



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2009/2010

Maria João Leite Vilaça
Artemisininas no tratamento da
Malária: perspectivas futuras.

Abril, 2010

FMUP



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Maria João Leite Vilaça
Artemisininas no tratamento da
Malária: perspectivas futuras

Mestrado Integrado em Medicina

Área: Doenças Infecciosas

**Trabalho efectuado sobre a Orientação de:
Dra. Cândida Abreu**

De acordo com a revista "*Acta Médica Portuguesa*"
Abril, 2010

FMUP



Nome: Maria João Leite Vilaça

Endereço electrónico: m04172@med.up.pt

Título da Monografia:

Artemisininas no tratamento da Malária: perspectivas futuras.

Nome completo do Orientador:

Cândida Manuela Ferreira de Abreu

Nome completo do Co-Orientador: -

Ano de conclusão: 2010

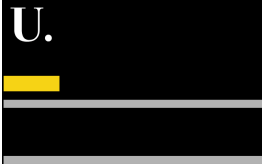
Designação da área do projecto de opção:

Doenças Infecciosas

É autorizada a reprodução integral desta Dissertação/Monografia/Relatório de Estágio (*cortar o que não interessar*) apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 19/04/2010

Maria João Leite Vilaça



Projecto de Opção do 6º ano - DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Eu, Maria João Leite Vilaça, abaixo assinado, nº mecanográfico 040801172, aluna do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter actuado com absoluta integridade na elaboração deste projecto de opção.

Neste sentido, confirmo que NÃO incorri em plágio (acto pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 19/04/2010

Maria João Leite Vilaça

Artemisininas no tratamento da Malária: perspectivas futuras

Resumo

A malária é considerada a doença parasitária mais importante do mundo, sendo responsável por cerca de 0,9 milhão de mortes em 2008, sobretudo de crianças com menos de 5 anos. Campanhas de erradicação abrangentes foram previamente tentadas e são novamente tidas como objectivo. No entanto, as resistências, em especial por parte do *Plasmodium falciparum*, desenvolveram-se à medida que a intensidade do uso dos diversos fármacos aumentou, pelo que é preocupação crescente que resistências às artemisininas, usadas em terapêutica de combinação (ACT) como primeira linha terapêutica recomendada pela OMS, também se desenvolvam ou tenham já desenvolvido. As artemisininas, fármacos cujo mecanismo de acção permanece por esclarecer apesar dos vários anos de uso, apenas recentemente foram introduzidas no tratamento da malária na maior parte do mundo, enquanto que no Sudeste asiático são usados há muito tempo. Diversos estudos apontam para uma diminuição da susceptibilidade do parasita *Plasmodium falciparum* às artemisininas na fronteira entre o Camboja e a Tailândia, sendo o principal fenómeno documentado um atraso na depuração do parasita no sangue de alguns doentes. Contudo, a forma de monitorização da resistência terapêutica às artemisininas tem-se revelado difícil de definir: é frequente verificar-se a dissociação entre as observações *in vivo* e a susceptibilidade *in vitro* aos fármacos, valor *cut-off* IC_{50} definidor de resistência *in vitro* ainda não foi estabelecido e apesar de diversos marcadores genéticos associados em diferentes estudos à resistência, ainda não foi encontrado um marcador genético preciso com resultados reprodutíveis que possa ser usado como indicador de resistência. Não obstante os vários pontos susceptíveis de discussão e a falta de uniformidade dos estudos existentes, tornando-se

difícil comparar resultados, a OMS assume que a resistência às artemisininas efectivamente surgiu nesta zona do planeta sendo uma ameaça potencial ao sucesso obtido nos últimos anos no combate a esta doença. Esta resistência aparenta estar contida, e maioritariamente a eficácia terapêutica de ACT permanece alta. Assim é urgente que a comunidade internacional foque esforços na prevenção do uso de artemisininas em monoterapia, no acesso universal ao diagnóstico da doença e estreite a vigilância da eficácia terapêutica e monitorização de resistências, de modo a que estes fármacos possam continuar a ser usados com eficácia no arsenal terapêutico contra a malária.

(364 palavras)

Palavras-chave: *Artemisininas, Resistência às Artemisininas, Tratamento da Malária*

Artemisinin in Malaria treatment: future perspectives

Abstract

Malaria is considered the most important parasitic disease in the world, accounting for about 0,9 million deaths in 2008, mainly children under 5 years old. Extensive eradication campaigns have been attempted previously and are again taken as a possible target. However, resistance, mainly by the *Plasmodium falciparum* parasite, evolved as the intensive use of several drugs has increased. Growing concern is that resistance to artemisinins, a new class of antimalarial which are now used in combination therapy (ACT) as first line of treatment recommended by WHO, may also develop or have already developed. The artemisinins, drugs whose mechanism of action remains unclear despite several years of use, only recently have been introduced in most of the world, while in Southeast Asia are used for longer. Several studies show a decrease in the susceptibility of the parasite *Plasmodium falciparum* to artemisinins on the border between Cambodia and Thailand, being the main phenomenon documented a delay in parasite clearance from the blood of some patients. However, the form of monitoring resistance to artemisinins has proved difficult to define: it is frequent to observe dissociation between the *in vivo* and *in vitro* susceptibility to the drug, the cut-off IC₅₀ value for defining *in vitro* resistance has not yet been established and in spite of several genetic markers associated with resistance in different studies, not yet was found one with accurate and reproducible results that can be used as an indicator of resistance. Despite the many points of discussion and the lack of uniformity in the existing studies (making it difficult to compare results), the WHO assumes that resistance to artemisinins had actually appeared in this area of the planet, being a potential threat to the success achieved in recent years in the fight against the disease. This resistance

appears to still be contained, and a majority of the therapeutic efficacy of ACT remains high. So it is urgent to the international community to focus efforts on preventing the use of artemisinin as monotherapy, in universal access to diagnosis of disease and in the narrowing of the surveillance and monitoring of therapeutic efficacy and resistance, so that these drugs continue to be used with efficacy in the therapeutic arsenal against malaria.

