



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS Á HEMATOLOGIA



**CLAREAMENTO PARASITÁRIO DE *Plasmodium falciparum* EM RESPOSTA AO
TRATAMENTO COM ARTEMISININA**

RAQUEL DE MEDEIROS PINTO

MANAUS

2020

RAQUEL DE MEDEIROS PINTO

**CLAREAMENTO PARASITÁRIO DE *Plasmodium falciparum* EM RESPOSTA AO
TRATAMENTO COM ARTEMISININA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *em Ciências Aplicadas à Hematologia* da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, para a obtenção do grau de Mestre em Hematologia.

Orientadora: Prof^a. Simone Schneider Weber
Co-orientador: Prof^o Wuelton Marcelo Monteiro

MANAUS
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

P659c Pinto, Raquel de Medeiros
Clareamento Parasitário de Plasmodium falciparum
em resposta ao tratamento com Artemisinina / Raquel de
Medeiros Pinto. Manaus : [s.n], 2018.
80 f.: color.; 29 cm.

Dissertação - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à
Hematologia - Universidade do Estado do Amazonas,
Manaus, 2018.
Inclui bibliografia
Orientador: Simone Schneider Weber
Coorientador: Wuelton Marcelo Monteiro

1. Malária. 2. Resistência. 3. Artemisinina. 4.
Plasmodium. I. Simone Schneider Weber (Orient.). II.
Wuelton Marcelo Monteiro (Coorient.). III. Universidade
do Estado do Amazonas. IV. Clareamento Parasitário de
Plasmodium falciparum em resposta ao tratamento com
Artemisinina

Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463

FOLHA DE JULGAMENTO

CLAREAMENTO PARASITÁRIO DE *Plasmodium falciparum* EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ARTEMISININA

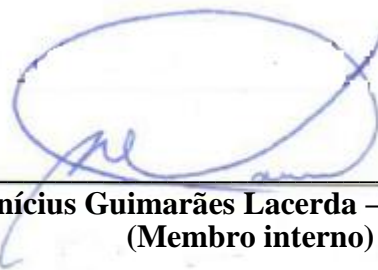
RAQUEL DE MEDEIROS PINTO

“Esta Dissertação foi julgada adequada para aprovação do Exame de Qualificação do programa de Mestrado em Ciências Aplicadas à Hematologia, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas”

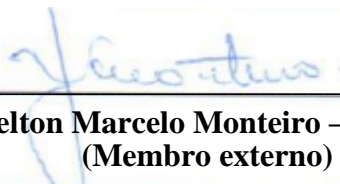
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Simone Schneider Weber – ICET-UFAM
Presidente



Prof. Dr. Marcus Vinícius Guimarães Lacerda – FIOCRUZ-AM/ FMT-HVD
(Membro interno)



Prof. Dr. Wuelton Marcelo Monteiro – FMT-HVD/ UEA
(Membro externo)

DEDICATÓRIA

A Deus que me sustenta, me guia e me guarda e minha família por todo amor, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Professora Doutora Simone Schneider Weber pela dedicação, ensinamentos, orientação e por me instigar a dar o meu melhor. Sou grata por toda sua paciência, principalmente nos momentos difíceis, muitíssimo obrigada!

Ao Professor Doutor Wuelton Marcelo Monteiro que me acolheu, que me ensinou, e está contribuindo grandemente na minha caminhada no mundo da pesquisa clínica. Muitíssimo obrigada!

Ao Professor Doutor Marcus Lacerda por ter me acolhido no laboratório de Malária, por seus ensinamentos e pela oportunidade de trabalhar em ensaio clínico e me mostrar que o mundo da pesquisa é algo fantástico. Muito obrigada!

Ao Professor Doutor Albert Nicolaus Schireifer pela disponibilidade e colaboração com seus conhecimentos, científicos e seu incentivo. Agradeço imensamente!

Aos meus familiares, obrigada por serem meu porto seguro.

A todos os colegas do mestrado, obrigada pelo companheirismo, cumplicidade e suporte em todas as horas. Cada um tem um lugar especial no meu coração.

Às meninas do LabGen, vcs fizeram parte deste trabalho, cada dado compilado tem um pouco de cada uma de vocês, continuem crescendo e lutando porque esse grupo vai longe!

Ao Seminário Laveran&Deane sobre Malária, continuem com esse trabalho inovador que contribuiu grandemente com meu crescimento científico e pessoal.

Ao HEMOAM, por todo o suporte, compreensão e cuidado nos detalhes desta caminhada. Em especial ao Prof. Dr. Nelson Fraiji por ser o maior incentivador desse programa de mestrado e à Wilmara por ser um ombro amigo e nos ajudar nos momentos de dificuldades.

EPÍGRAFE

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais retorna ao seu tamanho original”*

(Albert Einstein)

RESUMO

No Brasil, a resistência do *Plasmodium falciparum* a várias drogas, como cloroquina, sulfadoxina-pirimetamina, mefloquina, quinina e amodiaquina é relatada. A vigilância da sensibilidade dos plasmódios a antimaláricos é de grande importância para a conduta terapêutica, bem como para o planejamento de políticas de controle da malária. Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza a terapia combinada de artemisinina (ACT) como primeira escolha para todos os casos de malária em áreas onde o *P. falciparum* predomina. No presente estudo, foi analisada uma coorte de pacientes atendidos em uma unidade terciária de Manaus, com diagnóstico positivo para malária por *P. falciparum* através da gota espessa, sob tratamento com derivados da artemisinina (artesanato, artesunato/mefloquina, artemeter, artemeter/mefloquina) e acompanhados ao longo de 35 dias após o tratamento, visando avaliar o perfil de clareamento parasitário. As variáveis avaliadas foram: data do atendimento, sexo, idade, tipo de tratamento, número de leucócitos, leucometria, parasitemia sexuada e assexuada (D0) e nos dias de seguimento (D1-D7, D14, D21, D28 e D35). Análises de sobrevivência (AS) e regressão logística (RL) serão realizadas para verificar associações entre clareamento parasitário e tipo de tratamento. Para a análise de regressão, o desfecho avaliado será o tempo de clareamento parasitário em D3 e D4, enquanto para a análise de sobrevivência, a variável analisada será o tempo até o clareamento. Portanto a estimativa do clareamento parasitário nos fornece um método consistente, confiável e pode ser utilizado para detectar os primeiros sinais de resistência emergente para derivados de artemisinina e outros compostos utilizados no tratamento. Os resultados obtidos poderão servir de base para estudos futuros referentes aos polimorfismos genéticos associados à diminuição do tempo de clareamento do parasito nas Américas.

Palavras Chaves: Malária, resistência, artemisinina, *Plasmodium*.

ABSTRACT

In Brazil, *Plasmodium falciparum* resistance to several drugs, such as chloroquine, sulfadoxine-pyrimethamine, mefloquine, quinine and amodiaquine is reported. The monitoring of the sensitivity of *Plasmodium* to antimalarial drugs is of great importance for the therapeutic management and planning of malaria control policies. Currently, the World Health Organization (WHO) recommends Artemisinin-based combination therapy (ACT) as first-line for all cases of malaria in areas where *P. falciparum* predominates. In the present study, we analyzed a cohort of patients treated in a tertiary center of Manaus, with positive diagnosis of *P. falciparum* malaria by thick blood under treatment with artemisinin derivatives (artesunate, artesunate / mefloquine, artemether, artemether / mefloquine) and followed over 35 days after treatment to evaluate the parasitic whitening profile. The variables evaluated were: date of service, gender, age, type of treatment, number of leukocytes, white blood cell count, sexual and asexual parasitaemia (D0) and day follow-up (D1-D7, D14, D21, D28 and D35). Survival analysis (AS) and logistic regression (LR) will be conducted to examine associations between parasitic and whitening treatment. For regression analysis, the outcome will be assessed parasitic whitening time in D3 and D4, while the survival analysis, the variable analyzed is the time to bleaching. Therefore the estimate of parasite clearance method provides a consistent, reliable and can be used to detect early signs of emerging resistance to artemisinin derivatives and other compounds used in treatment. The results could form the basis for future studies related to genetic polymorphisms associated with decreased of parasite clearance time in the Americas.

Keywords: malaria, resistance, artemisinin, *Plasmodium*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. % de países sob risco de infecção por malária.....	01
Figura 2. Mapa da Malária nas Américas.....	02
Figura 3. Mapa de risco de transmissão da malária no Brasil	03
Figura 4. Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i>	04
Figura 5. Forma evolutiva do <i>P. falciparum</i> - Gametócito	05
Figura 6. Estrutura química da Artemisinina e seus derivados	10

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais antimaláricos.....	07
------------------------------------------------	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

ATO	= Artesunato
ACT	= Terapia combinada à base de artemisinina
AS	= Análise de Sobrevivência
AT	= Arteméter
AT+MF	= Arteméter + Mefloquina
ATO	= Artesunato
ATO+MF	= Artesunato + Mefloquina
FMT-HVD	= Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado
K13	= <i>Kelch 13</i>
MS	= Ministério da Saúde
<i>P. falcipaum</i>	= <i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Pfdhfr</i>	= <i>Plasmodium falciparum</i> di-hidrofolato redutase
<i>Pfdhps</i>	= <i>Plasmodium falciparum</i> di-hidropteroato sintetase
<i>P. malarie</i>	= <i>Plasmodium malarie</i>
<i>P. vivax</i>	= <i>Plasmodium vivax</i>
SP	= Sulfadoxina-pirimetamina
RL	= Regressão Logística

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Considerações Gerais	15
1.2 Ciclo Biológico do <i>Plasmodium spp</i>	3
1.3 A espécie <i>P. falciparum</i>	5
1.4 Antimaláricos	6
1.4.1 Resistência do <i>P. falciparum</i> aos antimaláricos	7
1.5 Artemisinina e seus derivados	9
1.5.1 Diminuição do Clareamento Parasitário.....	11
1.5.2 Resistência à artemisinina e seus derivados	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Local do estudo	17
3.2 Desenho do estudo.	17
3.3 Base de dados do estudo.....	17
3.4 Análise Estatística	18
4 RESULTADOS	20
5 CONCLUSÕES E CONTRIBUIÇÕES	49
6 RESULTADOS OBTIDOS DURANTE O MESTRADO	51
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
8 ANEXO.....	60L

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

A malária é uma infecção parasitária, cujos agentes etiológicos são protozoários do gênero *Plasmodium*, transmitidos pela picada da fêmea do mosquito anofelino. Cinco espécies podem causar malária nos seres humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi* (1). É uma doença que está intimamente ligada à situação socioeconômica do país, sendo, portanto, reconhecida como um grave problema de saúde pública (2).

Conforme dados do “*World Malaria Report 2015*”, da Organização Mundial de Saúde (OMS) 91 países ao redor do mundo estão sob risco de infecção por malária (**Figura 1**). Em 2015, foram reportados 214 milhões de casos de malária no mundo, 88% deles na África. O número global de mortes atribuídas à doença foi de 438 mil, sendo que 90% dessas mortes ocorreram no continente africano. As crianças com idade inferior a 5 anos foram as mais afetadas, representando um total de 292 mil crianças. Neste continente a malária mata 1 criança a cada 2 minutos (1).

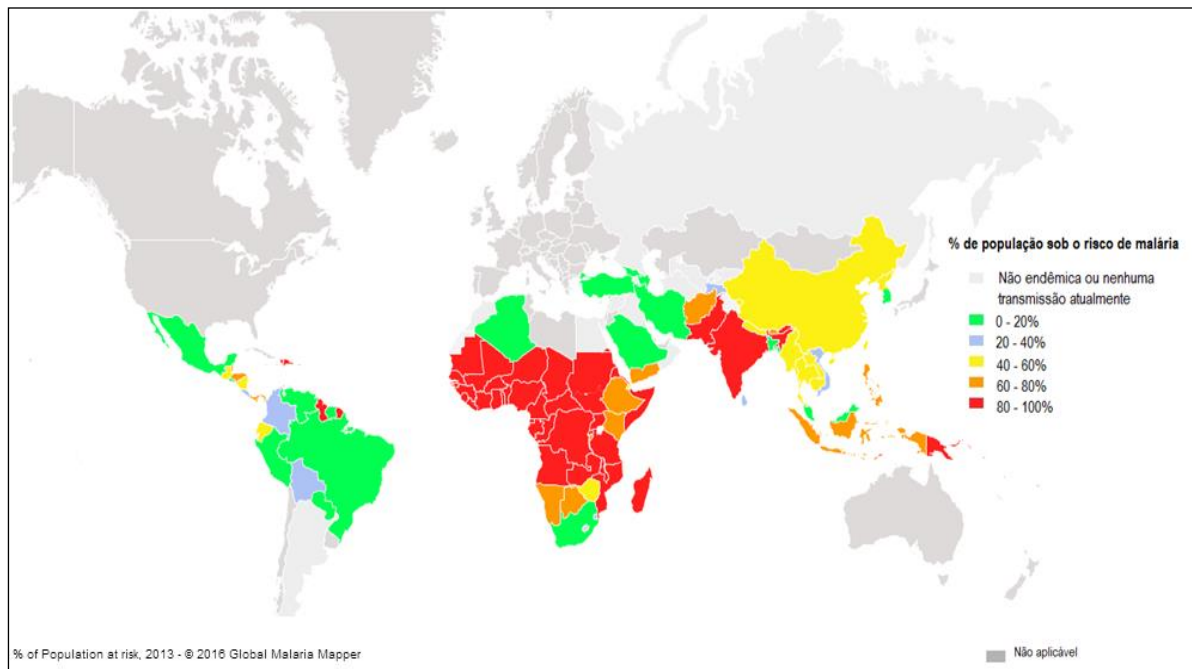


Figura 1. % de países sob risco de infecção por malária, 2013. Evidenciando a ocorrência concentrada principalmente no continente africano e sudeste da Ásia. Adaptado de Global Malaria Mapper (3).

