

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”

UNGRANRIO

ANA BEATRIZ BATISTA RODRIGUES

**INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *K13* ASSOCIADAS À
QUIMIORRESISTÊNCIA DO *PLASMODIUM FALCIPARUM* À ARTEMISININA
EM ÁREAS ENDÊMICAS ANGOLANAS**

RIO DE JANEIRO

2020

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”
UNGRANRIO

ANA BEATRIZ BATISTA RODRIGUES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza
Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Maria de Fátima Ferreira da Cruz.

RIO DE JANEIRO

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE/BIBLIOTECA - UNIGRANRIO

- R696i Rodrigues, Ana Beatriz Batista.
Investigação de mutações no gene k13 associadas à quimiorresistência do plasmodium falciparum à artemisinina em áreas endêmicas angolanas. / Ana Beatriz Batista Rodrigues. – 2020.
19 f.: il. ; 31 cm.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação em Biomedicina) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciências da Saúde, Duque de Caxias, 2020.
“Orientadora: Prof^a. : Maria de Fátima Ferreira da Cruz.”.
Bibliografia: f. 14.
1. Biomedicina. 2. Genética 3. Malária. 4. Marcadores. I. Cruz, Maria de Fátima Ferreira da. II.. Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”. III. Título.

CDD – 610.28

ANA BEATRIZ BATISTA RODRIGUES

**INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *K13* ASSOCIADAS À
QUIMIORRESISTÊNCIA DO *PLASMODIUM FALCIPARUM* À ARTEMISININA
EM ÁREAS ENDÊMICAS ANGOLANAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza
Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Maria de Fátima Ferreira da Cruz.

Aprovada em:

Barra da Tijuca, _____ de _____ de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. _____ (orientador)

Prof.

Prof.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo ao Laboratório de Pesquisa em Malária, pela oportunidade de realizar esse trabalho incrível ao lado de pessoas tão maravilhosas, onde tive a chance de iniciar a minha carreira de pesquisadora e me apaixonar ainda mais pela biologia molecular.

A minha orientadora Maria de Fátima, pela oportunidade de compor a equipe dela, pela paciência, carinho e todo o aprendizado.

A Aline Lavigne e Rebecca Abreu, pela parceria de trabalho, paciência, amizade e por me ensinarem tanto.

Aos meus colegas de Laboratório, pela rotina descontraída de trabalho, pelo companheirismo, vocês dão vida ao lugar, em especial: Aline Lavigne, Carolina Blanco, Juliana Lemos e Rebecca Abreu.

Ao Dr. Cláudio Tadeu, pela oportunidade e todo o ensinamento.

Aos meus pais: Ana Paula e Roberto, a minha irmã Ana Carolina por todo apoio, incentivo durante essa jornada e por sempre me encorajarem a seguir meus sonhos.

Minhas colegas da graduação, Bruna Maia, Camila Moura, Gabriela Habl, Mirella Maturano, por fazerem ser tão fluída, leve e divertida, foi uma honra passar esses quatro anos com vocês.

Ao meu melhor amigo, Isaac Oliveira por ser tudo que ele é, obrigada por sempre se fazer presente, por acreditar em mim, eu não tenho palavras para agradecer você.

Meus amigos e familiares, por serem sempre tão extraordinários, por todo apoio durante todos esses anos.

Ao Daniel Reynaldo, Natália de Moraes e Raquel Chaves, por irem muito além da sala de aula, por me mostrarem todas as vertentes da biomedicina, fazendo com que eu me apaixonasse por ela, meu muitíssimo obrigada pela amizade, paciência e pelo companheirismo nesses quatro anos, espero me tornar uma profissional competente e de excelência assim como vocês.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAs - Aminoácidos

ACT - Terapia combinada com artemisinina

ART – Artemisinina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

Km – Quilômetro

LPM - Laboratório de Pesquisa em Malária

mL - Mililitro

MS – Ministério da Saúde

MINSa - Ministério de Saúde de Angola

OMS – Organização Mundial da Saúde

Pmol – Picomol

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RART – Resistência à artemisinina

SP – Sulfadoxina – pirimetamina

SNPs – single nucleotide polymorphism / polimorfismo de um único nucleotídeo

µL – Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrativo do ciclo biológico do <i>P. falciparum</i>	3
Figura 2: Representação do modelo tridimensional da proteína Kelch 13 do <i>P. falciparum</i>	4
Figura 3: Mapa do continente Africano.....	6
Figura 4: Eletroferograma das sequencias analisadas para o gene <i>pfk13</i>	11

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs / single nucleotide polymorphism) no gene <i>k13</i> associados a quimiorresistência do <i>P. falciparum</i> à artemisinina.	8
Tabela 2: Frequência dos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs / single nucleotide polymorphism) no gene <i>k13</i> em isolados de Huambo, Angola.	10
Tabela 3: Haplótipos dos polimorfismos no gene <i>pfK13</i> em isolados de Huambo/Angola.	11

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. METODOLOGIA	5
2.1 Casuística e Área endêmica.....	5
2.2 Aspectos Éticos	6
2.3 Diagnóstico	7
2.4 Extração de DNA e amplificação	7
2.5 Revelação dos resultados e Sequenciamento de DNA alvo	7
2.6 Polimorfismos no gene <i>pfk13</i>	8
2.7 Análise das sequencias.....	9
3. RESULTADOS	9
4. DISCUSSÃO.....	12
5. CONCLUSÃO	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14

INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *K13* ASSOCIADAS A QUIMIORRESISTÊNCIA DO *PLASMODIUM FALCIPARUM* À ARTEMISININA EM ÁREAS ENDÊMICAS ANGOLANAS

Ana Beatriz Batista Rodrigues¹

Maria de Fátima Ferreira da cruz²

RESUMO

A malária é problema de saúde pública. A resistência do *P. falciparum* aos fármacos, se tornou generalizada desde 1970, minando os esforços para o controle da malária e revertendo os ganhos na sobrevivência infantil. Por isso, a OMS recomenda o monitoramento da quimiorresistência e apoia os países no fortalecimento de esforços nesta área. Atualmente, a artemisinina (ART) é o antimalárico de primeira linha para as infecções pelo *P.falciparum*. Assim, a resistência à ART (RART) é uma preocupação, porque ela inutilizaria a primeira linha de prevenção e tratamento. A África responde por 93% dos casos de malária e 94% das mortes. Por isso, investigamos mutações alvo associadas à RART no gene *pfk13* em parasitos de regiões angolanas. Para esse fim foram sequenciadas 78 amostras de *P. falciparum* de Huambo. Identificamos as mutações R471R e A578S. A R471R, é uma mutação sinônima na qual não ocorre mudança do aminoácido. A A578S é uma mutação não sinônima, altera o aminoácido e, portanto, com potencial de estar associada à RART. Estudos são necessários para se elucidar se a mutação A578S é resultante de um surgimento independente ou se ela é proveniente de outras áreas endêmicas. Embora, poucos casos de resposta tardia ao tratamento com ART foram relatados na África, o potencial do surgimento de parasitos de *P.falciparum* resistentes à ART não pode ser desconsiderado. Dessa maneira, esforços devem ser canalizados para a melhor compreensão do envolvimento da A578S na RART e para a contínua investigação de mutações preditoras de RART.