(367 words)

Keywords: *Artemisinins, Artemisinins Resistance, Treatment of Malaria*

Introdução

A malária é considerada a doença parasitária mais importante do mundo e em 2008 a OMS estimou cerca de 0,9 milhão de mortes que lhe são atribuíveis, sobretudo crianças de países da África subsariana com idade inferior a 5 anos [1].

A erradicação da malária foi sempre um objectivo considerado difícil de alcançar, face à complexidade da doença e às diferentes frentes de ataque que se nos apresentam. Atendendo às campanhas prévias mal sucedidas, a história ensina-nos que os fármacos antimaláricos têm um “prazo de validade”. As resistências, em especial por parte do *Plasmodium falciparum* – a espécie de *Plasmodium* mais virulenta e principal responsável pelas mortes por malária, – desenvolveram-se no século XX à medida que a intensidade do uso dos diversos fármacos aumentou [2]: primeiro à cloroquina no final da década de 50, depois à combinação sulfadoxina-pirimetamina (SP), e posteriormente, no final da década de 80, à mefloquina. De realçar a excepção do quinino, fármaco que apesar do uso prolongado permanece eficaz (ainda que diminuição de sensibilidade ou mesmo resistência tenham sido notificadas), sendo ainda o fármaco padrão para estudos de eficácia terapêutica [3].

Após várias décadas sem novos quimioterápicos para a malária, as artemisininas, substâncias cujo princípio activo foi isolado em 1971 [4], difundiram-se no arsenal terapêutico na década de 90. As suas características farmacodinâmicas e farmacocinéticas e o seu efeito potente na eliminação dos parasitas de *Plasmodium* trouxeram muitas expectativas face a esta nova classe de fármacos antimaláricos.

Em 2006 o uso de artemisininas em combinação com outro fármaco antimalárico foi definido pela OMS como terapêutica de primeira linha para o tratamento da malária não complicada por *Plasmodium falciparum*, baseados na não inferioridade relativamente às terapêuticas previamente usadas, à boa tolerância com escassos efeitos laterais e a uma

mais rápida resolução da parasitemia [3]. Intervenções baseadas na distribuição de redes mosquiteiras e na correcta aplicação de terapêuticas de combinação com artemisininas (ACT) parecem conduzir a uma significativa diminuição da prevalência e da mortalidade associada à malária [2]. Perspectivas optimistas sobre estas aplicações levam a que programas como o “*Roll Back Malária*” e o “*Malaria Eradication Research Agenda*” [2] voltem a ter a erradicação da malária como objectivo.

As artemisininas surgem hoje como primeira linha terapêutica mas a possibilidade de desenvolvimento de resistência a este novo grupo de antimaláricos é uma preocupação e desde a da década de 1990 que relatos sobre a possível diminuição da susceptibilidade do *Plasmodium falciparum* à terapêutica ACT se tem acumulado [5,6,7].

O presente estudo procurou rever e reflectir sobre o que se sabe da diminuição da sensibilidade/ resistência às artemisininas, possíveis mecanismos subjacentes, e a posição que assumem no arsenal terapêutico da malária.

Artemisininas: aspectos genéricos

Extraída de plantas do género *Artemisia*, em especial da *A. annua L.*, a artemisinina, ou *qing hao* (青蒿) como era conhecida, é utilizada pelo menos desde o 2º século A.C. pelos terapeutas chineses pelas suas propriedades antimaláricas. A sua utilização crescente no tratamento da malária deu-se a partir da década de 90 do século XX, passando a artemisinina da medicina tradicional para a primeira linha terapêutica face à malária não complicada. No entanto, de realçar que apenas em 2009 o seu uso clínico foi aprovado pela FDA, ainda que nas recomendações de tratamento da malária de 2006 já venham referidas como fármaco de 1ª linha.

A artemisinina e os seus derivados mais recentes (artesunato, artemeter, artemotil, dihidroartemisinina) produzem uma rápida resolução da parasitemia com redução do

número de parasitas no sangue segundo um factor de aproximadamente 10 000 em cada ciclo assexual, muito mais do que qualquer outro antimalárico conhecido [3]. Devido à sua curta semi-vida com rápido início de acção as artemisininas no tratamento da malária devem ser sempre combinadas com um fármaco de longa semi-vida que remova os parasitas restantes, tal como mefloquina, lumefantrina, amodiaquina ou SP. A sua acção estende-se também à diminuição do número de gametócitos no sangue e à redução da infecciosidade daqueles que sobrevivem, efeito que poderá ajudar a diminuir as taxas de transmissão em áreas de baixa endemia [8]. Aliado a estas propriedades, estes fármacos tem múltiplas formas de administração (oral, rectal, intravenosa, intramuscular), são muito bem tolerados e tem baixa toxicidade conhecida [3].

Artemisininas: mecanismos de acção

Apesar dos vários anos de uso, os mecanismos de acção da artemisinina e seus derivados permanecem por esclarecer. Muitos consideram que a ponte endoperoxídica (**figura 1**), comum a todos estes compostos, possa ser a componente estrutural determinante do seu mecanismo de acção: a redução desta ponte pelo heme intraparasitário ou pelo ferro iónico, ou a sua protonação conduzirá à formação de radicais de oxigénio que provocarão a morte ao parasita. Contudo estudos sugerem que a integridade desta ponte endoperoxídica é necessária mas não suficiente para a actividade antimalárica [4,8,9], pelo que outros alvos, merecedores de mais estudos, tem sido propostos como base para o mecanismo de acção, tais como a cadeia mitocondrial [9] (despolarização da membrana mitocondrial) e o retículo sarco-endoplasmático Ca^{2+} -ATPase (SERCA) [10] codificado pelo gene *pfatp6*.