Nas Américas a malária ocorre em 21 países, sendo predominante na América do Sul, onde 4 países (Brasil, Colômbia, Venezuela e Peru) são responsáveis por mais de 70% dos casos (**Figura 2**) (4).

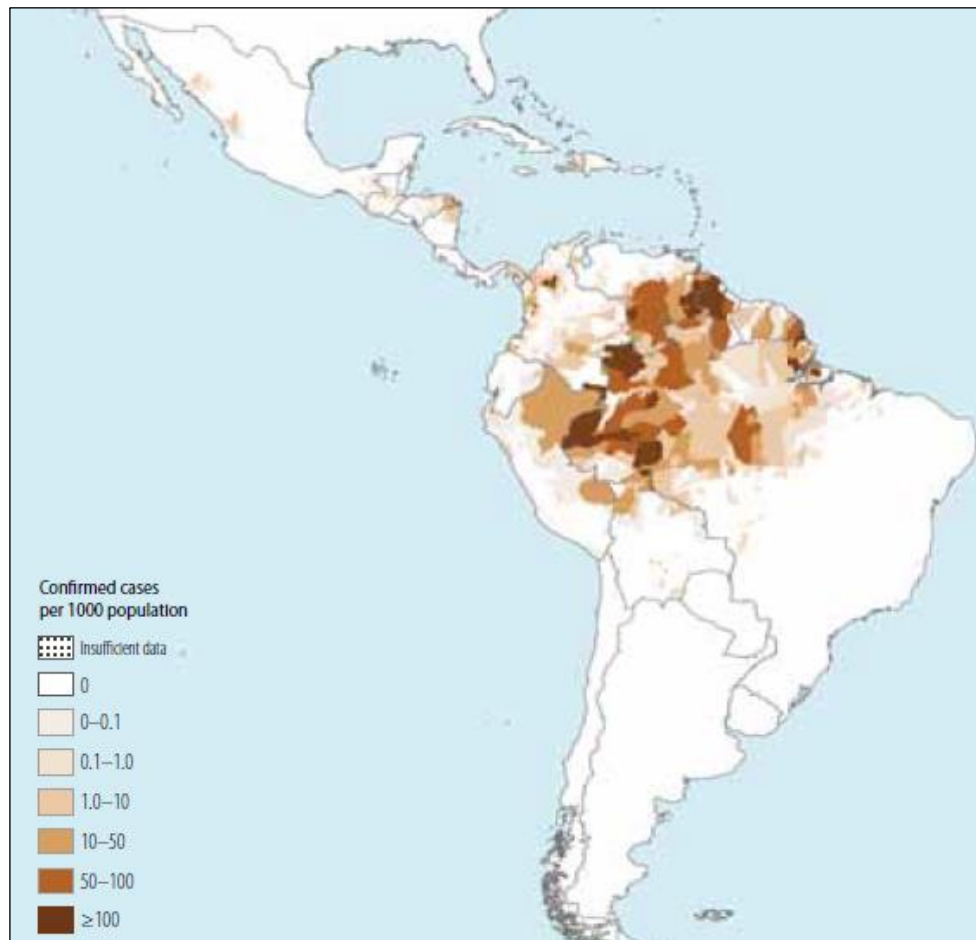


Figura 2. Países com casos confirmados de malária nas Américas, 2015 (4).

No Brasil, a maioria dos casos de malária se concentra na região Amazônica (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), área endêmica para a doença (**Figura 3**) (5, 6, 7). Em 2014, 84% dos foram por *P. vivax*, seguido do *P. falciparum* com 16% dos casos de acordo com o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde de 2015 (8).

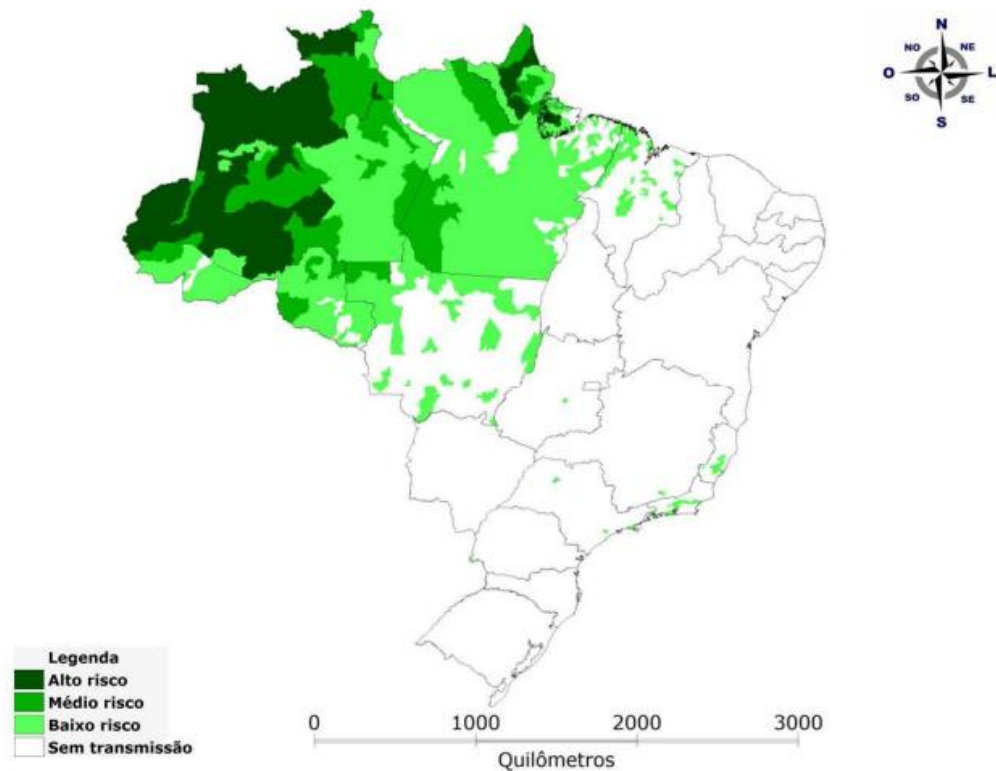


Figura 3. Mapa de risco de transmissão da malária no Brasil. Observa-se a ocorrência concentrada principalmente na região amazônica. Fonte: Secretaria de Vigilância em saúde/MS, 2015.

O território amazônico é vasto, com áreas de difícil acesso, áreas de garimpo e intenso fluxo migratório, fatores que favorecem a manutenção da doença e dificulta a sua erradicação (5). Em vista dessas peculiaridades da região várias ações de controle e erradicação foram tomadas, a criação do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal (PIACM) e posteriormente o Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (PNCM) contribuíram para a redução drástica dos casos de malária na região (9).

A despeito dos avanços adquiridos, um dos maiores entraves na luta contra a malária é a resistência aos antimaláricos, nesse contexto em 2001, países que compõem a Amazônia juntamente com a Organização Pan-americana da Saúde / Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS) criaram a Rede Amazônica de Vigilância da Resistência aos Antimaláricos (RAVREDA), com a finalidade de monitorar a resistência dos plasmódios aos antimaláricos e desenvolver alternativas na política de medicamentos quando necessário (10,11).

1.2 Ciclo Biológico do *Plasmodium spp*

O ciclo biológico se dá em duas etapas: no hospedeiro vertebrado – humano – denominado de ciclo assexuado ou esquizogônico e no hospedeiro invertebrado – mosquito – ciclo sexuado ou esporogônico (**Figura 4**) (12).

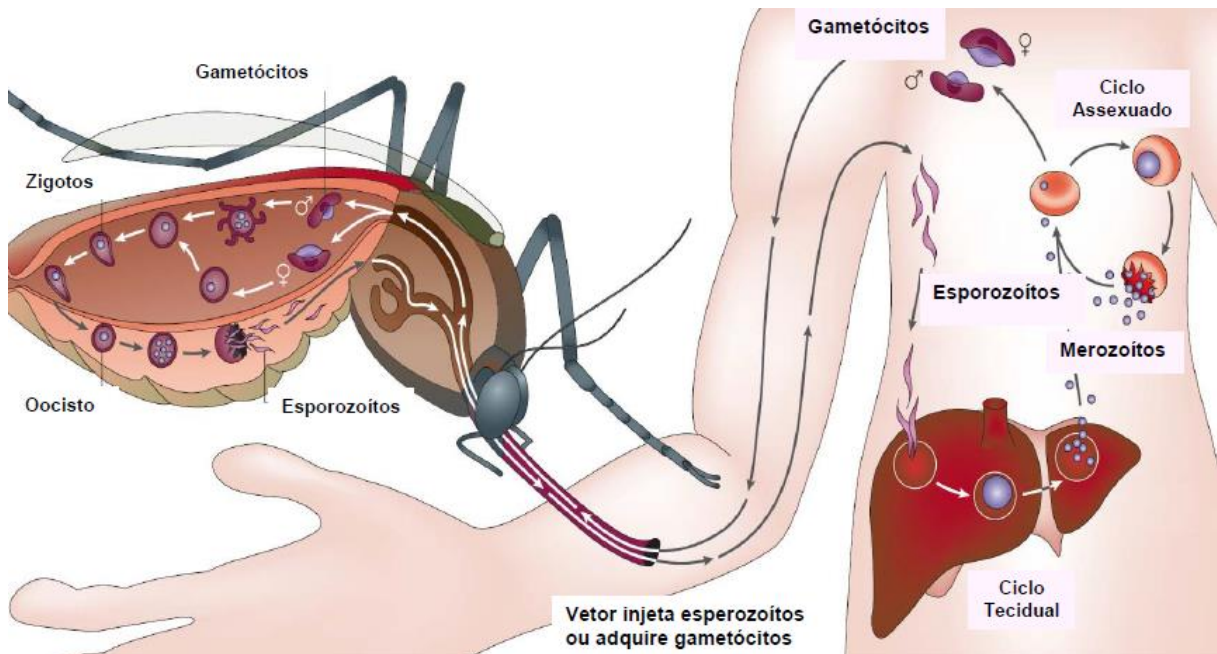


Figura 4: O ciclo de vida do *P. falciparum* no hospedeiro humano e no hospedeiro invertebrado. É dividido em duas fases: uma fase sexuada exógena com a multiplicação dos parasitos em certos mosquitos do gênero *Anopheles* e uma fase assexuada endógena com a multiplicação no hospedeiro humano. Adaptado de Su *et al* (2007).

Durante o repasto sanguíneo o mosquito inocula esporozoítos na pele do humano. Os esporozoítos seguem para o fígado, invadem os hepatócitos onde se transformam em esquizontes. Os esquizontes se rompem liberando milhares de merozoítos, que serão lançados na corrente sanguínea (13).

Estes merozoítos irão invadir os eritrócitos, onde se multiplicarão por esquizogonia sanguínea, romperão os eritrócitos e irão invadir novos eritrócitos reiniciando o ciclo. Após algumas gerações os merozoítos sanguíneos se diferenciarão em estágios sexuais, microgametócitos (masculinos) e macrogametócitos (femininos), que darão continuidade ao ciclo no mosquito vetor (14, 15).

As fêmeas anofelinas durante o repasto sanguíneo ingerem as formas sexuadas (gametócitos) e no interior do estômago ocorre a fusão e formação do ovo ou zigoto, este se transforma numa forma móvel, o oocineto, que atravessa a parede intestinal do mosquito e se aloja na membrana basal, formando o oocisto. Inicia-se então o processo de divisão esporogônica que culmina com o desenvolvimento de esporozoítos. Estes são liberados na hemolinfa do inseto, onde migram até as glândulas salivares, os quais poderão ser inoculados no hospedeiro humano, no momento da picada (16).

1.3 A espécie *P. falciparum*

Esse parasito existe em todas as regiões tropicais e é a espécie que causa a malária mais grave, a febre terçã maligna ou malária tropical, com acessos febris cíclicos de 36 a 48 horas (17, 18).

Tem tamanhos, formas e aparência variados, podendo ser confundidos com corpos estranhos, contaminantes das amostras de sangue, bactérias, entre outros (15) (**Figura 5**)

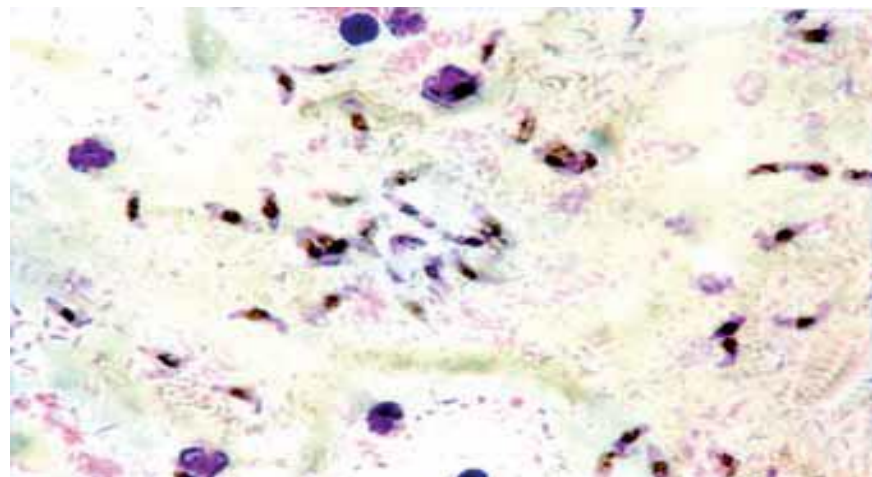


Figura 5: Forma evolutiva do *P. Falciparum* – Gametócito. Fonte: Brasil, 2009.

Os principais sintomas da malária são a clássica tríade febre, calafrio e dor de cabeça, podendo apresentar outros sintomas gerais como mal-estar, dor muscular, sudorese, náusea e tontura, que podem surgir antes ou acompanhar a tríade sintomática, porém esses sintomas podem ou não estar presentes e até mesmo todos podem estar ausentes (15).