Palavras-chave: Malária. *Plasmodium falciparum*. Marcadores moleculares. *pfk13*. Resistência artemisinina.

¹ Graduanda do curso de Biomedicina na Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO.

² Doutora em Microbiologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

ABSTRACT

Malaria is a public health problem. The resistance of *P. falciparum* to previous generations of drugs, became widespread during the 1970s and 1980s, undermining efforts to control malaria and reversing gains in child survival. For this reason, WHO recommends routine monitoring of resistance to antimalarial drugs. Currently, artemisinin (ART) is the first-line drug for *P.falciparum* infections. Thus, resistance to ART (ARTR) is a concern for several countries, because it would lead to a worst-case scenario, rendering treatment with ART unusable. Africa accounts for 93% of all malaria cases and 94% of deaths. Thus, we investigated the presence of target mutations associated with ARTR in the *pfk13* gene in parasites from Angola. For this purpose, 78 samples of *P. falciparum* from Huambo patients were diagnosed and parasite DNA sequenced. We identified the R471R and A578S. R471R, is a synonymous mutation in which there is no change in the amino acid, whereas A578S is a non-synonymous mutation, it changes the translated amino acid and, therefore, associated with ARTR. Further studies are needed to clarify whether the A578S mutation in this location is the result of an independent emergence or if it came from other endemic areas. Although few cases of late response to ART treatment have been reported in Africa, the potential for the emergence of ARTR *P.falciparum* parasites cannot be overlooked. Thus, efforts should be directed towards a better understanding of the involvement of A578S SNP in artemisinin resistance and for the continuous investigation of QR predictive mutations to ART.

Keywords: Malária. *Plasmodium falciparum*. Molecular marker. *pfk13*. Artemisinin resistance.

1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença de notificação obrigatória, causada por um protozoário do gênero *Plasmodium* e é transmitida pela picada da fêmea infectada e infectante de mosquitos do gênero *Anopheles* (MIRABELLO; CONN, 2006). Estima-se que existam cerca de 100 espécies de *Plasmodium* mas, entre elas, somente seis infectam o homem: *P. malariae* (LAVERAN, 1881), *P. vivax* (GRASSI; FELETTI, 1890), *P. falciparum* (WELCH, 1897) - citados por COX (2010), *P. ovale* (STEPHENS, 1922), *P. knowlesi* (WHITE, 2008) e *P. cynomolgi* (TA *et al.*, 2014).

As primeiras referências à malária já apareciam em textos médico-religiosos da antiguidade, e essas febres sazonais eram relacionadas à uma punição divina. Hipócrates foi o primeiro a descartar tais superstições pela observação de que a presença de corpos d'água estagnados estava relacionada com o aparecimento de febres na população local. Os romanos também faziam esta associação e foram os pioneiros na drenagem de pântanos. No século XIV a doença passou a ser descrita pelos italianos como malária - resultante da palavra "*mal aria*" para ar insalubre. De forma semelhante, os franceses criaram o termo "paludismo", cuja raiz significa pântano, para se referir à malária. A forma adotada nas Américas para esta endemia foi malária, que permanece como a universalmente aceita até os dias de hoje.

A sintomatologia apresentada pelos pacientes compreende episódios de febre, calafrios e sudorese, além de outros sintomas menos característicos. A aparição dos sintomas decorre do ritmo do ciclo eritrocítico que é inerente de cada espécie infectante e reflete o sincronismo da ruptura das hemácias pelos esquizontes (FRANCA *et al.*, 2008).

A malária continua sendo um problema de saúde pública mundial, afetando as populações mais vulneráveis da África, América do sul, Central e Ásia (PHILLIPS *et al.*, 2017). O *P. falciparum* e o *P. vivax* são as espécies mais prevalentes. O *P. falciparum* é o mais letal por promover uma infecção que pode evoluir para formas graves, devido a formação de *knobs* / "novelos", decorrentes da capacidade de hemácias infectadas se aderirem às células vasculares endoteliais, às plaquetas e às hemácias não infectadas criando, assim, um fenótipo adesivo que causa obstrução microvascular (MILNER, 2018; MANUAL MSD, 2017; BAIRD, 2013). Esta citoaderência de hemácias infectadas por estágios maduros causa sequestro na

microvasculatura de vários órgãos resultando no comprometimento da perfusão tecidual, na acidose láctica e nos danos aos órgãos atingidos (ZEKAR; SHARMAM., 2020).