Artemisininas: alterações de susceptibilidade

Estudos em animais (tabela I)

Estudos em animais alertam desde há alguns anos para a ocorrência de resistência às artemisininas. Em 1999 dois estudos laboratoriais, recorrendo ao efeito de pressão de selecção com o uso de fármaco, apresentaram, pela primeira vez parasitas *Plasmodium* de roedores artemisinino-resistentes [11,12]. Contudo o fenotipo resistente era instável, desaparecendo rapidamente com a remoção da pressão de selecção. Em 2006 Afonso e colaboradores [13] anunciaram pela primeira vez parasitas *Plasmodium chabaudi chabaudi* resistentes à artemisinina e ao artesunato, cujo fenótipo era geneticamente estável e transmissível através de mosquitos *Anopheles*. Mas o facto de tal ocorrer apenas nesta espécie levantou a questão de poder ser somente uma peculiaridade desta.

Estudos em humanos (tabela II)

Não obstante, ainda previamente a este último estudo, estudos clínicos populacionais sugeriram alterações na susceptibilidade do *Plasmodium falciparum* à classe das artemisininas. Menção à diminuição da sensibilidade *in vitro* às artemisininas foi feita em dois em dois estudos independentes, efectuados entre 1988-1999 e 1999-2001 na China e Tailândia respectivamente [5,6]. Um outro estudo de amostras sanguíneas colhidas entre 2001 e 2003 em doentes com malária por *P. falciparum*, não complicada, provenientes do Senegal, Camboja e Guiana Francesa entre 2001 e 2003, avaliou a sensibilidade *in vitro* do parasita à artemeter, tendo sido registados os valores de IC₅₀ de 117nmol/L e 45nmol/L, ou seja, valores muito acima do esperado (< 10 nmol/L) [14]. Num outro estudo, a avaliação da susceptibilidade *in vitro* à dihidroartemisinina (DHA) de parasitas *Plasmodium falciparum* isolados de viajantes regressados de países Africanos entre 2004 e 2006 registou alguns casos esporádicos de IC₅₀ superiores a 10nmol/L com um caso superior 30 nmol/L [15].

Contudo, e ainda que em praticamente todo o mundo se tenha registado alguns casos de diminuição da sensibilidade *in vitro* às artemisininas, maioritariamente a sensibilidade permaneceu elevada e a eficácia terapêutica permaneceu alta em todas estas amostras.

Na Ásia, mais concretamente na fronteira entre o Camboja e a Tailândia, a possibilidade da diminuição da sensibilidade do *Plasmodium* à ACT foi apoiado por 3 estudos independentes [16]: em Pailin, Camboja, 2002, a resposta clínica à terapêutica ACT apresentava uma eficácia de 85,7%; em 2004 na mesma localidade, a eficácia terapêutica foi estimada em 79,3%; na província Tailandesa de Trat, em 2003, essa eficácia foi avaliada em 78,6%

Um estudo de maior dimensão avaliou, na mesma área fronteiriça, a eficácia artesunato+mefloquina durante 13 anos (1/1995 a 12/2007) [17]. Um total de 3264 doentes com malária por *P. falciparum*, não complicada, envolvidos em 9 estudos diferentes, foram avaliados. Apesar da ligeira redução da eficácia ($p < 0,001$) verificada ao longo dos anos, em 2007 esta permanecia acima de 95% (95,6%); contudo a proporção de doentes com parasitemia após o 2º dia de tratamento da malária aumentou significativamente de 4,5% antes de 2001 para 21,9% entre 2001 e 2007 ($p < 0,001$). Uma depuração parasitária mais lenta associa-se com um maior risco de desenvolver gametocitemia. A susceptibilidade *in vitro* ao artesunato aumentou significativamente até 2002 ($IC_{50} \approx 2nM/L$), mas depois diminuiu para valores semelhantes aos de 1995 ($IC_{50} \approx 6nM/L$) [17]. Apesar dos valores permanecerem muito baixos, pondera-se se um novo factor não terá surgido para explicar esta alteração. Em 2009 a sugestão que existe um declínio da susceptibilidade às artemisininas é reforçada com o estudo de Dondorp e colaboradores [20]. Neste estudo a eficácia de artesunato em monoterapia (2mg/kg/dia, 7 dias) e artesunato (4mg/kg/dia, 3 dias) + mefloquina (25mg/kg em 2 doses após terminar 3 dias de artesunato) foi comparada em doentes de duas localidades diferentes:

40 doentes de Pailin, Cambodja Ocidental, junto à fronteira com a Tailândia e 40 doentes de Wang Pha, Norte Ocidental da Tailândia. Os resultados demonstram que os parasitas *Plasmodium falciparum* de doentes em Pailin, Cambodja Ocidental, apresentavam reduzida susceptibilidade *in vivo* ao artesunato quando comparados com os dados da Tailândia. Esta reduzida susceptibilidade era caracterizada por um tempo marcadamente mais prolongado de depuração parasitária, com relativamente pouca heterogeneidade entre os doentes.

Em Dezembro de 2008 Noedl e colaboradores apresentam evidência de *Plasmodium falciparum* genuinamente resistente a artemisininas [18]. Doentes com malária por *P. falciparum* não complicada são considerados como tendo infecção artemisinina resistente se apresentarem os seguintes critérios: persistência de parasitas após 7 dias de tratamento ou ressurgimento destes nos 28 dias após o início da terapêutica; concentração plasmática de dihidroartemisinina (DHA) adequada; tempo de depuração parasitária prolongado e reduzida susceptibilidade *in vitro* à DHA [18]. Dois dos 60 doentes medicados com artesunato cumpriram os critérios de infecção resistente a artemisinina. Para estes doentes o valor de IC₅₀ para DHA era 4 vezes superior à média geométrica e cerca de 10 vezes superior à de referência do clone artemisinina sensível W₂ (1,51nmol/L) [18,19] (**figura 2**), o tempo de depuração parasitária era de 133 e 95 horas, comparado com a média de 52,2 horas dos restantes doentes curados.

