Financiamento solicitado à FCT	76.139,41	76.139,41
Financiamento próprio	0,00	0,00
Outro financiamento público	0,00	0,00
Outro financiamento privado	0,00	0,00
<b>Total do Projeto</b>	<b>76.139,41</b>	<b>76.139,41</b>

## 8. JUSTIFICAÇÃO DO ORÇAMENTO

---

### 8.1. JUSTIFICAÇÃO DOS RECURSOS HUMANOS

---

**Tipo:** Bolsa de investigação (Doutor)

**Nº de pessoas:** 1

**Duração (em meses):** 12

**Custo envolvido (€):** 17.940,00

**Outros custos (€):** 1.353,73

**Justificação do financiamento solicitado:** Bolsa de investigação para doutorado com dedicação a 100% ao projeto e valor anual do seguro social voluntário.

### 8.2. JUSTIFICAÇÃO DE MISSÕES

---

**Tipo:** Deslocação para trabalho de campo

**Nº de deslocações:** 1

**Local:** Estado do Pará, Brasil

**Custo envolvido (€):** 8.000,00

**Justificação do financiamento solicitado:** Viagem, alojamento e ajudas de custo.

**Tipo:** Participação em congresso

**Nº de deslocações:** 2

**Local:** Equador

**Custo envolvido (€):** 4.000,00

**Justificação do financiamento solicitado:** Apresentação de resultados do projeto no XXI Congresso Latinoamericano de Parasitologia Flap 2013, Guayaquil-Ecuador.

### 8.3. JUSTIFICAÇÃO DE CONSULTORES

---

Não haverá despesas com consultoria de apoio ao projeto.

### 8.4. JUSTIFICAÇÃO DE AQUISIÇÃO DE BENS E SERVIÇOS

---

**Tipo:** Reagentes

**Custo (€):** 3.029,20

**Justificação do financiamento solicitado:** Este valor será gasto em reagentes para realização do projeto.

**Tipo:** Material consumível

**Custo (€):** 2.062,20

**Justificação do financiamento solicitado:** Este valor será gasto em material de laboratório para realização do projeto.

**Tipo:** Aquisição de serviços

**Custo (€):** 1.000,00

**Justificação do financiamento solicitado:** Serviço de enfermagem para as colheitas de sangue no Brasil.

### 8.5. JUSTIFICAÇÃO DE REGISTO DE PATENTES

---

Não haverá despesas de registo de patentes.



## 8.6. JUSTIFICAÇÃO DO EQUIPAMENTO

---

### 8.6.1. Equipamento já disponível para a execução do projeto

**Tipo de equipamento:** Estufa de CO2

**Fabricante:** Shel lab

**Modelo:** 2402

**Ano:** --

**Tipo de equipamento:** Câmara de fluxo laminar

**Fabricante:** ADS Laminaire

**Modelo:** Modelo Bio II

**Ano:** --

**Tipo de equipamento:** Microscópio ótico

**Fabricante:** Olympus

**Modelo:** CX21

**Ano:** 2006

**Tipo de equipamento:** Tina e fonte de eletroforese

**Fabricante:** Bio Rad

**Modelo:** 164-0305

**Ano:** 2008

**Tipo de equipamento:** Transiluminador UV

**Fabricante:** Stratagene

**Modelo:** Eagle Eye II

**Ano:** 2002

### **8.6.2. Discriminação do equipamento a adquirir**

**Tipo de equipamento:** Aparelho para PCR em Tempo Real

**Fabricante:** Applied Biosystems

**Modelo:** 7500 Real-Time PCR System

**Custo (€):** 31.280,00

**Justificação do financiamento solicitado:** Realização das reações de PCR e PCR em Tempo Real.

### **8.7. JUSTIFICAÇÃO DE ADAPTAÇÃO DE EDIFÍCIOS E INSTALAÇÕES**

Não haverá despesas de adaptação de edifícios e instalações.

---

## **9. ANEXOS**

---

Anexo 1 – Cronograma.

---

## **10. CONFLITOS DE INTERESSE**

---

Não existem conflitos de interesse.