A infecção por malária falciparum pode resultar na forma grave e complicada, caracterizada pelo acometimento e disfunção de vários órgãos ou sistemas: o sistema nervoso central (malária cerebral), a anemia grave, a insuficiência renal, a disfunção pulmonar, o choque, a coagulação intravascular disseminada, a hipoglicemia, a acidose metabólica e a disfunção hepática (17).

1.4 Antimaláricos

Por se tratar de uma doença devastadora, que afeta não só a saúde, como também os custos econômicos de países mais pobres é urgente a tentativa de controlar e principalmente erradicar a malária. Necessita-se desenvolver novas ferramentas de controle que possam atingir a meta de erradicação da doença, para tal é indispensável o entendimento do funcionamento das drogas antimaláricas, para a sua melhor utilização, bem como, para avaliar a resistência aos mesmos (19).

Os antimaláricos em geral podem ser classificados de acordo com a sua ação nos diferentes estágios do ciclo evolutivo do *Plasmodium*: esquizontocidas sanguíneos, esquizontocidas teciduais, gametocidas e esporontocidas (20, 21), ou podem classificar-se também de acordo com o grupamento químico (**Tabela 1**).

As drogas esquizontocidas sanguíneas são utilizadas no tratamento da fase aguda da doença, atuam proporcionando cura clínica ou supressiva e atacam as formas eritrocitárias do parasito. As esquizontocidas teciduais promovem a cura radical, são eficazes nas formas hepáticas do parasito e em gametas. As drogas gametocidas eliminam as formas sexuadas, impedindo assim a transmissão do homem para o inseto vetor. As esporontocidas previnem a esporogonia no mosquito vetor, que se alimentaram de portadores de gametócitos, porém ainda não há nenhuma droga deste grupo disponível para uso em humanos (16, 17, 18, 19).

Vale ressaltar que determinado antimalárico pode agir contra mais de uma forma do protozoário, ser eficaz contra uma espécie e não ter nenhuma ação contra outra (17).

Tabela 1. Principais antimaláricos classificados de acordo com o grupamento químico e atividade (15)

Grupamento Químico	Principais Fármacos	Atividade
4-metanolquinolinas	Quinina Mefloquina	Esquizonticidas sanguíneos de ação rápida
4-aminoquinolinas	Cloroquina Amodiaquina	Esquizonticidas sanguíneos de ação rápida. Atividade gametocida marginal
8-aminoquinolinas	Primaquina	Esquizonticidas teciduais. Apresentam atividade gametocitocida e agem em outras fases do ciclo de vida do parasito
Peróxido de lactona sesquiterpênica	Derivados da artemisinina	Esquizonticidas sanguíneos
Biguaninas	Proguanil	Esquizonticida tecidual e esquizontida sanguíneo de ação lenta
Diaminopirimidas	Pirimetamina	Esquizonticida tecidual e esquizontida sanguíneo de ação lenta
Diclorobenzilidinas	Lumefantrina	Esquizonticida sanguíneo

1.4.1 Resistência do *P. falciparum* aos antimaláricos

Um dos maiores obstáculos na luta contra a malária é a resistência à quimioterapia antimalárica. O acompanhamento e a eficácia dos medicamentos antimaláricos é um componente crucial no controle da doença, já que o parasito desenvolve mecanismos para evitar a ação dos medicamentos (25, 26, 27).

A utilização incorreta dos antimaláricos possibilitou a seleção de parasitos e o desenvolvimento de resistência a esses medicamentos. Sabe-se que as mutações genéticas que conferem resistência às drogas antimaláricas acontecem na natureza, de maneira espontânea, conferindo ao parasito o benefício de sobrevivência contra a droga. Os parasitos resistentes são selecionados e proliferam-se, ocasionalmente resultando em uma população resistente, não susceptível ao tratamento. Esse fato foi documentado para 3 das 5 espécies de plasmódio, *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* todas as que parasitam o homem (28, 29).

Em 1967, a OMS definiu resistência como “a capacidade do parasito de sobreviver e se multiplicar na presença da medicação em doses que normalmente destruiriam os parasitos ou preveniriam sua multiplicação, mas dentro da tolerância” (30). Posteriormente foi modificada para especificar que o medicamento em questão deve “ter acesso ao parasito ou aos glóbulos vermelhos infectados durante o período de tempo necessário a para sua ação normal” (31). Isto resulta em uma diminuição ou falha no clareamento da parasitemia assexuada no sangue, permitindo assim o surgimento de gametócitos que são responsáveis pela transmissão do genótipo resistente (32).

Vários fatores contribuem para a diminuição da velocidade de depuração do *Plasmodium*: farmacocinética e farmacodinâmica da droga, a resistência cruzada que pode ocorrer entre medicamentos que contenham o mesmo grupamento químico ou mecanismos de ação semelhantes, tratamentos errôneos, seja por prescrição errada, administração, não adesão do tratamento ou má absorção (33).

O antimalárico mais antigo conhecido no ocidente é o quinino, pode ser extraído da casca de diversas espécies de árvores do gênero *Cinchona*, conhecida também como casca peruana (22). Até meados do século XX o quinino era o principal medicamento utilizado no tratamento de malária, sua utilização só foi diminuída em razão da alta toxicidade e o surgimento de cepas resistentes (23). Os primeiros registros do surgimento de resistência de *P. falciparum* ao quinino no Brasil datam de 1910 (27), porém ele ainda é utilizado em várias partes do mundo, no tratamento de casos de resistência à cloroquina (34).

O surgimento da resistência do *P. falciparum* resistente à cloroquina foi um marco na história da malária, pois por muitos anos foi utilizada como droga de primeira escolha no tratamento da malária, mas seu uso indiscriminado levou à resistência. Os primeiros casos foram relatados em 1957 na fronteira entre a Tailândia e o Camboja e na Colômbia (35, 36). Em 1978, foram encontrados pela primeira vez casos de resistência na África e desde então, foi-se espalhando por quase todo o mundo (37). No Brasil os primeiros casos fora relatados em 1954 (38).

A disseminação da malária por *P. falciparum* resistente à cloroquina culminou na substituição por sulfadoxina-pirimetamina (SP) como primeira escolha (39). A sulfadoxina e a pirimetamina foram desenvolvidas separadamente, contudo, estudos demonstraram efeito sinérgico dessas duas drogas, e em 1960 o medicamento Fansidar[®] foi introduzido em vários países (40).

A SP atua inibindo a *Plasmodium falciparum* di-hidrofolato redutase (*Pfdhfr*) e *Plasmodium falciparum* di-hidropteroato sintetase (*Pfdhps*), duas enzimas fundamentais envolvidas na via de biossíntese do folato (41).

Entretanto a resistência a essa associação de drogas se estabeleceu rapidamente, polimorfismos de nucleotídeo único conduzem às mutações não sinônimas nesses dois genes *Pfdhfr* e *Pfdhps* foram relacionadas à resistência à sulfadoxina e pirimetamina respectivamente (40, 41, 42).

Com rápido desenvolvimento da resistência ocorreu um aumento na mortalidade e a mefloquina veio a tornar-se a primeira escolha nas áreas onde nas áreas onde os antifolatos e as 4-aminoquinoleínas já não eram mais eficazes (23). A mefloquina é um composto derivado do quinino, foi desenvolvida durante os anos 70 pelo exército Norte Americano, com o objetivo principal de combater a resistência aos fármacos existentes na época (43, 44, 45, 46). No início dos anos 80 surgiram os primeiros casos de *P. falciparum* resistente à mefloquina (45, 47).

Com a crescente expansão da resistência aos antimaláricos, foram necessárias pesquisas por novos medicamentos que destruíssem o parasito e que fossem seguros para os pacientes (43). Em 1979, a equipe da farmacologista chinesa Youyou Tu publicou um estudo demonstrando a ação potente da artemisinina, iniciando assim um novo capítulo na luta contra o *P. falciparum* (48).

1.5 Artemisinina e seus derivados

A artemisinina é um medicamento que foi isolado da planta *Artemisia Annuia L.* por pesquisadores chineses em 1972 (48, 49), porém o chá dessa planta, conhecida como *Quing Hao* é utilizado há mais de 2000 anos para tratar febres e calafrios (50, 51).

A *Artemisia annua L.* nativa da China, pertence à família *Asteraceae* ou *Compositae* e hoje é encontrada em muitos países (51, 52). A artemisinina é extraída das folhas e flores em concentração variável, com rendimento de 0,01-0,8%do peso seco (51, 53, 54).

A estrutura química da artemisinina foi elucidada em 1979, por difração de raio-x (55).

Caracteriza-se por uma lactona sesquiterpênica que possui uma ligação endoperóxido, que é essencial para sua atividade (54,56). Pode ser reduzida a dihidroartemisinina, que demonstrou atividade antimalárica maior que a própria artemisinina (57).

O mecanismo de ação da artemisinina mais aceito atualmente envolve a formação do complexo de transição, por intermédio dos átomos de ferro do heme e O1 do endoperóxido. A posição relativa da artemisinina com respeito ao heme é determinada por interações estereoeletrônicas entre ambos, as quais afetam o rearranjo do complexo até o rompimento da ligação Fe-O (58).

Devido à artemisinina ser insolúvel, vários derivados foram sintetizados obtendo-se substâncias mais, ou menos ativas (55). O artesunato é um derivado hidrossolúvel útil para administrações intravenosas, intramusculares e retais. O arteéter é solúvel em lipídeos e útil para administração oral, intramuscular e retal (21). Outros exemplos de análogos sintéticos são o arteéter, lipossolúvel e o artelinato, hidrossolúvel (**Figura 6**).

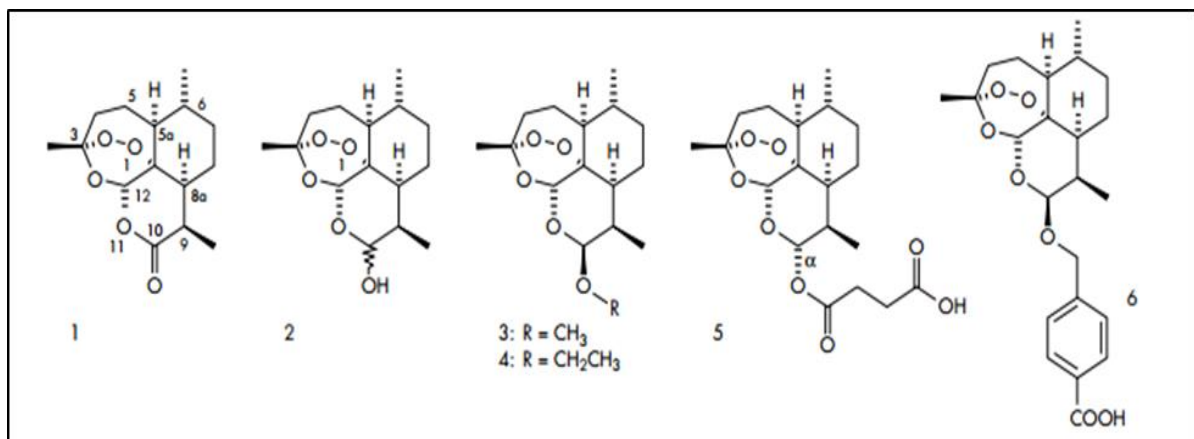


Figura 6: Estrutura química da artemisinina e seus derivados: artemisinina (1), dihidroartemisinina (2), arteéter (3), Arteéter (4), Artesunato (5), Artelinato (6). Fonte: Woodrow *et al.*, 2004.

A artemisinina e seus derivados são os medicamentos com ação mais rápida e potente contra a malária conhecidos atualmente (59), são esquizotomicidas sanguíneos de ação rápida, eficazes no tratamento da fase aguda da malária, incluindo a malária cerebral e em pacientes que desenvolveram resistência à cloroquina (21). Promovem uma rápida redução da parasitemia, quase que imediatamente a sua administração, consequentemente rápida redução dos sintomas, e interagem com o grupamento heme para formação de radicais livres a fim de danificar as organelas e membranas do parasito (54). Tem atividade gametocida que reduz a transmissão para o mosquito vetor (60).

As artemisininas tem um início de ação muito rápido, apresentam redução da parasitemia assexuada já nas primeiras 48h (61), porém são rapidamente metabolizadas, sua baixa meia-vida plasmática (3-5h) implica em um tratamento mais longo se utilizado em monoterapia – 7 dias (62).

Em várias partes do mundo o *P. falciparum* desenvolveu resistência aos antimaláricos utilizados em monoterapias. Para evitar a propagação da resistência, desde 2001 a OMS recomenda o uso da terapia combinada à base de artemisinina (ACTs) como primeira linha de tratamento para malária não complicada (37).

Nessa terapia, a possibilidade de seleção de parasitos resistentes é diminuída, pois a maior parte da carga parasitária é eliminada pela rápida ação da artemisinina, cuja concentração diminui rapidamente na circulação sanguínea e a parasitemia residual é extinta pela droga parceira, que permanece mais tempo na circulação (63).

A combinação com outro antimalárico de meia-vida longa, permite uma redução na duração do tratamento artemisinina, que seria de 7 dias, para 3 dias, ao mesmo tempo em que melhora a eficácia e reduz a probabilidade de desenvolvimento de resistência, pois a droga associada permitirá a remoção dos parasitos que eventualmente sobrevivam após os 3 dias de tratamento (60).

Atualmente, a OMS preconiza a utilização das ACTs como terapia de primeira escolha para todos os casos de malária em áreas onde o *P. falciparum* é a espécie infectante predominante (60). São exemplos de combinações atualmente empregadas: artesunato-mefloquina, artemeter-lumefantrina, artesunato-amodiaquina, artesunato-sulfadoxina-pirimetamina e diidroartemisinina-piperaquina (64).

1.5.1 Diminuição do Clareamento Parasitário

O atraso ou diminuição do clareamento parasitário foi relatado pela primeira vez na região de Pailin, no Camboja em 2008 (64, 65), onde se observou a diminuição da susceptibilidade *in vivo* aos derivados de artemisinina. Desde então essa susceptibilidade diminuída foi detectada em 5 países da sub-região do Grande Mekong, Camboja, Republica democrática do Laos, Myanmar, Tailândia e Vietnã (4, 66).