Base genética da resistência

Atendendo ao estudo de Eckstein-Ludwig e colaboradores [10], que estabelece o retículo sarco-endoplasmático Ca²⁺-ATPase (SERCA) codificado pelo gene *pfatp6* (PfSERCA) como provável alvo no mecanismo de acção das artemisininas, tem-se especulado se mutações neste gene poderão estar na base da resistência a artemisininas

por parte do *Plasmodium falciparum*. Laboratorialmente a mutação L263E no PfATP6 foi descoberta como abolindo a susceptibilidade à artemisinina [21], enquanto que em isolados da Guiana Francesa o polimorfismo S769N foi associado com um aumento significativo do valor de IC₅₀ para artemeter [14]. Mas estes polimorfismos, aparentemente tão promissores aquando a sua descoberta, falharam em ser reproduzíveis noutros achados. Outros polimorfismos têm sido apontados – a dupla mutação E431K A623E no Senegal, I89T na Tailândia [22], H243Y na África central [15] e T2694A em São Tomé e Príncipe [23] – contudo nenhuma destas mutações pontuais pode ser correlacionada com alterações reprodutíveis nas respostas às artemisininas. Também os estudos de Dondorp [20] e Noedl [18] falharam em associar a resistência a artemisininas a polimorfismos de do gene *pfatp6* (**tabela III**).

Outros alvos, incluindo o *Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporte* (PfCRT), a *translationally controlled tumor protein* (TCTP) e o *P. falciparum multidrug resistance protein* (PfMDR1), têm sido implicados na modulação da susceptibilidade do *P. falciparum* às artemisininas. Mutações pontuais do gene *pfert* encontradas em diversos isolados da Ásia, África e América do Sul foram associadas a aumento ligeiro da susceptibilidade dos parasitas às artemisininas [24,25]. Mas outros estudos negam qualquer associação entre este gene e a susceptibilidade às artemisininas [13,20,23] (**tabela IV**). A resistência a artemisininas em parasitas *Plasmodium yoelii* foi estudada laboratorialmente como estando correlacionada com um nível elevado de expressão da proteína TCTP [11], proteína com a qual a artemisinina formaria aductos covalentes [10,11]. Contudo em estudos em humanos, nem mutações pontuais nem alterações do número de cópias foram passíveis de serem associados a alterações da susceptibilidade do parasita [13,14]; na verdade o gene *tctp* aparenta estar muito conservado e não se encontrar sobre pressão selectiva major sendo assim pouco

provavelmente um forte candidato a resistências a fármacos antimaláricos [23] (**tabela V**). Um número aumentado de cópias do gene *P.falciparum multidrug resistance (pfmdr1)* é proposto como modulando a susceptibilidade do parasita não só a fármacos quimicamente não relacionados, como a mefloquina e lumefantrina mas também a artemisininas (com menor alteração dos valores IC₅₀) [9,22]. O mesmo ocorre com a existência de polimorfismo no gene, tais como N1942D, S1034C, D1246Y [24,26]. No entanto o efeito deste gene sobre a susceptibilidade às artemisininas permanece controverso e contraditório [4,14,16,17,18,20,24,26,27,28]. (**tabela VI**).

Em clones resistentes de *Plasmodium chabaudi*, apesar de não ser encontrada alterações nos genes já referenciados, identificaram-se 2 mutações num gene codificador de uma enzima DUB (UBP-1) [27]. Outro gene a referir é G7, gene de um transportador da família ABC, associado apenas num estudo a baixa reposta ao artesunato [28].

Discussão

Desde a década de 1970 que a fronteira entre o Camboja e a Tailândia tem sido o epicentro de resistências aos fármacos antimaláricos [7,16]. Estudos efectuados nos últimos anos sugerem uma alteração da sensibilidade aos ACT, poderá esta ser sinal de resistência aos derivados da artemisinina?

Apesar da diminuição da sensibilidade *in vitro* relatada desde há vários anos, em vários estudos recentes [7,17,20] a eficácia terapêutica das artemisininas aparenta permanecer alta, com a terapêutica de 3 dias de ACT a curar ainda mais de 95% dos doentes com malária por *P. falciparum* não complicada. Além disso, possivelmente a reduzida resposta *in vitro* / *in vivo* registada em diversos estudos poderá ser atribuível a resistências difundidas ao fármaco parceiro. Factores diversos dos hospedeiros, da terapêutica e farmacocinética também devem ser tidos em conta. A maioria dos estudos

referidos não explorou estas opções, no entanto, alguns reforçam que as alterações encontradas não poderiam ser explicadas por resistência ao fármaco parceiro [17,18,20], nem por outros aspectos, sugerindo a existência de novos factores que contribuem para um pequeno, mas significativo, aumento da tolerância do parasita aos componentes derivados da artemisinina na ACT. Outros aspectos que temos de ter em conta quando se avalia a resistência a qualquer fármaco são os casos de falência terapêutica devido a fármacos contrafeitos (muito comuns em muitas zonas do globo), ou a procedimentos incorrectos, com consequentes níveis sanguíneos demasiados baixos e/ou período terapêutico encurtado. Assim a questão principal é se os derivados das artemisininas, utilizados segundo as dosagens actualmente recomendadas pela OMS, preferencialmente em regimes de combinação, e administrados pelo mínimo 3 dias [3], estão realmente a enfrentar resistências.

Como monitorizar a resistência terapêutica? Nem a redução da sensibilidade *in vitro* nem a falha terapêutica por si só demonstra definitivamente o aparecimento de resistência ao fármaco [29], existindo frequentemente uma dissociação entre as observações *in vitro* e *in vivo*. Simultaneamente um valor *cut-off* de IC₅₀ como definidor de resistência *in vitro* nunca foi definido [15] e os investigadores ainda não conseguiram encontrar um marcador genético inequívoco que assinale a resistência a derivados das artemisininas.