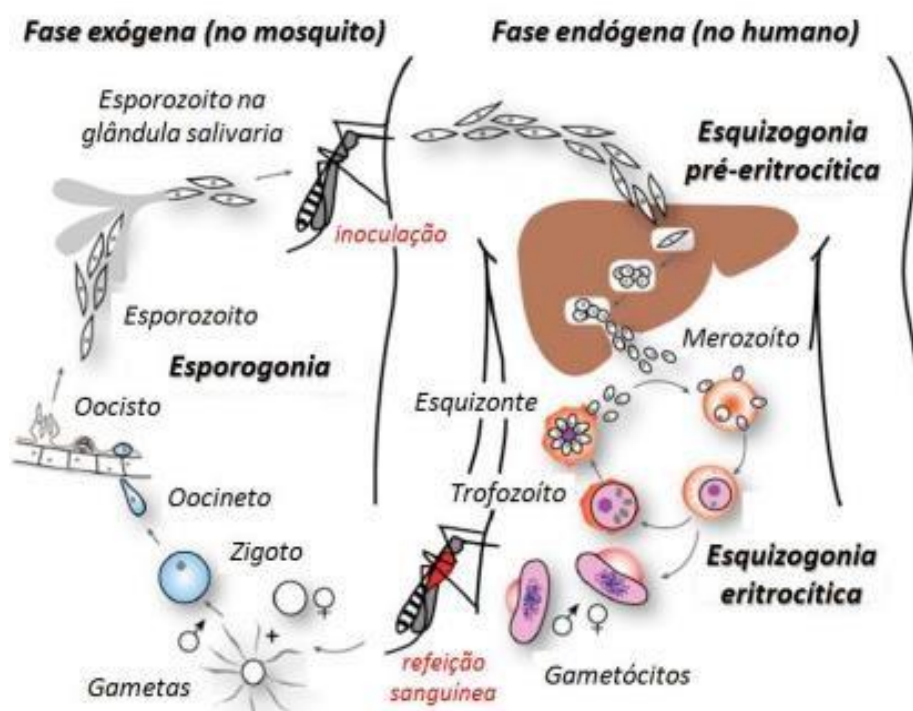
Em 2018, registrou-se 228 milhões de casos de malária em todo o mundo, sendo 93% desses na região africana. O *P. falciparum* é a espécie responsável pelo maior índice de mortes, principalmente, na África subsaariana onde a doença nunca conseguiu ser controlada (ONU, 2019). Nesse mesmo ano, estimou-se 405.000 mortes por malária no mundo, sendo crianças menores de 5 anos de idade o grupo de risco mais vulnerável, o que corresponde à 67% de todas as mortes por malária no mundo (WHO, 2019).

A infecção humana se inicia quando a fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* infectada e infectante realiza seu repasto sanguíneo e inocula juntamente com a sua saliva as formas infectantes, chamados esporozoítos durante a sua alimentação. Logo que os esporozoítos atingem a circulação periférica, migram para o fígado no qual iniciam o estágio pré-eritrocítico (AMINO *et al.*, 2007). Esse processo é extremamente rápido, cerca de 30 minutos após a infecção, devido a excelente capacidade de motilidade dos esporozoítos.

Nos hepatócitos ocorre a primeira replicação do parasito. Os merozoítos evadem os hepatócitos através de vesículas: merossomos (VAUGHAN *et al.*, 2008). Após a infecção no fígado, os hepatócitos infectados se rompem liberando os merozoítos na corrente sanguínea. Os merozoítos invadem os glóbulos vermelhos nos quais se desenvolvem até o estágio de anel (trofozoíta jovem) que, após amadurecimento, se transformam em trofozoítos que originam os esquizontes que ao se romperem liberam merozoítos na circulação que irão reinfectar novos eritrócitos e perpetuar o ciclo. A liberação de merozoítos na circulação periférica marca o início da sintomatologia. A primeira ruptura e invasão é silenciosa na maioria dos pacientes infectados, mas, à medida que o ciclo assexuado se repete nos eritrócitos, no período de 24-48 horas, e a parasitemia aumenta a sintomatologia vai se tornando expressiva e sincronizada (CDC, 2018). Uma pequena proporção de parasitos no estágio sanguíneo se desenvolve em estágios sexuais chamados gametócitos que atingem a derme, podendo ser ingeridos pelo mosquito vetor. Após a fertilização e o desenvolvimento do parasito no mosquito, que é chamado de ciclo esporogônico e acontece no intestino médio, os microgametas penetram nos macrogametas gerando

os zigotos. Os zigotos, por sua vez, tornam-se móveis e alongados – oocinetos - invadem a parede intestinal do mosquito na qual se desenvolvem em oocistos. Os oocistos crescem, rompem e liberam esporozoítos, que chegam às glândulas salivares do mosquito, permitindo a transmissão para o hospedeiro humano, por ocasião do repasto sanguíneo (Figura 1). A duração do ciclo eritrocítico depende da espécie do parasito; no caso do *P. falciparum* é de 48 horas (MILNER, 2018).

Figura 1: Esquema ilustrativo do ciclo biológico do *P. falciparum*.



Ciclo biológico do *P. falciparum* demonstrando as fases no hospedeiro invertebrado e no hospedeiro vertebrado. Fonte: ESCOBAR et al., 2014.

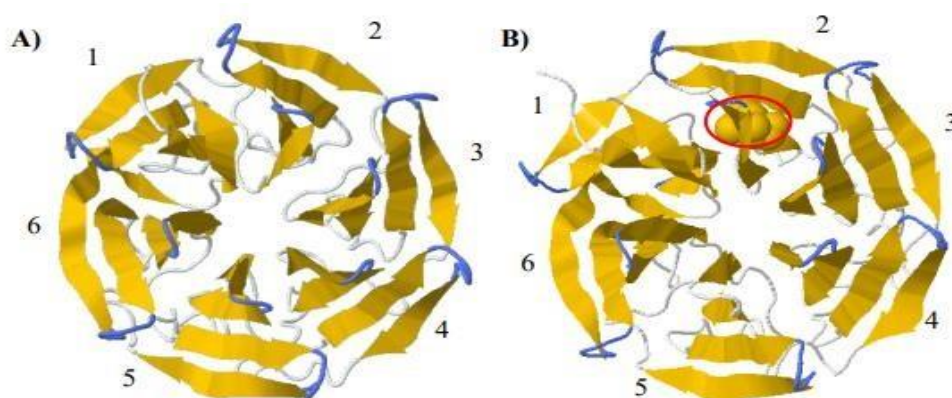
Para interromper a transmissão do *P. falciparum* o tratamento deve ser rapidamente instituído para curar o paciente, e eliminar os estágios sexuais e assexuais do sangue e impedir a propagação dos parasitos pelos mosquitos (MEIBLAN; MARTI. 2017). Dessa maneira, o controle da doença depende, enormemente, da disponibilidade e do uso adequado de medicamentos antimaláricos eficazes, o que torna a resistência aos antimaláricos um sério obstáculo (FAIRHURST; DONDORP, 2016). A resistência do *P. falciparum* às gerações anteriores de medicamentos, como a cloroquina e a sulfadoxina-pirimetamina (SP) generalizou-se nas décadas de 1950 e 1960 e, desde aí, a resistência à outras drogas alternativas foram sendo cada vez mais frequentemente relatadas. Atualmente, a

artemisinina (ART) é a única droga eficaz disponível para a terapia da malária. Contudo, em 2008 no Camboja, casos de *P. falciparum* resistente à ART foram reportados e, desde então, essa resistência continuou a espalhar-se pelo sudeste da Ásia (ARIEY *et al.*, 2013). Por conseguinte, em 2013, foi lançado pela OMS uma proposta de emergência relacionada à resistência à artemisinina (RART), cujo plano tinha como principal objetivo conter a disseminação de parasitos resistentes, notadamente, para os países africanos onde 93% dos casos de malária falciparum ocorrem.