Os estudos de eficácia terapêutica realizados no Camboja e Tailândia foram os primeiros a demonstrar um aumento na proporção de pacientes que ainda apresentavam parasitemia no dia 3, o que exibe uma mudança no padrão de susceptibilidade do parasito a artemisinina e é provavelmente a primeira fase de resistência à artemisinina (32, 67). Foi relatado também esse aumento na proporção de pacientes com parasitemia no D3 nas fronteiras de Myanmar-Tailândia e China-Mianmar e em uma província do Vietnã. A situação nesses outros países é menos alarmante do que na fronteira do Camboja com a Tailândia, mas merece ser monitorado (68, 69, 70).

A característica fundamental das artemisinina é a capacidade de clareamento parasitário rápido, logo a proporção de pacientes com parasitemia persistente após o dia 3 tem sido proposto como uma simples e pragmática métrica de escolha para a monitorização de rotina para identificar suspeita de resistência à artemisinina (71), ou seja, fornece um indicador útil que pode ser usado como rastreio da mudança no padrão de susceptibilidade do parasito a artemisinina e é provavelmente a primeira fase de resistência artemisinina (72, 73).

Vários fatores influenciam na dinâmica do clareamento parasitário tais como a imunidade do paciente, biologia do parasito, densidade parasitária, qualidade da microscopia, perfil farmacocinético e farmacodinâmico dos diferentes derivados de artemisinina e das drogas parceiras (67, 71).

A grande difusão do tratamento com a artemisinina resulta em uma pressão contínua para a seleção natural dos parasitos mais resistentes e isso é motivo de grande preocupação, pois não há outra opção farmacêutica tão eficaz quanto a artemisinina e seus derivados (66).

1.5.2 Resistência à artemisinina e seus derivados

A utilização da artemisinina e seus derivados foi um marco na história da saúde no mundo, entretanto, após pelo menos duas décadas de uso bem sucedido, a resistência emergiu e parece estar se disseminando pelo sudeste asiático, apesar dos esforços de contenção (74).

A resistência à artemisinina é definida como uma redução no tempo de clareamento parasitário após o início do tratamento com artesunato em monoterapia ou ACTs (75, 76, 77). Isto representa uma resistência parcial, pois afeta os estágios de anel do parasito o que justifica a associação com uma droga parceira de ação prolongada (76, 68).

Apesar das alterações observadas na sensibilidade do parasito, que se manifestam sob a forma de clareamento parasitário lento, doentes continuam a responder ao tratamento combinado, desde que o medicamento associado continue eficaz (4). No entanto, esse lento clareamento faz com que mais parasitos sejam expostos ao medicamento parceiro sozinho, aumentando o risco de desenvolver resistência ao mesmo (78).

O lento clareamento parasitário está fortemente ligado às mutações no gene Kelch13 (*Pf* Kelch 13) (79, 80, 81). A identificação deste marcador de resistência tem permitido refinar a definição de resistência, incluindo informação sobre genótipo. No entanto como as investigações sobre mutações ainda estão evoluindo, a definição de resistência está evoluindo também (76). Investigações das mutações no gene K13 são de extrema importância para detectar e monitorar a propagação da resistência (76, 82, 83).

De acordo com o último Status Report on artemisinin and ACT resistance – OMS, a atual definição de resistência à artemisinina é dividida em suspeita de resistência (definida como alta prevalência do fenótipo atraso no clareamento parasitário ou alta prevalência de mutações K13) e é confirmada pela combinação de ambos fatores, atraso no clareamento parasitário e mutações no gene K13 em um único paciente) (76).

As ACTs ainda são altamente eficazes no tratamento de pacientes com malária em muitas partes do mundo. No entanto, é essencial que continuem os esforços de colaboração internacional para desenvolver políticas e estratégias para evitar a propagação da resistência (4, 84, 85). O acompanhamento do clareamento parasitário tem papel importante na vigilância da eficácia das ACTs, principalmente em um ambiente onde a resistência artemisinina ainda não ocorreu. Esta informação será importante para a interpretação dos estudos de vigilância futuras, a fim de detectar sinais precoces de resistência à artemisinina e seus derivados.

Diante de tudo o que foi exposto a questão a ser respondida ao longo do trabalho é: Se há diminuição da sensibilidade (suspeita de resistência) do *P. falciparum* à artemisinina e seus derivados em pacientes tratados em um hospital de referência no Amazonas?

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a evolução do tratamento ao longo do tempo e observar se ocorre a diminuição da sensibilidade do *Plasmodium falciparum* à artemisinina e seus derivados em pacientes tratados em um hospital de referência no Amazonas.

2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Determinar o tempo médio de clareamento parasitário em pacientes atendidos na FMT-HVD, no período de 1991 a 2002;
- ❖ Analisar o perfil da reposta do parasito frente aos diferentes esquemas terapêuticos utilizados;
- ❖ Avaliar a sobrevida para verificar associações entre o clareamento parasitário e o tipo de tratamento.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local do estudo

O estudo está sendo realizado no Laboratório de Malária da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). A FMT-HVD é um centro de referência nacional e mundial para o diagnóstico e tratamento de enfermidades tropicais, infecciosas, parasitárias e dermatológicas. Em média, 27 mil usuários utilizam mensalmente os serviços ambulatoriais e hospitalares da Instituição (86). O Laboratório de Malária é responsável pelo diagnóstico e acompanhamento do tratamento de casos de malária atendidos na FMT-HVD. Em 2016 foram detectados 49145 casos positivos de malária, dos quais apenas 7% foram *P. falciparum*, 92% foram *P. vivax* e 0,42% de malária mista (*P. falciparum* + *P. vivax*), segundo dados do SIVEP.

3.2 Desenho do estudo

Este foi um estudo de coorte retrospectivo realizado para avaliar as respostas à terapêutica baseada em artemisinina, ao longo do tempo. A aprovação do desenho do estudo foi obtida pelo comitê de ética da instituição (CEP/FMT-HVD CAAE number: 46481215.2.0000.0005).

3.3 Base de dados do estudo

Os dados foram obtidos através da revisão retrospectiva dos formulários de registo durante um período de 11 anos (Setembro de 1991 a Dezembro de 2002). Foram considerados elegíveis os dados registrados de malária positiva, incluindo *P. falciparum* ou mista (*P. falciparum* mais *P. vivax*), que receberam tratamento com terapias à base de artemisina (artesanato, artesunato / mefloquina, artemeter, artemeter / mefloquina). Os dados com informações incompletas e ilegíveis foram excluídos do estudo.

O banco de dados foi construído no programa Microsoft Excel (Microsoft Corp.). Foram coletadas informações sobre o diagnóstico positivo de *P. falciparum*, idade, sexo, terapias à base de artemisinina, espécies de *Plasmodium*, número de leucócitos contados, parasitemia assexual e sexual (D0) e acompanhamento diário (D1 a D7, D14, D21, D28 E D35).

Os indivíduos foram classificados em quatro grupos etários diferentes, de acordo com idades: menor que 1 ano (0-11 meses), de 1 a 4 anos (1 a <5), 5 a 14 anos (5 a <15) e a partir dos 15 anos (≥ 15).

3.4 Análise Estatística

Análises de sobrevivência (AS) e regressão logística (RL) foram realizadas para verificar associações entre clareamento parasitário e tipo de tratamento. A variável de interesse em um estudo epidemiológico é a variável dependente. O modelo de Cox possibilita verificar quais são as variáveis independentes que agem de maneira intensificadora, quando avaliadas em conjunto, e considera sua significância estatística dentro de um intervalo de confiança (87).

Para análise de regressão, o desfecho avaliado foi o tempo de depuração do parasita em D4, enquanto que para a análise de sobrevivência a variável analisada foi o tempo até o clareamento

Analizamos também a prevalência de gametocitonia durante o diagnóstico (D0) e o surgimento de gametócitos entre os pacientes que não os possuíam no D0.

As curvas de Kaplan-Meier e os testes log-rank para a igualdade de funções de sobrevivência, bem como a regressão de Cox pelo método de Breslow foram utilizados na análise de sobrevivência.

Todos os testes foram realizados para um nível de significância de 5%. A análise dos dados foi realizada utilizando Stata / SE 13.0

Resultados

4 RESULTADOS

O manuscrito intitulado “**Overview of artemisinin effectiveness during outset years of its implementation in the Western Brazilian Amazon**”, foi publicado no periódico *Memórias do Instituto Oswaldo Cruzy* (Fator de impacto de 2.833), como artigo original compõe os resultados desta dissertação de mestrado.

**Overview of artemisinin effectiveness during outset years of its implementation in the
Western Brazilian Amazon**

Raquel de Medeiros Pinto¹, Vanderson de Souza Sampaio^{2,3,4}, Gisele Cardoso de Melo^{1,3,4},
Maria das Gracas Costa Alecrim^{3,4}, Karine Mattos⁵, Renata Trentin Perdomo⁶, Sabrine
daCosta Cordeiro⁶; Ana Flavia Alves Parente⁷, Lidia Raquel de Carvalho⁸; Rinaldo
PoncioMendes⁹, Marcus Vinicius Guimaraes Lacerda^{3,4,10}, Wuelton Marcelo Monteiro^{3,4},
SimoneSchneider Weber^{6,11*}

1 Programa de Pós-Graduação em Ciências Hematológicas, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus AM, Brasil; 2 Fundação de Vigilância em Saúde, Manaus AM, Brasil; 3 Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus AM, Brasil; 4 Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus AM, Brasil; 5 Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande MS, Brasil; 6 Laboratório de Biociência, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande MS, Brasil; 7 Universidade de Brasília (UNB), Brasília DF, Brasil; 8 Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociência de Botucatu, Botucatu SP, Brasil; 9 Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu SP, Brasil; 10 Instituto Leônidas & Maria Deane - Fiocruz, Manaus AM, Brasil; 11 Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Itacoatiara AM, Brasil.

*Corresponding-author: weberblood@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-4181-142X>

Received 23 February 2019

Accepted 27 March 2019

ABSTRACT

Background

The elimination of malaria depends on the blocking of transmission and of an effective treatment. In Brazil, artemisinin therapy was introduced in 1991, and here we present performance overview during implementation outset years.

Methods

It is a retrospective cohort (1991 to 2002) of patients treated in a tertiary center of Manaus, with positive microscopic diagnosis of *P. falciparum* malaria, under treatment with using injectable or rectal artemisinin derivatives, and followed over 35-days to evaluate parasite clearance, death and recurrence.

Fidings

This cohort outcome resulted 97.6% (1554/1593) of patients who completed the 35-day follow-up, 0.6% (10/1593) of death and 1.8% (29/1593) of follow-up loss. All patients that died and those that presented parasitaemia recurrence had pure *P. falciparum* infections and received monotherapy. Considering patients who completed 35-day treatment, 98.2% (1527/1554) presented asexual parasitaemia clearance until D4 and 1.8% (27/1554) between D5-D10. It is important to highlight that had no correlation between the five treatment schemes and the sexual parasite clearance. Finally, it is noteworthy that we were able to observe also gametocytes carriage during all follow-up (D0-D35).

Main conclusions

Artemisinin derivatives remained effective in the treatment of falciparum malaria during first 12-years of use in north area of Brazil.

Key-words: *Plasmodium falciparum*; artemisinin; parasite clearance; drug resistance; treatment effectiveness; cohort study.

INTRODUCTION

Malaria is a major health problem in tropical and subtropical regions of the world. According World Health Organization (WHO) 91 countries around the world present active malaria transmission, with a total of 445,000 deaths worldwide, of which 99% are caused by *Plasmodium falciparum*. In the Americas, malaria occurs in 21 countries, predominantly in South America, where four countries (Brazil, Colombia, Venezuela and Peru) account for more than 70% of cases. In Brazil, most of the malaria cases are concentrated in the Amazon states (Acre, Amapa, Amazonas, Maranhao, Mato Grosso, Para, Rondonia, Roraima and Tocantins), an endemic area for the disease (1).

Appropriate and early treatment is the basis of disease control, aiming at rapid cure in order to avoid the disease progress to severe forms and even death (2). In this fight there is a vast and efficient therapeutic arsenal, however, despite the proven efficacy treatment failures are frequent and may be the result of drug resistance or inadequate exposure to drugs, whether due to failure in prescription and dispensing, incorrect dosage and even if the patient does not adhere to the treatment (2, 3). Moreover, resistance to antimalarial chemotherapy has been one of the major obstacle in the fight against this disease. The monitoring of the effectiveness of antimalarial drugs is a crucial component in the disease's control, as the parasite develops mechanisms to avoid the action of antimalarial compounds (4).

Asexual forms of *Plasmodium* are responsible for the clinical manifestation of the disease, but its transmission occurs through the ingestion of sexual forms, gametocytes, by a mosquito vector. Artemisinin-based combination therapies (ACTs) have recognized activity against immature gametocytes, but do not act against mature gametocytes (5). These residual gametocytes are often found in submicroscopic fractions, being a source of infection. However, microscopical examination is not sensitive enough to detect this small

parasitological load and the molecular monitoring is extremely important because it detects extremely low densities of gametocytes (6).

In Brazil, studies published in 1992 and 2010 have reported resistance of *P. falciparum* (Pf) to various compounds, such as chloroquine, sulfadoxine-pyrimethamine, mefloquine, quinine and amodiaquine (7, 8). Currently, artemisinin combination therapies (ACT) have been recommended as the first-line therapy for treating uncomplicated falciparum malaria in all endemic countries and failure of this *P. falciparum* therapy was not reported in Brazil (9). In this therapy, the possibility of selection of resistant parasites is decreased because most of the parasite load is eliminated by the rapid action of artemisinin and the residual parasitemia is extinguished by the partner drug, which remains longer in circulation (10).