Anexo 1  
Cronograma

Nº Tarefa	Designação da tarefa	Pessoa nºmês	Ano 2013															
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
1	Seleção e colheita dos isolados de <i>Plasmodium falciparum</i>	2																
2	Realização dos testes de avaliação de suscetibilidade <i>in vitro</i> ao artesunato e artemeter	2																
3	Fenotipagem relativamente à suscetibilidade <i>in vitro</i> ao artesunato e artemeter dos isolados	2																
4	Pesquisa de polimorfismos genéticos nos genes <i>pfprt</i> , <i>pfmdr1</i> e <i>pfATPase6</i> por PCR-RFLP	3																
5	Pesquisa do número de cópias do gene <i>pfmdr1</i> por PCR em Tempo Real nos isolados com IC50 mais elevado	2																
6	Avaliar a correlação dos polimorfismos genéticos dos genes <i>pfprt</i> , <i>pfmdr1</i> e <i>pfATPase6</i> com os valores da suscetibilidade <i>in vitro</i> ao artesunato e artemeter dos isolados.	1																
7	Avaliar a evolução da suscetibilidade <i>in vitro</i> ao artesunato e artemeter	1																
8	Avaliar a evolução do perfil genotípico, polimorfismos genéticos nos genes <i>pfprt</i> , <i>pfmdr1</i> e <i>pfATPase6</i> e número de cópias do gene <i>pfmdr1</i>	1																

## Anexo 2 - Normas de candidatura à FCT e formulário

(Adaptado de: <http://www.fct.pt/apoios/projectos/concursos/instrucoes>)

O formulário de candidatura tem 10 secções:

1. Identificação do projeto
2. Instituições envolvidas
3. Componente científica
4. Equipa de investigação
5. Projetos financiados
6. Indicadores previstos
7. Orçamento
8. Justificação do orçamento
9. Anexos
10. Conflitos de Interesse

**1. Identificação do projeto:** Informação sobre o título e área científica (principal e secundária) do projeto, palavras chave, data de início do projeto e sua duração.

O financiamento solicitado é calculado automaticamente a partir do preenchimento dos quadros do orçamento.

**2. Instituições participantes.** As instituições estão classificadas em:

- Instituição Proponente
- Instituições Participantes
- Unidade de Investigação Principal
- Unidades de Investigação Adicionais
- Instituição de Acolhimento

As instituições participantes são inseridas uma a uma dentro do respetivo quadro. Se a instituição pretendida não se encontrar na lista deverá preencher o formulário disponibilizado para o efeito e seguir as instruções. A designação de Unidade de Investigação está reservada de acordo com critérios da FCT incluindo nomeadamente as que são objeto de financiamento plurianual.

### **3. Componente Científica.**

A Componente Científica da candidatura organiza-se da seguinte forma:

3.1-Sumário (em português e inglês)

3.2-Descrição Técnica

3.2.1-Revisão da Literatura

3.2.2-Plano de Investigação e Métodos

3.2.3-Tarefas

3.2.4-Calendarização e Gestão do Trabalho

3.3-Referências Bibliográficas (máx. 30 referências)

3.4-Publicações Anteriores (máx. 5 referências)

3.5-Ressubmissão de Candidatura

### **4. Equipa de Investigação.**

O quadro da equipa de investigação divide-se em 2 secções:

4.1-Lista de elementos da equipa

Nesta lista cada investigador deverá fornecer a sua chave de associação para ser adicionado como membro da equipa. Após efetuada esta operação, é apresentada para escolha a percentagem de participação no projeto.

#### 4.2-Lista de outros elementos a contratar durante a execução do projeto

Estes elementos são automaticamente adicionados à equipa através do quadro justificação dos recursos humanos, indicando o nº de pessoas e o tipo de vínculo.

### **5. Outros projetos**

#### 5.1-Projetos financiados

Os projetos financiados do mesmo IR podem ser adicionados de duas formas conforme se trate de um financiamento da FCT ou de outra entidade. No caso de se tratar de um financiamento atribuído pela FCT deverá ser fornecida a referência do projeto o que aciona a importação automática de dados referentes ao projeto, alguns dos quais passíveis de correção ou de completação. Para projetos financiados por outras instituições, é necessário preencher a referência e, seguidamente, todos os elementos do projeto.

#### 5.2-Candidaturas similares

É obrigatório referir qualquer outra candidatura similar à corrente que possa vir a configurar, se ambas forem aceites, uma situação irregular. A interface é análoga à usada para indicar projetos financiados.