Em Dezembro de 2008, Noedl e colaboradores relataram 2 casos que classificaram de resistentes às artemisininas, estabelecendo nesse estudo critérios definidores de infecção artemisinina-resistente em doentes com malária por *P. falciparum* não complicada [18] que pretendem ser o mais abrangentes possíveis, explorando a vertente *in vivo* e *in vitro* da resistência, apesar de não estipular o valor *cut-off* de IC₅₀.

Existe um consenso geral que a fronteira entre a Tailândia e Camboja apresenta uma diminuída sensibilidade a ACT e apesar do cepticismo inicial com muitos investigadores a preferirem falar de tolerância em vez de resistência – atendendo às diversas limitações existentes como diferentes regimes ACT e diferentes critérios de avaliação – a resistência aparenta ter efectivamente surgido mas com disseminação ainda controlada [1]. O principal fenómeno que tem sido documentado é um atraso da depuração parasitária sanguínea em alguns doentes medicados com artemisininas. Tanto o estudo por Carrara e colaboradores e o por Dondorp e colaboradores [17,20], relataram este aumento do tempo de depuração que se associa a um maior risco de desenvolver gametocitemia, e presumidamente, um maior risco de transmissão de fenotipos tolerantes. Este é um aspecto muito importante em termos de saúde pública pois o efeito das artemisininas em reduzir o estado de gametocitemia é um factor fundamental nos seus efeitos benéficos no controlo da transmissão da malária [17]. Nestes dois estudos [17,20] foi realçado que o prolongamento do tempo de depuração parasitária não podia ser explicado por alterações da susceptibilidade aos fármacos parceiros, farmacocinética, ou outros factores, entre os quais os inerentes aos hospedeiros. A discrepância não esperada entre as lentas respostas clínica e de depuração parasitária e os valores de susceptibilidade *in vitro* relativamente normais no estudo de Dondorp [20], pode ser considerada inesperada; contudo segundo os autores esta discrepância pode eventualmente ser explicada por uma reduzida susceptibilidade dos trofozoítos imaturos, sob forma anelar, em comparação com a dos trofozoítos e esquizontes mais maduros. Os testes de susceptibilidade *in vitro* actualmente disponíveis avaliam a exposição ao fármaco sobre todo o ciclo do parasita; assim, os resultados serão relativamente pouco afectados se apenas parte do ciclo for afectada pelos mecanismos que conduzem à resistência [20].

Enquanto as artemisininas só recentemente foram introduzidas na maioria do mundo, o seu uso já é corrente no Camboja ocidental há mais de 30 anos. Simultaneamente, e ao contrário do vivamente preconizado pela OMS, muitas companhias farmacêuticas continuam a vender derivados das artemisininas em monoterapia neste país [1]. O uso em monoterapia de artemisininas no Camboja durante tantos anos, aliado ao *background* genético dos parasitas desta região, poderá então ter contribuído para o surgimento e dispersão, apesar de aparentemente contida, de novos parasitas *Plasmodium falciparum* resistentes às artemisininas [20]. Contrastando, os derivados das artemisininas foram usados quase exclusivamente em combinação com outros fármacos ao longo da fronteira Tailândia-Birmania (Mianmar), onde as respostas parasitológicas se mantêm, mesmo após 15 anos de uso intensivo [17,19,20]. Um estudo recente demonstrou uma diminuição contínua e significativa da susceptibilidade *in vitro* dos parasitas às artemisininas desde o Bangladesh até ao Camboja [19] (**figura 3**).

Apesar da resistência às artemisininas não aparentar ainda ser um fenómeno epidemiológico generalizado, os casos encontrados merecem atenção e mais estudos uniformizados são necessários, em especial também em relação a outras espécies de *Plasmodium*. O problema parece ser isolado a esta zona geográfica e o resultado de pressões evolutivas, podendo eventualmente surgir casos esporádicos noutras zonas do mundo, possivelmente por mutações ocasionais. Planos de contingência estão a ser postos em prática nesta região [1], com o rápido e difundido tratamento com ACT, melhor controlo do vector, distribuição de redes de mosquiteiro impregnadas de insecticida, eliminação da monoterapia e campanhas de informação. No entanto, o estudo de Maude e colaboradores [30] defende o modelo matemático de “*Last Man Standing*”, baseado no ciclo de vida do parasita e resposta dos vários estádios ao tratamento com ACT e na dinâmica populacional humana, como a única forma de

eliminar a resistência às artemisininas antes que se espalhe pelo mundo. Segundo este modelo a implementação tratamento baseado em ACT poderia eliminar a malária por *P. falciparum* resistente às artemisininas do Camboja em aproximadamente 4 anos com a total erradicação da malária nessa zona. Contudo, à medida que a população parasitária declina, a proporção remanescente de parasitas (“*The last man standing*”) é cada vez mais resistente. Seria então crítico nesta altura assegurar a erradicação completa destes parasitas ou o problema da resistência agravaria, conduzindo a uma mais rápida difusão.

Conclusão

A falta de uniformidade dos estudos efectuados, com diferentes esquemas terapêuticos e diferentes formas de avaliar os resultados, torna difícil estabelecer uma comparação entre eles. Simultaneamente na avaliação destes estudos temos de ter presente muitos factores passíveis de enviesar os resultados como os factores inerentes aos hospedeiros, resistências aos fármacos parceiros e muito importante, a possibilidade de fármacos contrafeitos, tão frequentes no Sudeste Asiático. Não obstante estes aspectos, a OMS considera a evidência existente suficiente para definir que a resistência surgiu no Sudeste Asiático [1], contudo estudos uniformizados são necessários de forma a caracterizar melhor esta resistência e o seu grau de disseminação, sendo urgente definir um método preciso e reprodutível de avaliar a resistência às artemisininas.