Nesse contexto, a implementação de ações imediatas voltadas para a eliminação da malária até 2030, inclui intervenções prioritárias direcionadas para às áreas do Mekong - onde a malária multirresistente ocorre - e ações voltadas para a vigilância do aparecimento de populações de parasitos de *P. falciparum* RART, em áreas endêmicas da África, das Américas do Sul e Central e do Caribe (OMS, 2020).

Como já exposto, a resistência do *P. falciparum* à ART representa uma ameaça as ações de controle e eliminação da malária no mundo. Mutações no domínio da hélice K13, notadamente a identificada no continente asiático como C580Y (MATHIEU *et al.*, 2020), estão associadas à RART *in vitro* e *in vivo*. O *pfkelch13* (*k13*) codifica uma proteína de 726 aminoácidos (AAs) que consiste em uma região N-terminal específica do *Apicomplexa* com três domínios bastantes conservados: um que compreende os AAs 212– 341, outro os AAs 350-437 e um outro que corresponde a uma hélice C-terminal *Kelch-repeat* e compreende os AAs 443-726, que abriga a grande maioria dos alelos *pfk13* associados à RART (COPPÉE *et al.*, 2019) (Figura 2).

Figura 2: Representação do modelo tridimensional da proteína Kelch 13 do *P. falciparum*.



A) Estrutura tridimensional da proteína Kelch 13 (*k13*); B) Estrutura tridimensional da proteína K13 com polimorfismos assinalados em vermelho. Fonte: ESCOBAR., 2014.

O *P. falciparum* é o parasito mais presente no continente Africano e é o que apresenta maior ameaça por sua alta morbiletalidade, podendo levar ao óbito 24 horas a partir do aparecimento dos primeiros sintomas se o paciente não for tratado, sendo responsável por 94% das mortes por malária neste continente (WHO, 2019). Consequentemente, é de vital importância o rastreamento de parasitos mutantes resistentes à ART porque esta é a única droga eficiente disponível para o tratamento da malária falciparum.

Em vista do exposto, este trabalho tem como objetivo investigar a presença de mutações no gene *k13* do *P. falciparum* em parasitos provenientes de regiões endêmicas angolanas. Afim de alcançá-lo, a estratégia utilizada compreenderá: a amplificação por PCR *nested* convencional da sequência alvo de DNA do gene *k13* em parasitos de *P. falciparum*; o sequenciamento dos amplicons para investigar a presença de mutações associadas a RART e, por fim, a comparação dos resultados com os descritos na literatura.

2. METODOLOGIA

Esse trabalho experimental compreenderá um estudo descritivo de dados qualitativos epidemiológicos e moleculares.

2.1 Casuística e Área endêmica

Um total de 214 amostras de sangue de indivíduos moradores em Huambo, Angola, foram coletadas por pesquisadores do Ministério de Saúde de Angola (MINSA), em 2017, e levadas ao Laboratório de Pesquisa em Malária (LPM) do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, por pesquisadores do Ministério de Saúde de Angola, em 2017, para diagnóstico da malária e investigação da resistência do *P. falciparum* à ART. Huambo é uma cidade e um município de Angola, que é capital da província (estado) de mesmo nome. Segundo as projeções populacionais de 2018, elaboradas pelo Instituto Nacional de Estatística, conta com uma população de 815.685 habitantes e área territorial de 2.609 km², sendo o mais populoso município da província e o sétimo mais populoso do país. Após ter grande parte de sua infraestrutura destruída pela guerra, pode recuperar-se economicamente após a paz, em 2002. Localizado no Planalto Central de Angola, o município registra altitudes acima de 1.774 metros. O clima é caracterizado por verões húmidos e mornos, com

noites amenas e dias relativamente quentes e invernos secos com dias amenos e noites relativamente frias. A cidade de Huambo fica distante de Luanda - a capital de Angola – de 513 Km em linha reta (Figura 3). Em 2017, em apenas 2 meses, dezenas de milhar de casos de malária afetaram o funcionamento dos hospitais em Huambo frente a falta de leitos para atender os doentes (CAETANO, 2017).

Figura 3: Mapa do continente Africano



Continente Africano, com ilustração de localizador evidenciando a província de Huambo. Adaptado de: MAPYSTICS., 2017.

2.2 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do MINSA, no contexto de uma colaboração do Instituto Nacional de Saúde Pública de Angola, Ministério da Saúde de Angola (MINSA) com o LPM, Fiocruz.

2.3 Diagnóstico

Foi realizado PCR para o diagnóstico da malária falciparum, segundo Zalis *et al.*, (1996) e da malária vivax, segundo Almeida-de-Oliveira *et al.*, (2019). Nenhuma coinfeção falciparum/vivax foi observada e 19 casos de *P.vivax* foram detectados.

2.4 Extração de DNA e amplificação

A extração de DNA foi feita utilizando-se o *QIAamp*® *DNA blood midi kit* (*Qiagen*) a partir de 1 mL de sangue total, segundo as instruções do fabricante. A amplificação do gene *k13* seguiu protocolo já padronizado (ARIEY *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2018), utilizando-se os seguintes *primers* / iniciadores: K13 F: 5' CGG AGT GAC CAA ATC TGG GA 3' e K13 R: 3' GGG AAT CTG GTG GTA ACA GC 5' o K13 N_ F: 5' GCC AAG CTG CCA TTC ATT TG 3' e o K13 N_R: 3' GCC TTG TTG AAA GAA GCA GA 5' .

2.5 Revelação dos resultados e Sequenciamento de DNA alvo

Os amplicons foram aplicados em géis de agarose 2% corados com Brometo de Etídio, para análise após eletroforese. A visualização para estimar o tamanho dos amplicons e registro das bandas foi feito no fotodocumentador *Multidoc-It digital Imaging System*® (*UVP*). Os amplicons foram purificados com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), segundo as instruções do fabricante.