The widespread diffusion of artemisinin treatment results in continuous pressure for the selection of the most resistant parasites and this is of great concern since there is no other pharmaceutical option as effective as artemisinin and its derivatives (11, 12). In 2008 and 2009 studies developed on the Thai-Cambodian border, in Southeast Asia, already show a decrease in susceptibility of the *P. falciparum* to artemisinin. These studies report a delay in the parasite clearance time in the blood of some patients, which suggests a change in the parasite's susceptibility pattern to artemisinin and is probably the first sign of artemisinin resistance (13, 15). While in 2014, a report from French Guiana also point to a similar phenomenon in Latin America (16).

However, the efficacy of ACTs against *P. falciparum* malaria and absence of genetic markers associated with artemisinin resistance have been reported (9), and according to Worldwide Antimalarial Resistance Network in Latin America, there is no evidence that the protozoan's resistance has reached in Brazil. Thus, the principal objective of our study was to determine the effectiveness of *Plasmodium falciparum* treatment with five artemisinin

regimens in the Western Brazilian Amazon, by monitoring the parasitemic clearance, death and recurrence during the follow-up period.

METHODS

Study site

Our study was carried out at Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, in Western Brazilian Amazon. FMT-HVD is a reference hospital for the diagnosis and treatment of tropical, infectious, parasitic and dermatological diseases.

Study design

This was a retrospective cohort study performed to assess the responses to artemisininbased therapy regimens. Five groups of patients were constituted regarding the treatment regimens used, three of them as monotherapy (groups 1, 2 and 3) and two combined therapies (groups 4 and 5): group 1: artesunate (AS) IV 1.5 mg/kg/day until D3; group 2: rectal artesunate suppositories (RAS), called a Rectocap™, at 50 mg/day D0 until D4 for children; group 3: artemether (ATM) IM 1.5 mg/kg/day until D3; group 4: artesunate IV 1 mg/kg/day followed by oral mefloquine 20 mg/kg for 12/12 hour at D2; and group 5: artemether IM 1 mg/kg/day until D3, followed by oral mefloquine 20 mg/kg for 12/12 hour at D2. Patients with mixed malaria, concomitance of Pf and Pv, were treated with the same therapeutic schemes described above.

The data were grouped into two 6-year periods (sexenium), to compare all the evaluated variables. Asexual and sexual parasitaemia were monitored at admission (DO) and in the standardized days of follow-up: D1 to D7, D14, D21, D28 and D35.

Data collection

Data collection. The data were collected by reviewing all the registration forms over an 11-year period (September 1991 to December 2002) and transferred to a protocol specifically prepared for the study.

The extracted data from these forms were: *Plasmodium* species, parasite numbers, age, gender, artemisinin-based therapy and leukocytes count. *Inclusion criteria.* Cases with parasitologically confirmed malaria caused by the single-species *P. falciparum* or mixed (*P. falciparum* plus *P. vivax*), which received treatment with one of the five artemisininbased regimens were enrolled in the study. *Criteria of exclusion.* Patients with incomplete or illegible information, losses to follow-up and treatments with other types of antimalarial compounds or combinations were excluded of the study.

Evaluation of the asexual and sexual parasitaemia and recurrence analysis

The parasite densities were quantified from thick blood films by counting the number of ring forms until 200 leukocytes were also counted, and then multiplying the number found by 30, which assumes an average number of 6,000 leukocytes/ μ L. During treatment, the parasitaemia was registered daily until day 7 (D0 to D7) throughout hospitalization and, after that, weekly until day 35 (D14, D21, D28 and 35). While, the gametocytaemia was evaluated in the diagnosis (D0) and at its appearance of gametocytes among the patients who did not have gametocytes at D0.

The “day-4” parasitaemia measure was considered a surveillance tool for artemisinin tolerance, guaranteeing the current WHO-recommended cut-off value (72 hours)(3, 17).

The term recurrence was used to indicate the reappearance of the asexual parasitaemia after its remission, during the 35-day follow-up. Here, we considered recurrence as recurrent asexual parasitaemia, after having observed its negativation, during the 35-day follow-up. Recurrence cases were carefully evaluated, regarding artemisinin treatment regimens, time and age groups by Kaplan-Meier analysis.

STATISTICAL ANALYSIS

The enrolled patients were stratified into nine age groups (years): [a]: ≤ 9 ; [b]: 10 - 19; [c]: 20 - 29; [d]: 30 - 39; [e]: 40 - 49; [f]: 50 - 59; [g]: 60 - 69; [h]: 70 - 79; and [i]: ≥ 80 . The distribution of patients by year of admission, gender and age range was performed by the chi-square test. Comparison of the time for clearance and recurrence regarding age range, gender and treatment was analysed by Kaplan-Meier survival curves and by the log-rank test to compare the curves.

All statistical tests were 2-tailed, and significance was set up at $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using SAS, version 9.2 (SAS Institute).

RESULTS

Patients' characteristics and epidemiological data

The flowchart of the study showed that the 2702 patients previously screened, 1109 of them were excluded (**Figure 1**). Evaluation of all the patients showed that 97.6% (1554/1593) completed the 35-day follow-up (but 39 (2.4%) did not: 10/1593 (0.6%) of them died and 29/1593 (1.8%) lost the follow-up. Of the 1593 eligible patients, 229 received mefloquine in combination with artemisinin, and none of them evolved to death. The artesunate or artemether in monotherapy was administered to 1364 patients, and 10 (0.7%) of them died before completing 35-day follow-up, a higher incidence than that observed in combined therapy ($p = 0.009$).

The number of patients with mono-infection caused by *P. falciparum* was higher than those by *P. falciparum* plus *P. vivax* ($p < 0.0001$). The distribution regarding age groups showed significant differences ($p < 0.0001$), paying the attention the high prevalence of patients under 9 years old. These data are present in **Table I**. In these cases, the analysed variables were significant, except for gender (p -value = 0.32).

The highest malaria occurrences were observed in the youngest age groups ($p < 0.0001$), with a substantial increase in coinfection cases in age group 1 (one to 9 years old) (**Figure 2A**); mono-infection was higher in all other age ranges. On the other hand, the coinfection showed a strong tendency to be higher ($p = 0.06$) in patients treated in the second sexenium than in the first one in early follow-up (**Figure 2B**).

Progress of the asexual parasite during the 35-day follow-up

Considering patients who completed the 35-day treatment with one of five analyzed artemisinin-based regimens, 98.2% (1527/1554) presented asexual parasitaemia clearance until D4 and only 1.8% (27/1554) between D5-D10 (**Table II**). These results revealed only three patients (0.2%) with negative parasitaemia between D7 and D10.

The **Figure 3** presents the comparison of the time for clearance of asexual parasite regarding to five artemisinin-based regimens (**Figure 3A**), age groups (**Figure 3B**) and gender (**Figure 3C**) generated by the Kaplan-Meier survival plot. All analyzed variables indicated statistical differences ($p\text{-value} \leq 0.05$). However, when we separating cases of mono-infection and coinfection, we did not find any statistical correlation of asexual parasite clearance rates with different artemisinin-based therapies, age and gender (data not shown).

Progress of the sexual parasite during the 35-day follow-up

The analyzed sexual stage indicated prevalence of gametocytes in 47% (748/1593) of enrolled patients, 26.2 % (196/748) of whom presented gametocytes at enrollment (day 0), compared to 73.7% (552/748) who exhibited sexual stage at least once during the 35-day follow-up (**Table III**). Among the individuals who exhibited sexual parasitaemia, just age groups ($p\text{-value} = 0.003$) and gender ($p\text{-value} < 0.001$) revealed significant correlation with gametocyte clearance ($p\text{-values} = 0.003$) (**Figure 4**). It is important to highlight that had no correlation between the five treatment schemes and the sexual parasite clearance during this cohort (**Figure 4A**).

Parasitaemia recurrence during the follow-up

Regarding parasitaemia recurrence in patients treated with monotherapy, 4.9% with RAS, 1.6% with AS IV and 0.3% with ATM IM demonstrated recurrence of parasitaemia during follow-up. In the other hand, patients treated with combined therapy (ASMQ and ATMMQ) did not present reappearance of the parasitaemia during the follow-up. Although the statistical analysis revealed no association with treatment regimen (p -value = 0.06), age (p -value = 0.85) or time treatment (p -value = 0.65).

DISCUSSION

This is a 12-year retrospective analysis on the susceptibility of *P. falciparum* to artemisinin based-therapies among hospitalized patients to treatment in the Northern Brazilian region, after its introduction in 1991. Almost all hospitalized patients who completed the 35-day follow-up period presented good therapeutic response with negative parasitaemia, thus demonstrating the treatment regimen effectiveness. This finding is very important because the control and elimination of *falciparum* malaria depends not only on the blocking of transmission but also on the provision of an effective treatment (18, 19).

This study found malaria occurrence was higher in the youngest age groups, with a substantial increase of mixed malaria between 1 to 9 years old. In this sense, is important to highlights that usually, manuscripts about treatment of hospitalized patients with malaria presents high frequency of children. However, in our study there were no predominance of children among the analyzed patients, because all of them were admitted to the hospital to treatment because the recommended protocol of the Service.

Artemisinin-based therapies rapidly (~ 2 days) clear the asexual parasitaemia, which are responsible for the clinical picture, rendering this medication the choice for the treatment of *falciparum* malaria. This study showed more than 75% reduction in asexual parasitaemia clearance rates during the first three days of treatment, reaching 98.3% until D4. Delayed negative asexual parasitaemia, between D5 and D10, was observed in only 1.7% of the cases.

The delay of the asexual parasitaemia clearance, by itself, can suggest resistance to this compound, but does not necessarily indicate failure of the artemisinin treatment(13); it is also necessary to detect associated genetic mutations. However, the K13 polymorphism had not been detected in *P. falciparum* parasites from Brazilian endemic areas (20). Taken together, our findings and those from Gomes et al. (2018) (20) make us to suppose that there is no evidence of declining artemisinin-regimen effectiveness in Northern Brazil during the first decade of its use. Although worldwide there have been reports of decreased artemisinin-derivative susceptibility (21,22), sensitivity of *P. falciparum* and treatment effectiveness remain high in Brazil (23). It is important to register that the control of the clearance of the asexual parasitaemia is a tool to evaluate the emergence of *P. falciparum* resistance to antimalarial compounds.

Although artesunate monotherapy was highly effective in clearing asexual blood-stage parasitaemia, a good response was also observed with the ASMQ treatment. Similar clearance to this combination therapy was previously reported in the Peruvian Amazon (24). In addition, Ladeia-Andrade et al. (2016)(9) defined the use of ASMQ fixed-dose combination as the firstline regimen to treat *P. falciparum* in the Juruá Valley, a Brazilian region with high transmission of *P. falciparum*, where the authors showed no molecular evidence of resistance to AS and MQ during the 2010 to 2013 period.

It is worth mentioning that these results reflect the first decade of artemisinin-based therapy use in Northern Brazil, and current monitoring should be performed to evaluate the present situation in the region. Studies using artemether (25) and artesunate (26) monotherapy in Suriname, published in 2013 and 2016 respectively, a neighboring region from Brazil, raised the suspicion of resistance to this compound.

In addition, several studies have reported *P. falciparum* resistance to artemisinin derivatives in Southeast Asia, which is of great concern, as there is no alternative as effective as artemisinin, and the spread of resistance throughout the world would be catastrophic (17, 25). This study compared the efficacy of artemether-lumefantrine, evaluating the clearance of parasitaemia up to D3, with another study conducted in the period 2005 - 2006 to detect the appearance of resistance to artemether. Findings may represent emerging resistance of *Plasmodium* to artemether in a country outside the emerging region of resistance, Asia, which causes great concern because it is an area with a history of malaria infection, and also because it is a gold mining area (25).

Although the main focus is the asexual parasitaemia, because it is responsible for the clinical symptoms of the disease, we also analysed the presence at admission and the emergence of sexual forms during the follow-up. The gametocyte is the transmission form from human host to mosquitoes (6). Therefore, the understanding of the influence of gametocytaemia and gametocidal properties of antimalarial compounds is of great relevance for actions aimed at reducing malaria transmission. Herein, we observed a relatively high proportion, 47% (748/1,593), of individuals with gametocytes, but there was no correlation between the different treatment regimens and sexual parasitaemia clearance. On the other hand, overall, 12.3% of enrolled patients had gametocytaemia at admission, and this gametocyte presence at early phase of treatment (day 0) seems to influence the malaria clearance (data not show).

It is noteworthy that in our cohort we were able also to observe sexual parasitaemia after D3 until D35. Artemisinin and its derivatives do attenuate the growth of young parasites *in vitro* and increase the clearance of ring forms *in vivo*. The artemisinin derivatives are a first-line antimalarial compounds that act only on the early stage of the gametocytes. Thus, in combined therapies the sexual parasitaemia clearance depends on mefloquine, since this antimalarial compound is cleared slowly as its half-life elimination is 2 to 3 weeks (27). This finding can explain the increased gametocyte carriage during treatment, to be removed in the third and subsequent post-treatment replication cycles (28). So, as gametocytes are the forms that are taken up by and infect the anopheline mosquitoes, to maintain the Plasmodium life cycle, artemisinin and its derivatives do not prevent this transmission (29). This is an important finding for public health, as the effect of antimalarial compounds in reducing gametocyte carriage plays a role in malaria control. For information purposes, although primaquine was not evaluated in this study because it was an exclusion criteria, during the period of the study of this cohort, there was already a national recommendation for its use with aim of eliminating the gametocytes.

Several factors may have contributed to recurrence, observed only in patients receiving artemisinin-derivative monotherapy. Noncompliance could explain these treatment failures, however the dispensing of drugs was assisted because the enrolled patients were hospitalized during their follow-up. In addition, the deaths were observed only in the group of patients with pure *P. falciparum* infection receiving artemisinin-derivative monotherapy. Thus, our results suggest that the combined therapy with mefloquine prevented recurrences and deaths, possibly because mefloquine remains longer in the bloodstream due to its greater elimination half-life, in contrast to artemisinin derivatives that are rapidly eliminated (half-life about 16 hours).