As artemisininas aparentam poder continuar a ser uma forte arma terapêutica contra a malária mas para tal é fundamental que a comunidade internacional assegure rapidamente um exigente combate às monoterapias e terapêuticas contrafeitas, garanta o acesso universal ao diagnóstico da doença, monitorize a eficácia terapêutica e resistência eventuais e efectue o maior controlo possível do foco de resistência na Ásia de forma a poder contar com estes fármacos por muitos mais anos [1].

Referências

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION: World Malaria Report 2009. WHO 2009
2. CAMPBELL C.: Malaria Control – Addressing Challenges to Ambitious Goals. N Engl J Med 2009; 361 (5); 522-3
3. WORLD HEALTH ORGANIZATION: Guidelines for the treatment of Malaria. WHO, 2006
4. WHITE N.: Quinghaosu (Artemisinin): The price of sucess. Science 2008; 320; 330-4
5. WOITSH B., WERNSDORFER G., PRAJAKWONG S., et al.: Comparative study of the *in vitro* sensitivity of Plasmodium falciparum to artemisinin in two border areas of Thailand. Wien Klin Wochenschr 2004; 116 :35-40
6. HENGLIN Y., DEQUAN L., YARNING Y., et al: Changes in susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artesunate *in vitro* in Yunnan Province, China. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2003; 97; 226-8
7. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Malaria Control and Elimination: a report of a meeting on containment of artemisinin tolerance. WHO, 2008
8. GOLENSER J., WAKNINE J., KRUGLIAK M., HUNT N., GRAU G.: Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. Int J Parasitol 2006; 36; 1427 – 41
9. KRISHNAA S., WOODROWA C., STAINESA H., HAYNESB R., MERCEREAU-PUIJALONC O.: Re-evaluation of how artemisinins work in light of emerging evidence of *in vitro* resistance. Trends Mol Med. 2006; 12 (5): 200–5

10. ECKSTEIN-LUDWIG U., WEBB R., VAN GOETHEM I. et al.: Artemisinin target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2003; 424; 957-61
11. WALKER D., PITSCH J., PENG M., et al.: Mechanisms of Artemisinin Resistance in the Rodent Malaria Pathogen *Plasmodium yoelii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44 (2); 344-7
12. PETERS W., ROBINSON B.: The chemotherapy of rodent malaria. LVI. Studies on the development of resistance to natural and synthetic endoperoxides. *Ann Trop Med Parasitol*, 1999; 93 (4): 325-39
13. AFONSO A., HUNT P., CHEESMAN S., ALVES A. et al.: Malaria Parasites Can Develop Stable Resistance to Artemisinin but Lack Mutations in Candidate Genes *atp6* (Encoding the Sarcoplasmic and Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase), *tctp*, *mdr1*, and *cg10* *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50 (2): 480-9
14. JAMBOU E., LEGRAND E., NIANG M., et al.: Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet* 2006; 366: 1960-3
15. COJEAN S., HUBERT V., LES BRAS J., DURAND R. : Resistance to Dihydroartemisinin. *Emerg Infect Dis.*, 2007; 13 (5) : 808-9
16. WONGSRICHANALAI C., MESHNICK S.: Declining Artesunate-Mefloquine Efficacy against *Falciparum* Malaria on the Cambodia–Thailand Border. *Emerg Infect Dis.*, 2008; 14: 716-9
17. CARRARA V., ZWANG J., ASHLEY E., et al: Changes in the Treatment Responses to Artesunate-Mefloquine on the Northwestern Border of Thailand during 13 Years of Continuous Deployment. *Plos One*, 2009; 4 (2): e4551

18. NOEDL H., SE Y., SCHAECHER K., SMITH B., SOCHEAT D., FUKUDA M.:
Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia. *N Engl J Med*,
2008; 359 (24): 2619-2620
19. NOEDL H., SOCHEAT D., SATIMAI W.: Artemisinin-Resistant Malaria in
Ásia. *N Engl J Med*, 2009; 361 (5): 540-1
20. DONDORP A., NOSTEN F., YI P., et al.: Artemisinin Resistance in
Plasmodium falciparum Malaria. *N Engl J Med*, 2009; 361 (5): 455-467
21. UHLEMANN A., CAMERON A., ECKSTEIN-LUDWIG U., et al.: A single
amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinins. *Nat
Struct Mol Biol*, 2005; 12 (7): 628-630
22. PRICE N., UHLEMANN A., BROCKMAN A., et al.: Mefloquine resistance in
Plasmodium falciparum and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet*, 2004;
364; 438-47
23. FERREIRA I., LOPES D., MARTINELLI A., et al.: *In vitro* assessment of
artesunate, artemether and amodiaquine susceptibility and molecular analysis of
putative resistance associated mutations of *Plasmodium falciparum* from São
Tomé and Príncipe. *Trop Med Int Health*, 2007; 12 (3): 353-362
24. WOODROW C., KRISHNA S.: Antimalarial drugs: recent advances in
molecular determinants of resistance and their clinical significance. *Cell Mol
Life Sci*. 2006; 63: 1586–96
25. SIDHU A., VERDIER-PINARD D., FIDOCK D.: Chloroquine Resistance in
Plasmodium falciparum Malaria Parasites Conferred by *pfert* Mutations. *Science*
2002; 298: 210-3

26. SIDHU A., VALDERRAMOS S., FIDOCK D.: *pfmdr1* mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in *Plasmodium falciparum*. Mol Microbiol, 2005; 57 (4): 913-926
27. HUNT P., AFONSO A., CREASEY A., et al: Gene encoding a deubiquitinating enzyme is mutated in artesunate- and chloroquine-resistant rodent malaria parasites. Mol Microbiol, 2007; 65 (1): 27-40
28. ANDERSON T., NAIR S., QING H., et al: Are Transporter Genes Other than the Chloroquine Resistance Locus (*pfcr1*) and Multidrug Resistance Gene (*pfmdr1*) Associated with Antimalarial Drug Resistance? Antimicrob Agents Chemother, 2005; 49 (6): 2180-8
29. EGAN J.: Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*: can the genie be put back in the bottle? Future Microbiol, 2009; 4 (6): 637-9
30. MAUDE R., PONTAVORNPINYO W., SARALAMBA S., et al: The last man standing is the most resistant: eliminating artemisinin-resistant malaria in Cambodia. Malar J, 2009; 8; 31

Figura 1 – Estruturas químicas da artemisinina e seus derivados

R: = O, artemisinina; R: β O-CH₃, artemeter; R: β O-C₂H₅, artemotil (arteeter);

R: α CO(CH₂)₂COO, artesunato.