A reação de sequenciamento foi realizada com os mesmos *primers* utilizados na amplificação na concentração de 3,2 pmol/μL, de acordo com o protocolo recomendado pelo kit *BigDye*® *Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* versão 3.1. O sequenciamento de DNA plasmodial foi realizado no equipamento ABI *PRISM DNA Analyzer 3730* (*Applied Biosystems*) da plataforma genômica PDTIS/Fiocruz.

2.6 Polimorfismos no gene *pfk13*.

As mutações associadas à RART examinadas estão ilustradas na Tabela 1.

Tabela 1: Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs / single nucleotide polymorphism) no gene *k13* associados a quimiorresistência do *P. falciparum* à artemisinina.

Polimorfismos no Gene <i>Pfk13</i>			
Códon ¹	Localizador ²	Pf3D7 ³	Sítios Polimórficos ⁴
F446 <u>I</u>	CCATTAGTA	TTT	<u>A</u> TT
G449 <u>A</u>	TTTTGTATA	GGT	G <u>C</u> T
N458 <u>Y</u>	GAATATTTA	AAT	T <u>A</u> T
R471 <u>R</u>	ATGCTGGCG	CGT	A <u>G</u> A
T474 <u>I</u>	CGTATGTGT	ATG	AT <u>A</u>
M476 <u>I</u>	TGTACACCT	ATG	AT <u>A</u>
A481 <u>V</u>	ACCAAAAAA	GCT	G <u>I</u> T
Y493 <u>H</u>	AATTTCTTA	TAC	<u>C</u> AC
T508 <u>N</u>	TTATTTGAA	ACT	A <u>A</u> T
P527 <u>I</u>	TTAAATATA	CCT	<u>A</u> CT
G533 <u>S</u>	AATAATTGT	GGT	<u>A</u> GT
N537 <u>I</u>	GTTACGTCA	AAT	A <u>I</u> T
R539 <u>I</u>	TCAAATGGT	AGA	A <u>C</u> A
I543 <u>T</u>	ATTTATTGT	ATT	A <u>C</u> T
P553 <u>L</u>	TCTATTATA	CCG	C <u>I</u> G
R561 <u>H</u>	TATGATCAT	CGT	C <u>A</u> T
V568 <u>G</u>	TGGGTAGAG	GTG	G <u>G</u> G
P574 <u>L</u>	TTGAATACC	CCT	C <u>I</u> T
A578 <u>S</u>	AGATCATCA	GCT	<u>I</u> CT
M579 <u>I</u>	CAATGCTGG	ATG	AT <u>A</u>
C580 <u>Y</u>	TCAGCTATG	TGT	T <u>A</u> T
D584 <u>V</u>	GTTGCTTTT	GAT	G <u>I</u> T
E612 <u>D</u>	AATAAATGG	GAA	GAT <u>I</u>
Q613 <u>E</u>	AAATGGGAA	CAA	<u>G</u> AA
S623 <u>C</u>	GAAGCTAGA	AGT	<u>I</u> GT

¹ A primeira letra representa o aminoácido selvagem correspondente à sequência referência Pf3D7 e a última, em negrito e sublinhado, ao aminoácido mutado.

² Sequência nucleotídica utilizada para encontrar o códon de interesse

³ Cepa referência Pf3D7.

⁴ Os caracteres em vermelho, negrito e sublinhado representam as substituições nucleotídicas nos isolados.

2.7 Análise das sequencias

A investigação das mutações alvo foi feita concomitantemente nos softwares NovoSNP ® e Bioedit® para garantir análises mais acuradas, utilizando a cepa 3D7 de *P. falciparum* (PF3D7_1343700) como a de referência.

3. RESULTADOS

Entre as 214 amostras coletadas em Huambo (Angola) e enviadas ao Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, o diagnóstico molecular mostrou que 78 eram positivas para *P. falciparum* e 19 para *P. vivax*. Dentre as positivas para *P. falciparum*, todas amplificaram para o gene *pfk13* e 66 delas foram sequenciadas com sucesso. Um total de 25 sítios polimórficos (Tabela 1) foram examinados. O polimorfismo sinônimo R471R esteve presente em 8 (12%) dos isolados e o polimorfismo não sinônimo A578S em apenas 1 (1,5%) das amostras (Figura 4). Todos os demais códons não apresentaram mutação (Tabela 2).

Tabela 2: Frequência dos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs / single *nucleotide polymorphism*) no gene *k13* em isolados de Huambo/Angola.

Códons¹	pf3D7²	Sítios Polimórficos³	Frequência de mutação N (%)
F446 <u>I</u>	TTT	<u>A</u> TT	0
G449 <u>A</u>	GGT	G <u>C</u> T	0
N458 <u>Y</u>	AAT	T <u>A</u> T	0
R471 <u>R</u>	CGT	A <u>G</u> A	8 (12%)
T474 <u>I</u>	ATG	AT <u>A</u>	0
M476 <u>I</u>	ATG	AT <u>A</u>	0
A481 <u>V</u>	GCT	G <u>I</u> T	0
Y493 <u>H</u>	TAC	<u>C</u> AC	0
T508 <u>N</u>	ACT	A <u>A</u> T	0
P527 <u>T</u>	CCT	<u>A</u> CT	0
G533 <u>S</u>	GGT	<u>A</u> GT	0
N537 <u>I</u>	AAT	A <u>I</u> T	0
R539 <u>I</u>	AGA	A <u>C</u> A	0
I543 <u>T</u>	ATT	A <u>C</u> T	0
P553 <u>L</u>	CCG	C <u>I</u> G	0
R561 <u>H</u>	CGT	C <u>A</u> T	0
V568 <u>G</u>	GTG	G <u>G</u> G	0
P574 <u>L</u>	CCT	C <u>I</u> T	0
A578 <u>S</u>	GCT	<u>I</u> CT	1 (1,5%)
M579 <u>I</u>	ATG	AT <u>A</u>	0
C580 <u>Y</u>	TGT	T <u>A</u> T	0
D584 <u>V</u>	GAT	G <u>I</u> T	0
E612 <u>D</u>	GAA	GAT <u>I</u>	0
Q613 <u>E</u>	CAA	<u>G</u> AA	0
S623 <u>C</u>	AGT	<u>I</u> GT	0

¹A primeira letra representa o aminoácido correspondente a sequência referência pf3D7 e a última, em negrito e sublinhado, o aminoácido mutado.

² Cepa referência Pf3D7.

³ Os caracteres em vermelho, negrito e sublinhado representam as substituições nucleotídicas nos isolados.