#### 5.3-Projetos a Associar à Linha de Investigação de Excelência

Tipicamente os projetos de IC&DT em linhas de investigação de excelência devem agrupar pelo menos três projetos de investigação com financiamento obtido em concursos competitivos nos últimos 5 anos.

Os projetos financiados do mesmo IR ou de outros membros da equipa de investigação podem ser adicionados de duas formas conforme se trate de um financiamento da FCT ou de outra entidade.

No caso de se tratar de um financiamento atribuído pela FCT deverá ser fornecida a referência do projeto o que aciona a importação automática de dados referentes ao projeto, alguns dos quais passíveis de correção ou de completação.

Para projetos financiados por outras instituições, é necessário preencher a referência e, seguidamente, todos os elementos do projeto.

## **6. Indicadores previstos**

## **7. Orçamento**

É obrigatório preencher um quadro de orçamento para a Instituição Proponente e para cada uma das Instituições Participantes. O total dos valores inscritos representa o financiamento solicitado. Adicionalmente, e quando aplicável, deve ser preenchido o quadro Plano de Financiamento. As rubricas orçamentais podem incluir (dependendo do estabelecido no edital do concurso):

-Recursos humanos: Os recursos humanos propostos nesta rubrica aparecerão automaticamente na secção de Equipa de investigação.

-Missões: O total desta rubrica deve corresponder ao total que é apresentado no quadro *Orçamento Global* na secção Orçamento.

-Consultores: O total desta rubrica deve corresponder ao total que é apresentado no quadro *Orçamento Global* na secção Orçamento. Dada a importância dos Consultores para a avaliação da execução do projeto e da equipa, as indicações de

nome e instituição devem ser não ambíguas de maneira a possibilitar a sua fácil identificação pelo painel de avaliação. Recomenda-se a existência na Internet de um pequeno currículo público atualizado e facilmente localizável.

-Aquisição bens e serviços: O total desta rubrica deve corresponder ao total que é apresentado no quadro *Orçamento Global* na secção Orçamento.

-Registo de patentes: O total desta rubrica deve corresponder ao total que é apresentado no quadro *Orçamento Global* na secção Orçamento.

-Adaptação de edifícios e instalações: As adaptações de edifícios e instalações imprescindíveis à realização do projeto, nomeadamente por razões ambientais ou de segurança.

-Equipamento: O total desta rubrica deve corresponder ao total que é apresentado no quadro *Orçamento Global* na secção Orçamento.

-Despesas Gerais

## **8. Justificação do orçamento**

A justificação do orçamento deverá ser inscrita por rubrica. O total de cada uma das rubricas deverá ser igual ao indicado no quadro *Orçamento Global*.

Não existe transferência automática de verbas entre os dois quadros.

## **9. Ficheiros Anexos**

Esta secção destina-se à inserção de documentos que contendo informação não transmissível nos campos de texto: fórmulas, esquemas, diagramas, gráficos ou imagens.

**10. Conflitos de Interesse:** Esta secção destina-se a identificar os avaliadores que constituam um claro conflito de interesse na avaliação do projeto.



**Limites de número de caracteres dos vários campos do formulário:**(Adaptado de: <http://www.fct.pt/apoios/projectos/concursos/faq>)

<b>Campo</b>	<b>Limite</b>
1. Identificação do projeto - Título PT	255
1. Identificação do projeto - Título EN	255
3.1. Sumário PT	5000
3.1. Sumário EN	5000
3.2.1. Revisão da Literatura	6000
3.2.2. Plano de Investigação e Métodos	10000
3.2.3. Tarefas - Descrição e resultados esperados	4000
3.2.4.a. Descrição da Estrutura de Gestão	3000
3.2.4.b. Descrição de <i>Milestone</i>	300
5. Projetos financiados – Resultados	5000
6. Indicadores previstos - Ações de divulgação da atividade científica	3000
8.1. Justificação dos Recursos Humanos	600
8.2. Justificação de Missões	600
8.3. Justificação de Consultores	600
8.4. Justificação de Aquisições de Bens e Serviços	600
8.5. Justificação de patentes	600
8.6.2. Discriminação do equipamento a adquirir - Justificação	600
8.7. Justificação da adaptação de edifícios	600