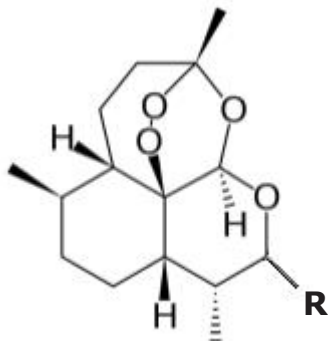


Tabela I – Estudos em animais

Referência	Espécie de Plasmodium	Tipo de resistência
Walker et al., 2000 [11]	<i>Plasmodium yoelii</i>	Instável
Peters et al., 1999 [12]	<i>Plasmodium berghei</i> , <i>Plasmodium yoelii</i>	Instável
Afonso et al., 2006 [13]	<i>Plasmodium chaubadi chaubadi</i>	Estável e transmissível

Tabela II – Estudos com humanos

Referência	Origem das amostras, ano	Fármaco utilizado	Sensibilidade <i>in vitro</i>	Sensibilidade <i>in vivo</i>
Woitsch et al., 2004 [5]	N=227 Mae Hong Son e Mae Sot, Tailândia, 1999 - 2001	Dihidroartemisinina (DHA)	Média geométrica de IC ₅₀ entre 1999 e 2001 em Mae Hong Son 9,20nmol/L e em Mae Sot 11,18 nmol/L. Diferença entre as localidades estatisticamente significativa em 2000 (p<0.05) e 2001 (p<0.01)	
Henglin et al., 2003 [6]	N=75 China, 1988 - 1999	Artesunato	IC ₅₀ artesunato em 1988: 6,2 nmol/L; em 1992 7,2 nmol/L; em 1999 20,7 nmol/L	
Jambou et al., 2005 [14]	N=535 Cambodja, 2001; Senegal, 2001; Guiana Francesa, 2002-2003	Artesunato Artemeter	Média geométrica de IC ₅₀ do artesunato no Cambodja: 1,25 nmol/L, mínimo 0,05, máximo 18 nmol/L. Média geométrica de IC ₅₀ de artemeter na Guiana Francesa: 2 nmol/L, mínimo 0,2, máximo 117 nmol/L. Média geométrica de IC ₅₀ do artesunato no Senegal: 1,3 nmol/L, mínimo 0,1, máximo 44,7 nmol/L.	

Cojean et al, 2006 [15]	N=397	Camarões, Costa do Marfim, Mali, Ilhas Comores, Senegal; 2004-2006	Dihidroartemisinina	Média de IC ₅₀ para a DHA 1,31 nmol/L, 6 isolados > 10nmol/L, valor máximo registado 31,8 nmol/L	
Denis et al., 2006 [16]	N=70	Pailin, Cambodja, 2002	Artesunato ≈ 12mg/kg por 3 dias + Mefloquina ≈ 20mg/kg no dia 0		Seguimento de 28 dias. 85,7% de eficácia terapêutica (avaliada segundo os critérios do protocolo da OMS [3]; excluídos casos de reinfeção por PCR)
Vijaykadga et al., 2006 [16]	N=44	Trat, Cambodja, 2003	Artesunato 12mg/kg por 2 dias+ Mefloquina 25mg/kg no dia 0		Seguimento de 28 dias. 78,6% de eficácia terapêutica (avaliada segundo os critérios do protocolo da OMS [3])
Denis et al., 2006 [16]	N=58	Pailin, Cambodja, 2004	Artesunato 12mg/kg por 3 dias + Mefloquina 25mg/kg no dia 0		Seguimento de 42 dias. 79,3% de eficácia terapêutica (avaliada segundo os critérios do protocolo da OMS [3]; excluídos casos de reinfeção por PCR)
Carrara et al., 2009 [17]	N=3264	Tailândia, 1995 - 2007	Artesunato 12mg/kg por 3 dias + Mefloquina 25mg/kg	1179 amostras analisadas. Média geométrica IC ₅₀ artesunato em 1995: 6,47 nmol/L; em 2007: 4,19nmol/L	Seguimento de 42-63 dias. Tempo de depuração parasitária (avaliado em 98,6% dos casos): 95,5% aparasitêmicos ao 2º dia antes de 2001 (p<0,001); 78,1% entre 2001 e 2007. Ao 3º dia 99,8% antes de 2001, 95,9% após (p<0,001).