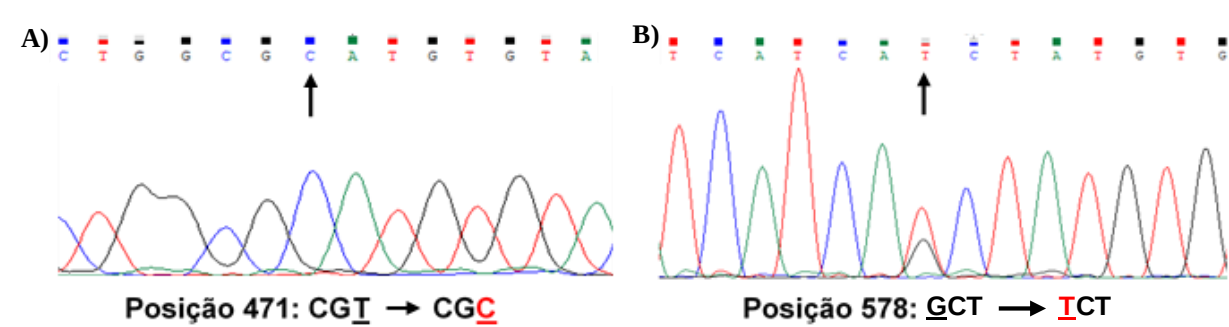
Dentre as 66 amostras, 59 (89%) apresentaram um perfil haplotípico idêntico ao da cepa referência (FGNRTMAYTPGNRIPRVAMPAMCDEQS) denominado T0. No decorrer das análises dos haplótipos da hélice *P. falciparum* *k13*, outros dois perfis de haplótipos (R471R, A578S) correspondendo, respectivamente, aos perfis T1 e T2 também foram identificados. O perfil T1 foi detectado em 7 (11%) dos isolados, enquanto o T2 em 1 (1,5%) isolado, como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3: Haplótipos dos polimorfismos no gene *pfK13* em isolados de Huambo/Angola.

Haplótipo	Perfil	Frequência
T0 ¹	FGNRTMAYTPGNRIPRVAMPAMCDEQS	59 (89%)
T1 ²	FGN <u>R</u> TMAYTPGNRIPRVAMPAMCDEQS	7 (11%)
T2 ³	FGN <u>R</u> TMAYTPGNRIPRV <u>S</u> MCDEQS	1 (1,5%)

¹ Haplótipo referente a sequência Pf3D7.
² O caractere em negrito e sublinhado representa uma mutação sinônima, demonstrando um haplótipo com uma única mutação.
³ O caractere em negrito e sublinhado representa uma mutação sinônima e em vermelho com negrito, a mutação não sinônima, demonstrando um haplótipo duplo mutante.

Figura 4: Eletroferograma das sequências analisadas para o gene *pfk13*.



A) Amostra representando a mutação na posição R471R; B) Amostra representando a mutação na posição A578S. As setas indicam a posição da mutação na sequência nucleotídica e os caracteres em vermelho e sublinhado correspondem as substituições nucleotídicas nos isolados de Huambo, África.

4. DISCUSSÃO

Em nosso trabalho, nos direcionamos para investigação das 25 mutações descritas na Tabela 1 (ARIEY *et al.*, 2014; MÉNARD *et al.*, 2016; MVUMBI *et al.*, 2017; WWARN., 2019; ZHOU *et al.*, 2019). Da análise das sequências de DNA dos 66 isolados do *P. falciparum* de Huambo, detectamos uma mutação não sinônima - A578S - e uma sinônima - R471R.

A mutação R471R já foi previamente descrita em Angola em isolados de *P. falciparum* das províncias de Malanje e Luanda, após a introdução da ART. Há relatos, também de sua presença em outros dois países da África Ocidental, na República Democrática do Congo e no Gabão (ESCOBAR *et al.*, 2015). Entretanto, até o momento não existem dados que respaldem a associação de mutações não sinônimas com a quimiorresistência à ART (HUANG *et al.*, 2015).

A mutação não sinônima A578S também já foi reportada em isolados de *P.falciparum* africanos como os do Comore , Quênia, Uganda (HUANG *et al.*, 2015), Gana, Congo, Kinshasa, Gabon, Libreville, Ghana, Ashanti, Navrongo, Kenya, Kisumu, Mali, Bougoula, Faladje e Tororo (MAÏGA-ASCOFARÉ O., MAY J., 2016), além de em isolados de *P.falciparum* asiáticos do sul de Bangladesh e do Camboja (HUANG *et al.*, 2015). Esses achados mostram que tais mutações na hélice K13 de parasitos de *P. falciparum* têm uma distribuição global. No entanto, mais estudos são necessários para se elucidar se a presença da mutação A578S nesta localidade é resultante de um surgimento independente ou se ela foi proveniente de outras áreas endêmicas.

O papel da mutação A578S no gene *k13* como marcador na emergência da resistência à ART na África tem sido sugerido considerando que este polimorfismo está localizado 2 AAs antes do C580Y, que é uma mutação crítica associada à 87% da falha ao tratamento com ART no Sudeste asiático, e que ambas as mutações levam a troca de um AA não polar neutro por 1 AA polar neutro (MAÏGA-ASCOFARÉ O., MAY J., 2016).

Adicionalmente, dados de modelagem computacional e previsões de *Mutational Sensitivity*, sugerem que o SNP A578S pode interromper a função original da hélice K13 e causar atraso na eliminação do parasito (ZAW *et al.*, 2016).

Estudos adicionais poderão responder se a mutação A578S é o indício precursor do fenótipo de resistência à ART a exemplo da108N que é a mutação inicial que ocorre em parasitos resistentes à pirimetanina (KAINGONA-DANIEL *et al.*, 2016).

5. CONCLUSÃO

Em resposta aos antimaláricos pode ocorrer a seleção de polimorfismos não sinônimos na região hélice do *pfk13*, que poderiam favorecer a sobrevivência e fixação do parasito frente a concentrações terapêuticas de ART. A sobrevivência dos parasitos mutantes seria, portanto, resultante da adaptação à um ambiente de estresse oxidativo, como o gerado pela ação das ART. Esta vantagem seletiva refletiria, por exemplo, no aumento do tempo de eliminação da parasitemia.