Among the patients who did not progress to death, 93% presented negative assexual

parasitaemia after treatments. Differently, all patients who progress to death presented positive asexual parasitaemia until the last day of life and died until D7. So, even though the parasitaemia at D0 was lower in patients who died (4,080/ μ L) than those who surveilled (15,647/ μ L), it had been persistent. In addition, 30% of patients who died (3/10) presented gametocytes at admission compared to all enrolled patients (12.3%).

Co-infection with *P. vivax* was detected in 10% of the enrolled patients, which increased over the years, since a greater number of cases was observed in the second sexenium. In the last decade, the world has seen a significant decline in the number of malaria cases, accompanied by an increase of malaria *vivax* / malaria *falciparum* ratio. Mohapatra et al. (2012) (30) demonstrated that *P. vivax* infection may be protective when coexisting with *P. falciparum*, with less severe disease and a lower level of parasitaemia than it was observed in infections caused only by *P. falciparum* (30).

CONCLUSION

In spite of the limitations, because it is a retrospective study involving observation for a long period of time and with information retrieved from medical record books, this study is the largest series of cases with patients treated with artemisinin-based therapies, which have already been described in the Amazon region. This study showed stable levels of *P. falciparum* sensitivity to artemisinin derivatives in the Amazon region over a period of 12 years. In conclusion, our findings do not evidence the occurrence of *P. falciparum* resistance to artemisinin derivatives in the assessed period; however, routine monitoring of artemisinin should continue, so that the first signs of resistance are detected early.

List of abbreviations

ACTs: Artemisinin-based combination therapies; IV: Intravenous; IM: intramuscular; ATM: artemether; AS: artesunate; MQ: mefloquine; RAS: rectal artesunate suppositories; Pf: *Plasmodium falciparum*; Pv: *Plasmodium vivax*.

Ethics approval and consent to participate

The study was in accordance with the ethical standards of the declaration of Helsinki and approved by the institution's ethics committee (CEP/FMT-HVD CAAE number: 46481215.2.0000.0005).

Consent for publication

Not applicable

Availability of data and material

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

Study conception and design: MVGL, WMM and SSW. Acquisition of data: RMP, SCC, KM and RTP. Analysis and interpretation of data: AFP, RPM, LRC, WDA, MGCA and SSW.

Drafting of manuscript: RMP, SSW, KM, AFP and RTP. Critical revision: WMM, RPM, MVGL.

Acknowledgements

We thank Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) for the support of English

language revision by EDITAL PROPP/UFMS 111/2018. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Finance Code 001. RMP and KM receive scholarship from CAPES.

REFERENCES

1. WHO. Global technical strategy for malaria 2016–2030. Geneva: World Health Organization; 2015. p. 1-32.
2. WHO. Guidelines for the Treatment of Malaria. Third Edition. Geneva: World Health Organization; 2015. p. 1-316.
3. Banek K, Webb EL, Smith SJ, Chandramohan D, Staedke SG. Adherence to treatment with artemether–lumefantrine or amodiaquine–artesunate for uncomplicated malaria in children in Sierra Leone: a randomized trial. *Malar J.* 2018; 17: 222.
4. WHO. Status report on artemisinin and ACT resistance. Geneva: World Health Organization; 2017. p. 1-11.
5. Ippolito MM, Johnson J, Mullin C, Mallow C, Morgan N, Wallender E, et al. The relative effects of artemether-lumefantrine and non-artemisinin antimalarials on gametocyte carriage and transmission of *Plasmodium falciparum*: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2017; 65: 486-94.
6. Wampfler R, Mwingira F, Javati S, Robinson L, Betuela I, Siba P, et al. Strategies for detection of *Plasmodium* species gametocytes. *PLoS One.* 2013; 8: e76316.
7. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau, JL, Tauil, PL, Daniel-Ribeiro, CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J.* 2010; 9: 115.
8. Souza JM. Epidemiological distribution of *Plasmodium falciparum* drug resistance in Brazil and its relevance to the treatment and control of malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992; 87(3): 343-8.
9. Ladeia-Andrade S, de Melo GN, de Souza-Lima RC, Salla LC, Bastos MS, Rodrigues PT, et al. No clinical or molecular evidence of *Plasmodium falciparum* resistance to artesunate-mefloquine in northwestern Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2016; 95: 148-54.

10. Dondorp AM, Smithuis FM, Woodrow C, Seidlein LV. How to contain artemisinin and multidrug-resistant falciparum malaria. *Trends Parasitol.* 2017; 33(5): 353-363.
11. Amato R, Lim P, Miotto O, Amaratunga C, Dek D, Pearson RD, et al. Genetic markers associated with dihydroartemisinin- piperazine failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a genotype-phenotype association study. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17: 164-73.
12. Dondorp AM. New genetic marker for piperazine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17: 119-20.
13. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning, J. et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med.* 2009; 361: 455-67.
14. MalERA. A research agenda for malaria eradication: basic science and enabling technologies. *PLoS Med.* 2011; 8: e1000399.
15. Noedl H, Se Y, Schaefer K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM, et al. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med.* 2008; 359: 2619-20.
16. Musset L, Pelleau S, Girod R, Ardillon V, Carvalho L, Dusfour I, et al. Malaria on the Guiana Shield: a review of the situation in French Guiana. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014; 109: 525-33.
17. Tun KM, Imwong M, Lwin KM, Win AA, Hlaing TM, Hlaing T, et al. Spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Myanmar: A cross-sectional survey of the K13 molecular marker. *Lancet Infect Dis.* 2015; 15: 415-21.
18. Rabinovich RN, Drakeley C, Djimde AA, Hall F, Hay SI, Hemingway J, et al. An updated research agenda for malaria elimination and eradication. *PLoS Med.* 2017; 14: e1002456.

19. Menard D, Dondorp A. Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017; 7: a025619.
20. Gomes LR, Lavigne A, Peterka CL, Brasil P, Menard D, Daniel-Ribeiro CT, et al. Absence of K13 polymorphism in *Plasmodium falciparum* parasites from Brazilian endemic areas. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62: 354-18.
21. Woitsh B, Wernsdorfer G, Prajakwong S, Rojanawatsirivet C, Kollaritsch H, Wernsdorfer WH. 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.
22. Wongsrichanalai C, Meshnick SR. Declining artesunate-mefloquine efficacy against *falciparum* Malaria on the Cambodia-Thailand border. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14: 716-9.
23. Ferreira ID, Lopes D, Martinelli A, Ferreira C, do Rosario VE, Cravo P. In vitro assessment of artesunate, artemether and amodiaquine susceptibility and molecular analysis of putative resistance-associated mutations of *Plasmodium falciparum* from Sao Tome & Principe. *Trop Med Int Health.* 2007; 12: 353-62.
24. de Oliveira AM, Chavez J, de Leon GP, Durand S, Arrospide N, Roberts J, et al. Efficacy and effectiveness of mefloquine and artesunate combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 85: 573-8.
25. Vreden SGS, Jitan JK, Bansie RD, Adhin MR. Evidence of an increased incidence of day 3 parasitaemia in Suriname: an indicator of the emerging resistance of *Plasmodium falciparum* to artemether. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013; 108: 968-73.

26. Vreden SGS, Bansie RD, Jitan JK, Adhin MR. Assessing parasite clearance during uncomplicated *Plasmodium falciparum* infection treated with artesunate monotherapy in Suriname. *Infect Drug Resist.* 2016;9:261-7.
27. Looareesuwan S, Wilairatana P, Chalermarent K, Rattanapong Y, Canfield CJ, Hutchinson. Efficacy and safety of atovaquone/proguanil compared with mefloquine for treatment of acute *Plasmodium falciparum* malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60: 526-32.
28. Carrara VI, Zwang J, Ashley EA, Price RN, Stepniewska K, Barends M, 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: e4551.
29. Bousema JT, Schneider P, Gouagna LC, Drakeley CJ, Tostmann A, Houben R, et al. Moderate effect of artemisinin-based combination therapy on transmission of *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis.* 2006; 193: 1151-9.
30. Mohapatra MK, Dash LK, Bariha PK, Karua PC. Profile of mixed species (*Plasmodium vivax* and *falciparum*) malaria in adults. *J Assoc Physicians India.* 2012; 60: 20-4.

TABLE I. Comparative epidemiological profile between infection types (1991 to 2002)

Variables	<i>P falciparum</i>	<i>P falciparum plus P vivax</i>	Total (%)	<i>P-value*</i>
	Number of cases			
Number of patients	1432	161	1593 (100)	< 0.0001
Age group¹				
1	391	73	464 (29)	
2	191	18	209 (13)	
3	261	22	283 (18)	
4	156	15	171 (11)	
5	114	7	121 (8)	< 0.0001
6	71	7	78 (5)	
7	54	3	57 (4)	
8	13	5	18 (1)	
9	181	11	192 (12)	
Gender				
male	803	83	886 (56)	0.32
female	623	76	699 (44)	
Year				
1991	28	2	30 (2)	
1992	44	4	48 (3)	
1993	103	3	106 (7)	
1994	92	5	97 (6)	
1995	114	24	138 (9)	
1996	154	18	172 (11)	0.006
1997	119	13	132 (9)	
1998	169	13	182 (11)	
1999	311	38	349 (22)	
2000	156	26	182 (11)	
2001	63	3	66 (4)	
2002	79	12	91 (6)	

¹The enrolled patients were stratified prospectively into nine age groups: 1 = ≤ 9 years; 2 = 0-19 years; 3 = 20-29 years; 4 = 30-39 years; 5 = 40-49 years; 6 = 50-59 years; 7 = 60-69 years; 8 = 70-79 years and 9 = older than 80 years.

* chi square test.

TABLE II. Asexual parasite clearance profile during 35-day follow-up (1991 to 2002)

Follow-up (days) ¹	AS		ASMQ		ATM		ATMMQ		RAS		Total
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	%
D1	163	16.9	12	8.9	31	9.7	4	4.3	8	18.6	14
D2	517	53.5	69	5.1	153	48.1	35	38	25	58.1	51.4
D3	210	21.7	39	28.9	98	30.8	40	43.5	5	11.6	25.2
D4	60	6.2	13	9.6	31	9.7	11	12	3	7	7.6
Subtotal (D0-D4)	950	98.3	133	98.5	313	98.4	90	97.8	41	95.3	98.3
D5	12	1.2	1	0.7	4	1.3	1	1.1			1.2
D6	2	0.2			1	0.3			2	4.7	0.3
D7	1	0.1									0.1
(D7-D10)	1	0.1	1	0.7				1.1			0.2
Subtotal (D5-D10)	16	1.7	2	1.5	5	1.6	2	2.2	2	4.7	1.7
Total (D0-D35)	966	62.2	135	8.7	318	20.5	92	5.9	43	2.9	100

¹Follow-up days: of treatment: D: day; 0-day (D0) at baseline treatment, 1-day until 7-day D1, D2, D3, D4, D5, D6 and D7), 14-day (D14), 21-day (D21), 28-day (D28) and 35-day (D35). AS (artesunate); ASMQ (artesunate plus mefloquine); ATM (artemether); ATMMQ (artemether plus mefloquine) and RAS (rectal artesunate suppositories).

TABLE III. Prevalence of sexual parasite (gametocytes) during 35-day follow-up (1991 to 2002)

Onset of gametocytes	Number of patients with gametocytes	
	N°	%
D0	196	12.3
D1	218	13.7
D2	195	12.2
D3	86	5.4
D4	28	1.8
D5	13	0.8
D6	5	0.3
D7	2	0.1
D14	0	0
D21	1	0.06
D28	3	0.2
D35	1	0.06
Total	748	47

¹Follow-up days of treatment: D: day; 0-day (D0) at baseline treatment, 1-day until 7-day (D1, D2, D3, D4, D5, D6 and D7), 14-day (D14), 21-day (D21), 28-day (D28) and 35-day (D35).



Figure 1. Flowchart of the study.

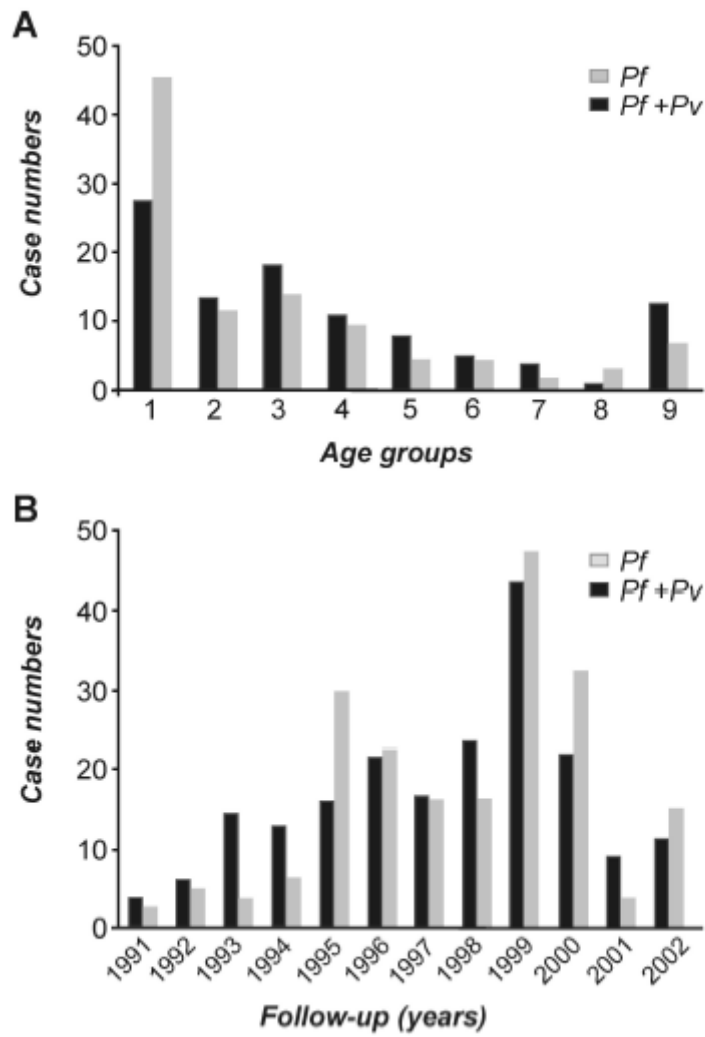


Figure 2. Distribution of case numbers according to age range groups and year. Results were considered statistically significant when p -values were ≤ 0.05 by chi-square test. (A) (p -value < 0.0001). (B) (p -value = 0,006).