					Eficácia terapêutica ao dia 42 de seguimento: 96,5% em 2007 (CI, 91,0 – 98,7%)*
Noedl et al., 2008 [18]	N=60	Cambodja, 2006 - 2007	Artesunato 4mg/kg durante 7 dias		Seguimento de 28 dias. 2 doentes com reemergencia da parasitemia entre 21° e 28° dia, tempo de depuração parasitária prolongado (133 e 95h, comparando com a média de 52,2h) e concentração plasmática de DHA adequada.
Dondorp et al., 2009 [20]	N=80	Pailin, Cambodja e Wang Pha, Tailandia; 2007 - 2008	40 doentes: Artesunato 4mg/kg durante 3 dias + Mefloquina 25mg/kg 40 doentes: Artesunato 2mg/kg durante 7 dias	Média geométrica IC ₅₀ de artesunato em Pailin: 1,9nmol/L (1,3 – 3,4); em Wang Pha: 3,2 nmol/L (1,7 – 4,1) Média geométrica IC ₅₀ de DHA em Pailin: 2,3 nmol/L (1,1 – 3,2) ; em Wang Pha 1,5 nmol/L (0,7 – 2,2)	Seguimento de 63 dias. Depuração parasitária: Pailin – 73% dos doentes com parasitemia às 48h de follow-up, 55% às 72h e 20% às 96h. Wang Pha – 45% às 48h, 8% às 72h e 3% às 96h (p<0,001) Eficácia terapêutica ao dia 63 de seguimento: 95% em Pailin, superior em Wang Pha (avaliada segundo os critérios do protocolo da OMS [3])

*Ausência de infecção recorrente (presença das formas assexuais do parasita no esfregaço sanguíneo entre 5 e 45 dias de seguimento) ou infecção recrudescente (diferenciada de nova infecção através de genotipagem).

Figura 2 – Tempo de depuração parasitária e IC₅₀ de Dihidroartemisinina. Círculos laranja assinalam os doentes classificados como tendo infecção resistente às artemisininas; quadrados azuis assinalam os doentes com falência terapêutica mas não classificados como resistentes (reproduzido de Noeld et al [18]).

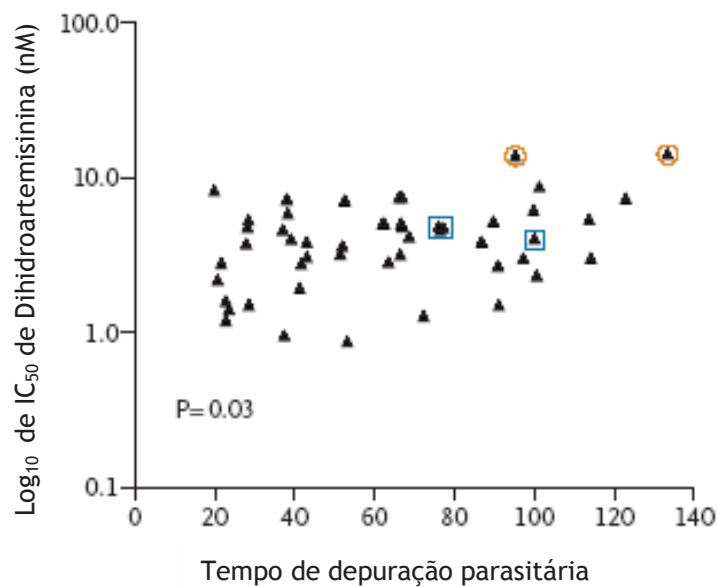


Tabela III - Gene *pfatp6*

Referência	Tipo de estudo	Polimorfismos
Jambou et al. [14], 2005	<i>In vivo</i>	S769N Mutação dupla E431K A623E
Cojean et al. [15], 2006	<i>In vivo</i>	H243Y, S769N
Noedl et al. [18], 2008	<i>In vivo</i>	Sem polimorfismos
Dondorp et al. [20], 2009	<i>In vivo</i>	I89T, N465S, E847K
Uhlemann et al., [21], 2005	Estudo laboratorial	L263E
Price et al. [22], 2004	<i>In vivo</i>	I89T
Ferreira et al. [23], 2007	<i>In vivo</i>	T2694A

Tabela IV - Gene *pfcr1*

Referência	Tipo de estudo	Polimorfismos
Afonso et al. [13], 2006	Estudo laboratorial	Sem polimorfismos
Dondorp et al. [20], 2009	<i>In vivo</i>	K76T
Ferreira et al. [23], 2007	<i>In vivo</i>	N75E, K76T
Bir Singh et al. [25], 2002	Estudo laboratorial	K76I

Tabela V – Gene *tctp*

Referência	Tipo de estudo	Polimorfismos/Nº de cópias
Walker et al., [11], 2000	Estudo laboratorial	Aumento do número de cópias
Afonso et al. [13], 2006	Estudo laboratorial	Sem alterações no número de cópias nem polimorfismos
Jambou et al. [14], 2005	<i>In vivo</i>	Sem polimorfismos
Ferreira et al. [23], 2007	<i>In vivo</i>	Sem alterações no número de cópias nem polimorfismos

Tabela VI – Gene *pfmdr1*

Referência	Tipo de estudo	Nº de cópias / Polimorfismos
Krishna et al. [9], 2006	<i>In vivo</i>	Aumento número de cópias do gene.
Afonso et al. [13], 2006	Estudo laboratorial	Sem alterações no número de cópias. Sem polimorfismos identificados
Jambou et al. [14], 2005	<i>In vivo</i>	N86Y, Y184F, I1009I, S1034S, N1042D, D1246Y
Noedl et al. [18], 2008	<i>In vivo</i>	Sem alterações no número de cópias. Sem polimorfismos identificados
Dondorp et al. [20], 2009	<i>In vivo</i>	Aumento do número de cópias do gene Y184F
Price et al. [22], 2004	<i>In vivo</i>	Aumento do número de cópias do gene. S1034C, N1042D
Woodrow et al., [24], 2006	<i>In vivo</i>	N86Y, Y184F, S1034C, N1042D, D1246Y
Sidhu et al. [26], 2005	Estudo laboratorial	N1042D
Hunt et al. [27], 2007	Estudo laboratorial	Sem polimorfismos identificados.

Figura 3 – Sensibilidade *in vitro* à dihidroartemisinina no Bangladesh, Tailândia Ocidental, Tailândia Oriental e Cambodja [reproduzido de Noedl et al [19]; incluídos 247 doentes com malária por *P. falciparum* não complicada]