Até o momento, poucos casos de resposta tardia ao tratamento com ART foram relatados na África. Porém, como o potencial do surgimento de parasitos de *P. falciparum* resistentes à ART no continente africano não pode ser desconsiderado, esforços devem ser canalizados para a melhor compreensão do envolvimento do A578S SNP na RART e para a contínuo rastreamento de mutações preditoras de QR à ART visando a identificação precoce de parasitos resistentes, antes do aparecimento do fenótipo de resistência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA-DE-OLIVEIRA NK, MOREIRA OC, DE LAVIGNE AR, MENDONÇA-LIMA L, WERNECK GL, DANIEL-RIBEIRO CT, FERREIRA-DA-CRUZ MF. **Analytical validation of real-time quantitative PCR assays for optimum diagnosis of vivax malaria.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2019;114:e180350. doi: 10.1590/0074-02760180350.

AMINO R, THIBERGE S, BLAZQUEZ S, BALDACCI P, RENAUD O, SHORTE S, MÉNARD R. **Imaging malaria sporozoites in the dermis of the mammalian host.** *Nat Protoc.* 2007;2(7):1705-12. doi: 10.1038/nprot.2007.120. PMID: 17641635.

ARIEY, F., WITKOWSKI, B., AMARATUNGA, C., BEGHAIN, J., LANGLOIS, A. C., KHIM, N., KIM, S., DURU, V., BOUCHIER, C., MA, L., LIM, P., LEANG, R., DUONG, S., SRENG, S., SUON, S., CHUOR, C. M., BOUT, D. M., MÉNARD, S., ROGERS, W. O., GENTON, B., ... MÉNARD, D. (2014). **A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria.** *Nature*, 505(7481), 50–55. <https://doi.org/10.1038/nature12876>

BRASIL P, ZALIS MG, DE PINA-COSTA A, SIQUEIRA AM, JÚNIOR CB, SILVA S, AREAS ALL, PELAJO-MACHADO M, DE ALVARENGA DAM, DA SILVA SANTELLI ACF, ALBUQUERQUE HG, CRAVO P, SANTOS DE ABREU FV, PETERKA CL, ZANINI GM, SUÁREZ MUTIS MC, PISSINATTI A, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R, DE BRITO CFA, DE FÁTIMA FERREIRA-DA-CRUZ M, CULLETON R, DANIEL-RIBEIRO CT. **Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation.** *Lancet Glob Health.* 2017 Oct;5(10):e1038-e1046. doi: 10.1016/S2214-109X(17)30333-9. Epub 2017 Aug 31. PMID: 28867401.

BAIRD JK. **Evidence and implications of mortality associated with acute *Plasmodium vivax* malaria.** *Clin Microbiol Rev.* 2013 Jan;26(1):36-57. doi: 10.1128/CMR.00074-12. PMID: 23297258; PMCID: PMC3553673.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **About Malaria** – Biology, 2018. Disponível:<<https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html#tabs-1-3>>. Acesso em: 15 maio, 2020.

COPPÉE R, JEFFARES DC, MITEVA MA, SABBAGH A, CLAIN J. **Comparative structural and evolutionary analyses predict functional sites in the artemisinin resistance malaria protein K13**. Sci Rep. 2019 Jul 23;9(1):10675. doi: 10.1038/s41598-019-47034-6. PMID: 31337835; PMCID: PMC6650413.

CAETANO, Fernando. **Quase cem mil casos de malária em dois meses no Huambo**. 2017. Disponível em: <https://www.voaportugues.com/a/quase-cem-mil-casos-de-malaria-em-dois-meses-no-huambo/4162382.html>. Acesso em: 16 out. 2020.

COX, E. G. **History of the discovery of the malaria parasites and their vectors**. *Parasites & Vectors* 2010, 3:5

ESCOBAR, C. G. **Estudo de polimorfismos no gene que codifica a proteína kelch K13, um marcador de resistência às artemisininas, em Moçambique e Angola**. Universidade Nova de Lisboa Instituto de Higiene e Medicina Tropical Mestrado em Saúde e Desenvolvimento; 2014.

ESCOBAR C, PATEIRA S, LOBO E, LOBO L, TEODOSIO R, DIAS F, FERNANDES N, AREZ AP, VARANDAS L, NOGUEIRA F. **Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* K13-propeller in Angola and Mozambique after the introduction of the ACTs**. PLoS One. 2015 Mar 19;10(3):e0119215. doi: 10.1371/journal.pone.0119215. PMID: 25789669; PMCID: PMC4366227.

FAIRHURST, R. M., & DONDORP, A. M. (2016). **Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* Malaria**. *Microbiology spectrum*, 4(3), 10.1128/microbiolspec.EI10-0013-2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EI10-0013-2016>

FRANCA, TANOS C. C.; SANTOS, MARTA G. DOS; FIGUEROA-VILLAR, JOSÉ D.. **Malária: Historical aspects and chemotherapy. Quím. Nova**, São Paulo , v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008. doi: 10.1590/S0100-40422008000500060.

GOMES LR, LAVIGNE A, PETERKA CL, BRASIL P, MÉNARD D, DANIEL-RIBEIRO CT, FERREIRA-DA-CRUZ MF. **Absence of K13 Polymorphism in *Plasmodium falciparum* from Brazilian Areas Where the Parasite Is Endemic.** Antimicrob Agents Chemother. 2018 Sep 24;62(10):e00354-18. doi: 10.1128/AAC.00354-18. PMID: 30061292; PMCID: PMC6153804.

HUANG B, DENG C, YANG T, XUE L, WANG Q, HUANG S, SU XZ, LIU Y, ZHENG S, GUAN Y, XU Q, ZHOU J, YUAN J, BACAR A, ABDALLAH KS, ATTOUMANE R, MLIVA AM, ZHONG Y, LU F, SONG J. **Polymorphisms of the artemisinin resistant marker (K13) in *Plasmodium falciparum* parasite populations of Grande Comore Island 10 years after artemisinin combination therapy.** Parasit Vectors. 2015 Dec 15;8:634. doi: 10.1186/s13071-015-1253-z. PMID: 26667053; PMCID: PMC4678476.

MAÏGA-ASCOFARÉ O, MAY J. **Is the A578S Single-Nucleotide Polymorphism in K13-propeller a Marker of Emerging Resistance to Artemisinin Among *Plasmodium falciparum* in Africa?** J Infect Dis. 2016 Jan 1;213(1):165-6. doi: 10.1093/infdis/jiv414. Epub 2015 Aug 12. PMID: 26268852.