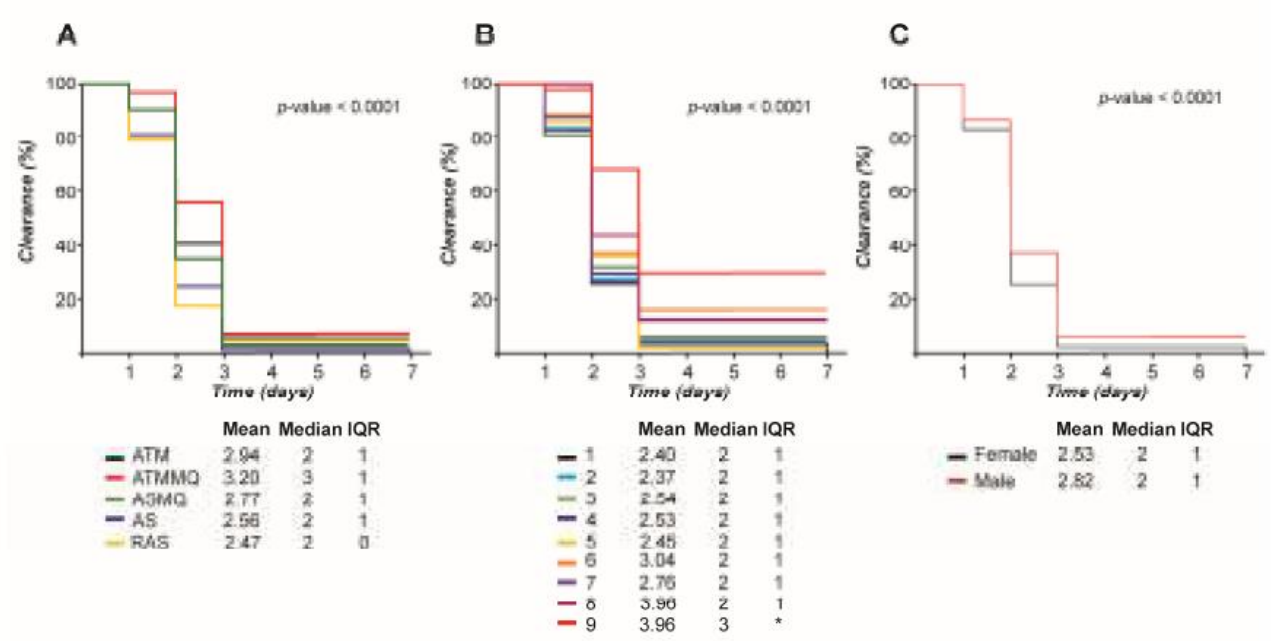


Figure 3. Comparison of the time for clearance of asexual parasite regarding to five artemisinin-based regimens (**Figure 3A**), age groups (**Figure 3B**) and gender (**Figure 3C**) generated by the Kaplan-Meier survival plot.

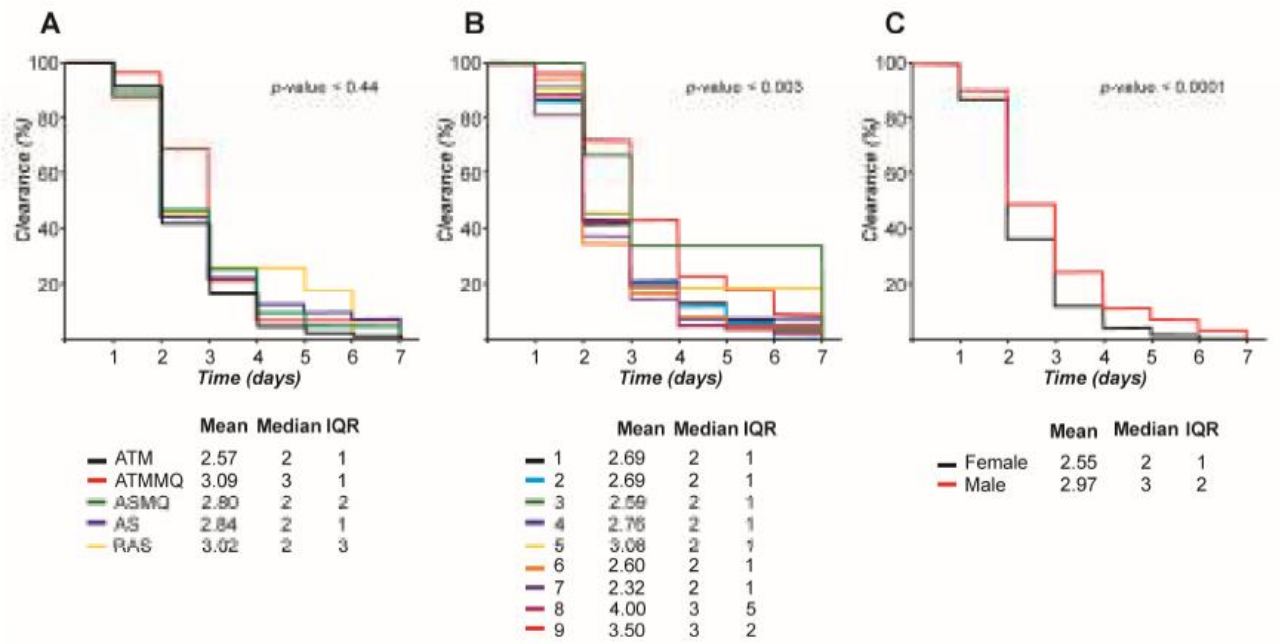


Figure 4. Comparison of the time for clearance of sexual parasite (gametocytes) regarding to five artemisinin-based regimens (**Figure 4A**), age groups (**Figure 4B**) and gender (**Figure 4C**) generated by the Kaplan-Meier survival plot.

Conclusão

5 CONCLUSÕES E CONTRIBUIÇÕES

Este estudo mostrou níveis estáveis de sensibilidade do *P. falciparum* aos derivados de artemisinina na região amazônica em um período de 11 anos. Isso deve aos esforços das campanhas e ações para conter e erradicar a malária. Mas isso não é uma tarefa fácil. Na última década, o mundo vislumbrou significativo declínio no número de casos de malária por *P. falciparum*, melhorias na gestão de casos, o aumento de escala das intervenções de controle de vetores e outras estratégias preventivas estão entre os fatores-chave que têm contribuído para esta melhora.

O recente surgimento de resistência à artemisinina e a sua potencial propagação têm ameaçado reverter os benefícios acumulados. A monitorização de rotina da eficácia terapêutica de ACTs é essencial para mudanças oportunas na política de tratamento e pode ajudar a detectar precocemente alterações na susceptibilidade *P. falciparum* frente aos medicamentos antimaláricos. A OMS recomenda acompanhamento da eficácia da primeira linha e de segunda linha das ACTs a cada dois anos em todos os países onde a infecção por *P. falciparum* é endêmica.

A análise de sobrevivência comparando os tratamentos mostrou não haver associações entre as variáveis envolvidas e o tempo de clareamento. A regressão logística aponta faixa etária e presença de esquizontes como fatores associados ao clareamento tardio.

Portanto, conclui-se que nos primeiros 11 anos de utilização da artemisinina e seus derivados na região amazônica, a mesma se manteve eficaz. Os achados apresentados não evidenciam a ocorrência de resistência de *P. falciparum* aos derivados de artemisinina no período avaliado, contudo a monitorização de rotina às ACTs deve continuar a fim de que os primeiros sinais de resistência sejam detectados precocemente.

Resultados obtenidos durante o Mestrado

6 RESULTADOS OBTIDOS DURANTE O MESTRADO

Artigo completo publicado em periódico

Julia Cavalcante do Carmo ; Pryssila de Souza Klippel ; CORDEIRO, S. C. ; FERNANDES, A. M. D. S. ; PINTO, R. M. ; WEBER, SIMONE SCHNEIDER ; REZENDE, C. F. . Molecular typing of human platelet antigens in immune thrombocytopenia patients in northern Brazil. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (Impresso), v. 40, p. 5-10, 2017.

Resumos publicados em anais de congressos

CORDEIRO, S. ; Vanlei Gonçalves ; Pryssila de Souza Klippel ; Raquel Medeiros Pinto ; PARENTE, A. F. A. ; WEBER, Simone Schneider . Triagem molecular de portadores assintomáticos de Plasmodium sp em candidatos à doação de sangue na FHMOAM. In: Congresso Naciobal Multidisciplinar da Saúde, 2016, Goiânia. Congresso Nacional Multidisciplinar da Saúde, 2016. v. 1.

Pryssila de Souza Klippel ; Julia Cavalcante do Carmo ; CORDEIRO, S. C. ; Cintia Nicácio Portela ; Raquel Medeiros Pinto ; FERNANDES, A. M. D. S. ; REZENDE, C. F. ; WEBER, Simone Schneider . Antígenos plaquetários humanos associados ao risco de aloimunização. In: Congresso Naciobal Multidisciplinar da Saúde, 2016, Goiânia. Congresso Naciobal Multidisciplinar da Saúde, 2016.

Participação em eventos

52º Congresso Brasileiro de Medicina Tropical, 2016. Apresentação de Poster / Painel - Clareamento parasitário de Plasmodium falciparum em resposta ao tratamento com artemisinina.

52º Congresso Brasileiro de Medicina Tropical, 2016. Apresentação de Poster / Painel - Metodologia Molecular para Detecção do Risco de Malária Transmitida por Transfusão

III Curso Teórico de Redação Científica da Universidade do Estado do Amazonas, 2015.

. XX Seminário Laveran & Deane sobre Malária, 2015. Apresentação oral - Clareamento parasitário de Plasmodium falciparum em resposta ao tratamento com artemisinina.

Participação em Banca

Banca de Trabalho de Conclusão de Curso de Ketlen Santos Oliveira. Análise diagnóstica e terapêutica de infecções do trato urinário em pacientes pediátricos, 2017. Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amazonas.

Referências Bibliográficas

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organização Mundial de Saúde. World Malaria Report 2015. WHO. 2015.
2. Organização Mundial de Saúde. Global Technical Strategy for Malaria 2016–2030. WHO. 2015.
3. Organização Mundial de Saúde [homepage na internet]. Global Malaria Mapper [05/08/2016]. Disponível em: <http://worldmalaria-report.org/node/68>
4. Organização Mundial de Saúde. World Malaria Report 2016. WHO. 2016.
5. Braz RM, Duarte EC, Tauil PL. Caracterização das epidemias de malária nos municípios da Amazônia Brasileira em 2010. *Cad Saude Publica*. 2013;29(5):935–44.
6. Silva RDSU Da, Carvalho FT De, Santos AB Dos, Ribeiro EDS, Cordeiro KDM, Neiva GIBDME, et al. Malária no Município de Cruzeiro do Sul, Estado do Acre, Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 2012;3(1):45–54.
7. Ferreira GM, Zan RA, Ramos LJ, Sousa RAAR, Meneguetti DUDO. Panorama epidemiológico da malária no município de Ariquemes, Rondônia, Amazônia Ocidental : um inquérito de seis anos (2005 a 2010). *Rev Epidemiol e Control Infecção*. 2012;2(4):128–32.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Brasília; 2015.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária – PNCM. Série C. Brasília 2003.
10. Amazon Malaria Initiative (AMI) [homepage na internet]. RAVREDA [17/10/2016]. Disponível em: <http://www.usaidami.org/portugues/sobre-ami.shtml#sthash.6QGRIztz.dpbs>
11. Ministério da Saúde [homepage na internet]. AMI+RAVREDA [17/10/2016]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/12191-ami-ravreda>
12. Crompton PD, Pierce SK, Miller LH. Advances and challenges in mmalaria vaccine development. *The Journal of Clinical Investigation*. 2010; 120 (12): 4168 – 4178.
13. Su X, Hayton K, Wellems TE, Walliker D. Genetic linkage and association analyses for trait mapping in. 2007;8(July):497–506.
14. Leite FHA, Da Fonseca AL, Nunes RR, Comar Júnior M, Varotti FDP, Taranto AG. Malaria: From old drugs to new molecular targets. *BBR – Biochem Biotechnol Reports*. 2013;2(4):59–76.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. 2nd ed. Brasília; 2009. 112 p.