MAPYSTICS. **Average schooling males:** mapystics maps attract an information savvy audience from around the world. connect with our global audience by running ad(s) on our interactive map(s). 2017. Disponível em: <https://mp.mapystics.com/?id=mp002238>. Acesso em: 13 out. 2020.

MATHIEU LC, COX H, EARLY AM, MOK S, LAZREK Y, PAQUET JC, ADE MP, LUCCHI NW, GRANT Q, UDHAYAKUMAR V, ALEXANDRE JS, DEMAR M, RINGWALD P, NEAFSEY DE, FIDOCK DA, MUSSET L. **Local emergence in Amazonia of *Plasmodium falciparum* k13 C580Y mutants associated with *in vitro* artemisinin resistance.** Elife. 2020 May 12;9:e51015. doi: 10.7554/eLife.51015. PMID: 32394893; PMCID: PMC7217694.

MEIBALAN E, MARTI M. **Biology of Malaria Transmission**. Cold Spring Harb Perspect Med. 2017 Mar 1;7(3):a025452. doi: 10.1101/cshperspect.a025452. PMID: 27836912; PMCID: PMC5334247.

MÉNARD, D. *et al.* A **Worldwide Map of *Plasmodium falciparum* K13-Propeller Polymorphisms**. *New England Journal of Medicine* 374, 2453–2464 (2016).

MILNER DA JR. **Malaria Pathogenesis**. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018 Jan 2;8(1):a025569. doi: 10.1101/cshperspect.a025569. PMID: 28533315; PMCID: PMC5749143.

MIRABELLO L, CONN JE. **Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America**. *Heredity* (Edinb). 2006 Apr;96(4):311-21. doi: 10.1038/sj.hdy.6800805. Erratum in: *Heredity*. 2006 Dec;97(6):438. PMID: 16508661.

MVUMBI, D. M., BOBANGA, T. L., KAYEMBE, J. N., MVUMBI, G. L., SITUAKIBANZA, H. N., BENOIT-VICAL, F., MELIN, P., DE MOL, P., & HAYETTE, M. P. (2017). **Molecular surveillance of *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin-based combination therapies in the Democratic Republic of Congo**. *PloS one*, 12(6), e0179142. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179142>

ONU. Organização das Nações Unidas. **Malária contaminou 228 milhões e matou 405 mil pessoas no ano passado**. 2019. Disponível em: <https://news.un.org/pt/story/2019/12/1696561>. Acesso em: 22 out. 2020.

PHILLIPS MA, BURROWS JN, MANYANDO C, VAN HUIJSDUIJNEN RH, VAN VOORHIS WC, WELLS TNC. **Malaria**. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Aug 3;3:17050. doi: 10.1038/nrdp.2017.50. PMID: 28770814.

REVANKAR, S. G., & SOBEL, J. D. **Manual MSD - Versão para Profissionais de Saúde** - Malária. Merck Sharp & Dohme Corp., 2018, 7–10. Retrieved from <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/profissional/doencas-infecciosas/malaria#>.

***Plasmodium ovale* Stephens**, 1922. *Ind Med Gaz.* 1932 Nov;67(11):630-631. PMID: 29011039; PMCID: PMC5231810.

TA TH, HISAM S, LANZA M, JIRAM AI, ISMAIL N, RUBIO JM. **First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi***. *Malar J.* 2014 Feb 24;13:68. doi: 10.1186/1475-2875-13-68. PMID: 24564912; PMCID: PMC3937822.

VAUGHAN, A. M., ALY, A. S., & KAPPE, S. H. (2008). **Malaria parasite pre-erythrocytic stage infection: gliding and hiding**. *Cell host & microbe*, 4(3), 209–218. doi:10.1016/j.chom.2008.08.010

WHITE NJ. ***Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite**. *Clin Infect Dis.* 2008 Jan 15;46(2):172-3. doi: 10.1086/524889. PMID: 18171246.

WHO | **Eliminating malaria**. Who. World Health Organization, 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/malaria>>. Acesso em: 23 abril.2020.

WHO. World Health Organization. **Regional and global trends in burden of malaria cases and deaths**. Regional Office for Africa. 2020 Disponível em:<<https://www.afro.who.int/news/malaria-vaccine-launched-kenya-kenya-joinsghana-and-malawi-roll-out-landmark-vaccine-pilot>>. Acesso em: 15 maio 2020.

WHO. **World Malaria Report**. 2019. ISBN 978 92 4 156469 4.

WWARN K13 Genotype-Phenotype Study Group., AMARATUNGA, C., ANDRIANARANJAKA, V.H. *et al.* **Association of mutations in the *Plasmodium falciparum* Kelch13 gene (Pf3D7_1343700) with parasite clearance rates after artemisinin-based treatments—a WWARN individual patient data meta-analysis.** *BMC Med* **17**, 1 2019. <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1207-3>

KAINGONA-DANIEL, E. P., GOMES, L. R., GAMA, B. E., ALMEIDA-DE-OLIVEIRA, N. K., FORTES, F., MÉNARD, D., DANIEL-RIBEIRO, C. T., & FERREIRA-DA-CRUZ, M. (2016). **Low-grade sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* parasites from Lubango, Angola.** *Malaria journal*, *15*, 309. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1358-7>

ZALIS MG, FERREIRA-DA-CRUZ MF, BALTHAZAR-GUEDES HC, BANIC DM, ALECRIM W, SOUZA JM, DRUILHE P, DANIEL-RIBEIRO CT. Malaria diagnosis: standardization of a polymerase chain reaction for the detection of ***Plasmodium falciparum* parasites in individuals with low-grade parasitemia.** *Parasitol Res.* 1996;82(7):612-6. doi: 10.1007/s004360050173. PMID: 8875568.

ZAW MT, EMRAN NA, LIN Z. **Updates on k13 mutant alleles for artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*.** *J Microbiol Immunol Infect.* 2018 Apr;51(2):159-165. doi: 10.1016/j.jmii.2017.06.009. Epub 2017 Jun 29. PMID: 28711439.

ZEKAR L, SHARMAN T. ***Plasmodium falciparum* Malaria.** [Updated 2020 Oct 1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555962/>

ZHOU, R., YANG, C., LI, S., ZHAO, Y., LIU, Y., QIAN, D., WANG, H., LU, D., ZHANG, H., & HUANG, F. (2019). **Molecular surveillance of drug resistance of *Plasmodium falciparum* isolates imported from Angola in Henan Province, China.** *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *63*(10), e00552-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00552-19>