16. Aly ASI, Vaughan AM, Kappe SHI. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annu Rev Microbiol.* 2009;63(115):195–221.
17. Gomes AP, Vitorino RR, Costa ADP, Mendonça EG De, Oliveira MGDA, Siqueira-Batista R. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2011;23(3):358–69.
18. Garcia CR, Markus RP, Madeira L. Tertian and quartan fevers: temporal regulation in malarial infection. *J Biol Rhythms.* 2001;16(321):436–43.
19. Staines HM, Krishna S. Treatment and Prevention of Malaria: antimalarial drug chemistry, Action and use [Internet]. Staines HM, Krishna S, editors. Basel: Springer Basel; 2012. 189 p.
20. Sweetman SC. Martindale: The complete drug reference. 34th ed. London: Pharmaceutical Press; 2005. 444-463 p.
21. Rang, H P, Dale, M M, Ritter, J M, Moore PK. Farmacologia. 5 (3° tira. Rio de Janeiro; 2005. 865 p.
22. França TCC, Dos Santos MG, Figueroa-Villar JD. Malária: Aspectos históricos e quimioterapia. *Quim Nova.* 2008;31(5):1271–8.
23. Melo YFC. Avaliação in vitro da sensibilidade do *P. falciparum* aos antimaláricos, pelo Elisa com captação da proteína 2 rica em histidina. Universidade do Estado do Amazonas; 2005.
24. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de terapêutica de Malária. Brasília; 2001. 104 p.
25. Biamonte MA, Wanner J, Le Roch KG. Recent advances in malaria drug discovery. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013 May;23(10):2829–43.
26. Woodrow CJ, Krishna S. Antimalarial drugs: Recent advances in molecular determinants of resistance and their clinical significance. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(14):1586–96.
27. Couto ÁA, Calvosa VS, Santos MA, Souza JM de. Evolução temporal da resistência in vitro do *Plasmodium falciparum* às drogas antimaláricas em duas áreas da Amazônia brasileira com distintas características sócio-econômicas e geográficas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1995;28(4):357–65.
28. Maguire JD, Sumawinata IW, Masbar S, Laksana B, Prodjodipuro P, Susanti I, et al. Chloroquine-resistant *Plasmodium malariae* in South Sumatra, Indonesia. *Lancet.* 2002;360(9326):58–60.
29. Sinha S, Medhi B, Sehgal R. Challenges of drug-resistant. *Parasite.* 2014;21:61.
30. Organização Mundial de Saúde . Chemotherapy of Malaria – WHO Scientific Group. Geneva; 1967.
31. Organização Mundial de Saúde. Chemotherapy of Malaria. Second edition. Geneva: World Health Organization Monograph Series. No. 27. 1986. P. 261.

32. Organização Mundial de Saúde . Global Antimalarial Drug Efficacy and Drug Resistance: 2000-2010. 2010 Aug.
33. Chiyaka C, Garira W, Dube S. Effects of treatment and drug resistance on the transmission dynamics of malaria in endemic area. *Theor Popul Biol. Elsevier Inc.*; 2009;75(1):14–29.
34. Meshnick SR. Why does quinine still work after 350 years of use? *Parasitol Today*. 1997;13(3):89–90.
35. Gama BE, Lacerda MVG, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz M de F. Chemoresistance of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasites in Brazil: Consequences on disease morbidity and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(SUPPL. 1):159–66.
36. Packard RM. The Origins of Antimalarial-Drug Resistance. *N Engl J Med*. 2014 Jul 31;371(5):397–9.
37. Talisuna AO, Bloland P, D’Alessandro U. History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance. *ClinMicrobiolRev*. 2004;17(0893-8512 (Print)):235–54.
38. Gama BE, de Oliveira NKA, Zalis MG, de Souza JM, Santos F, Daniel-Ribeiro CT, et al. Chloroquine and sulphadoxine-pyrimethamine sensitivity of *Plasmodium falciparum* parasites in a Brazilian endemic area. *Malar J*. 2009;8:156.
39. Gardiner DL, McCarthy JS, Trenholme KR. Malaria in the post-genomics era: light at the end of the tunnel or just another train? *Postgrad Med J*. 2005;81(958):505–9.
40. Gregson A, Plowe C V. Mechanisms of Resistance of Malaria Parasites to Antifolates. 2005;57(1):117–45.
41. Daniel EPSK, Gomes LR, Gama BE, Oliveira NKA De, Fortes F, Ménard D, et al. Low – grade sulfadoxine – pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* parasites from Lubango , Angola. *Malar J. BioMed Central*; 2016;1–6.
42. Fernandes N, Cravo P, Rosário V. Resistência à sulfadoxina-pirimetamina em Maputo, Moçambique: presença de mutações nos genes dhfr e dhps do *Plasmodium falciparum* - Sulfadoxine-pyrimethamine resistance in Maputo, Mozambique: presence of mutations in the dhfr and dhps genes of *Plasmodium falciparum*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(4):447–50.
43. Pinheiro PNEA. Quimioterapia da malária causada por *Plasmodium falciparum*. *Rev Quim*. 2013;1–5.
44. White NJ. The Treatment of Malaria. *N Engl J Med*. 1996;335(11):800–6.
45. Mesquita EA. Determinantes moleculares da resistência do *Plasmodium falciparum* a drogas antimaláricas na região da Amazônia Ocidental. 2011, 136f. Tese (Pós Graduação em Biologia Experimental da Universidade Federal de Rondônia) – Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho.

46. Wongsrichanalai C, Prajakwong S, Meshnick SR, Shanks GD, Thimasarn K. Mefloquine – its 20 years in the Thai Malaria Control Program. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2004;35(2):300–8.
47. Ferreira C de O. Análise do perfil genético de marcadores de resistência a antimaláricos em isolados de campo de *P. falciparum* e *P. vivax* de 12 localidades malarígnas do Estado do Amazonas. Universidade Federal do Amazonas; 2007.
48. Tu Y. The discovery of artemisin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nature Medicine*. 2011;17(10):1217–20.
49. Vale N, Moreira R, Gomes P. Quimioterapia da malária. *Química – Sociedade Portuguesa de Química*. 2005 Dec;57–69.
50. Baraldi R, Isacchi B, Predieri S, Marconi G, Vincieri FF, Bilia AR. Distribution of artemisinin and bioactive flavonoids from *Artemisia annua* L. during plant growth. *Biochem Syst Ecol*. 2008;36(5-6):340–8.
51. Dhingra V, Vishweshwar Rao K, Lakshmi Narasu M. Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. *Life Sci*. 2000;66(4):279–300.
52. Aguiar AC, Rocha EM, Souza NB, Franca TC, Krettli AU. New approaches in antimalarial drug discovery and development: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(7):831–45.
53. Jain DC, Mathur AK, Gupta MM, Singh AK, Verma RK, Gupta AP, et al. Isolation of high artemisinin-yielding clones of *Artemisia annua*. *Phytochemistry*. 1996;43(5):993–1001.
54. Balint G a. Artemisinin and its derivatives: an 70rtemisini new class of antimalarial 70rtemis. *Pharmacol Ther [Internet]*. 2001;90(2-3):261–5.
55. Taranto AG, Carneiro J, Araujo M, Silva B. Estudos sobre o mecanismo de ação da artemisina e dos endoperóxidos, a mais nova classe de agentes antimaláricos – Parte 1. *Sitientibus*. 2006;(34):47–58.
56. Bilia AR, Melillo de Malgalhaes P, Bergonzi MC, Vincieri FF. Simultaneous analysis of 70rtemisinina and flavonoids of several extracts of *Artemisia annua* L. obtained from a 70rtemisin sample and a selected cultivar. *Phytomedicine*. 2006;13(7):487–93.
57. Van Agtmael MA, Eggelte TA, Van Boxtel CJ. Artemisinin drugs in the treatment of 70rtemis: From medicinal herb to registered medication. *Trends Pharmacol Sci*. 1999;20(5):199–205.
58. Costa MS, Kiralj R, Ferreira MM. Estudo teórico da interação existente entre a artemisinina e o heme. *Quim. Nova*. 2007; 30(1): 25-31.
59. Noedl H. Artemisinin resistance: How can we find it? *Trends Parasitol*. 2005;21(9):404–5.
60. Duffy PE, Sibley CH. Are we losing 70rtemisinina combination therapy already? *Lancet*. 2005;366(9501):1908–9.

61. Woodrow CJ. Artemisinins. *Postgrad Med J* [Internet]. 2005 Feb 1;81(952):71–8.
62. Doherty JF, Sadiq AD, Bayo L, Allouche A, Olliaro P, Milligan P, et al. A randomized safety and tolerability trial of artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine versus sulfadoxine-pyrimethamine alone for the treatment of uncomplicated 71rtemis in Gambian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1999;93(5):543–6.
63. Sinclair D, Zani B, Donegan S, Olliaro P, Garner P. Artemisinin-based combination therapy for treating uncomplicated 71rtemis (Review). 2009;(4).
64. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, et al. Artemisinin Resistance in. *N Engl J Med* [Internet]. 2009;361(5):455–67.
65. Noedl H, Se Y, Schaefer K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM. Evidence of Artemisinin-resistant 71rtemis in Western Cambodia. *N Engl J Med* [Internet]. 2008;359(24):2619–20.
66. Hawkes M, Conroy AL, Opoka RO, Namasopo S, Zhong K, Conrad Liles W, et al. Slow clearance of *Plasmodium falciparum* in severe pediatric 71rtemis, Uganda, 2011–2013. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(7):1237–9.
67. Hastings IM, Kay K, Hodel EM. How robust are 71rtemis parasite clearance rates as indicators of drug effectiveness and resistance? *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(10):6428–36.
68. Dhorda M, Cheah PY, Pukrittayakamee S, Ashley EA, Anderson TJC, Nair S, et al. Spread of 71rtemisinina-resistant *Plasmodium falciparum* in Myanmar: A cross-sectional survey of the K13 molecular marker. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(4):415–21.
69. Leang R, Taylor WRJ, Bouth DM, Song L, Tarning J, Char MC, et al. Evidence of falciparum 71rtemis multidrug resistance to 71rtemisinina and piperazine in western Cambodia: dihydroartemisinin-piperazine open-label multicenter clinical assessment. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2015;59(8):2–5.
70. World Health Organization. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy [Internet]. World Health Organization. 2009. 90 p.
71. WWARN Artemisinin based Combination Therapy (ACT) Africa Baseline Study Group. Clinical determinants of early parasitological response to ACTs in African patients with uncomplicated falciparum 71rtemis: a literature review and meta-analysis of individual patient data. *BMC medicine* [Internet]. 2015;212.
72. Flegg JA, Guerin PJ, White NJ, Stepniewska K. Standardizing the measurement of parasite clearance in falciparum 71rtemis: the parasite clearance estimator. *Malar J* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2011;10(1):339.
73. World Health Organization. Global Plan for Artemisinin Resistance Containment (GPARC). World Health Organization. 2011. 1-95 p.

74. Karunajeewa H a. Parasite clearance after 72rtemis therapy: staying a step ahead of drug resistance. *BMC Med* [Internet]. *BMC Medicine*; 2015;13(1):251.
75. Muhindo MK, Kakuru A, Jagannathan P, Talisuna A, Osilo E, Orukan F, et al. Early parasite clearance following artemisinin-based combination therapy among Ugandan children with uncomplicated *Plasmodium falciparum*. *Malar J* [Internet]. *Malaria Journal*; 2014;13(1):32.
76. World Health Organization. Status report artemisinin and ACT resistance. 2016.
77. Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, et al. Spread of artemisinin resistant *Plasmodium falciparum* in Myanmar. *N Engl J Med* [Internet]. 2014;371(5):411–23.
78. Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Mao S, Sopha C, et al. Dihydroartemisinin–piperaquine resistance in *Plasmodium falciparum* in Cambodia: a multisite prospective cohort study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;3099(15):1–9.
79. Nguyen TD, Olliaro P, Dondorp AM, Baird JK, Lam HM, Farrar J, et al. Optimum population-level use of 72rtemisinina combination therapies: A modelling study. *Lancet Glob Heal*. Copyright © Nguyen et al. Open Access article distributed under the terms of CC BY; 2015;3(12):e758–66.
80. Arieu F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois A-C, Khim N, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*. *Nature* [Internet]. 2014 Dec 18;505(7481):50–5.
81. Sibley CH. Observing in real time the evolution of 72rtemisinina resistance in *Plasmodium falciparum*. *BMC Med* [Internet]. 2015 Dec 31;13(1):67.
82. Bozdech Z, Ferreira PE, Mok S. A crucial piece in the puzzle of the artemisinin resistance mechanism in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;31(8):345–6.
83. Sibley CH. Understanding drug resistance in malaria parasites: Basic science for public health. *Mol Biochem Parasitol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;195(2):107–14.
84. Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, et al. The effect of 72rtemis 72rtemisini *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature* [Internet]. 2015;526(7572):207–11.
85. United Nations. The Millennium Development Goals Report [Internet]. New York; 2015.
86. Alecrim MGC. *Boletim Epidemiológico*. 2015;1–4.
87. Lanfranchi LM, Viola GR, Nascimento LFC. Uso da regressão de Cox para estimar fatores associados a óbito neonatal em UTI privada. *Rev Paul Pediatr*. 2011;29(2):224-30.

8 ANEXO

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTIMATIVA DO TEMPO DE CLAREAMENTO PARASITÁRIO E FREQUÊNCIA DE RESISTÊNCIA DE *Plasmodium falciparum* AOS ANTIMALÁRICOS

Pesquisador: SIMONE SCHNEIDER WEBER

Área

Temática:

Versão: 2

CAAE: 46481215.2.0000.0005

Instituição Proponente: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.177.858

Data da Relatoria: 07/08/2015

Apresentação do Projeto:

No Brasil, muitos estudos têm relatado resistência do *Plasmodium falciparum* (Pf) a várias drogas, como CQ, sulfadoxina-pirimetamina, mefloquina, quinina e amodiaquina. A vigilância da sensibilidade dos plasmódios às drogas antimaláricas se tornou mundialmente uma ação de importância extrema para a conduta terapêutica, bem como para o planejamento de políticas de controle da malária. Nesse estudo, os dados de pacientes atendidos na FMT-HVD serão classificados de acordo com o antimalárico utilizado e a resposta ao tratamento, de forma a determinar a frequência de resistência aos diferentes antimaláricos, bem como o perfil de clareamento parasitário. Acredita-se que a estimativa da frequência de resistência parasitária para a espécie *P. falciparum* terá um papel importante no controle da disseminação e erradicação da malária *falciparum*. Os resultados obtidos poderão servir de base para estudos futuros referentes aos polimorfismos genéticos associados à diminuição do tempo de clareamento do parasita nas Américas. Trata-se do protocolo referente ao Projeto de Pesquisa Intitulado " ESTIMATIVA DO TEMPO DE CLAREAMENTO PARASITÁRIO E FREQUÊNCIA DE RESISTÊNCIA DE *Plasmodium falciparum* AOS ANTIMALÁRICOS", tendo como pesquisadora responsável Simone Schneider Weber, e como parte do grupo de pesquisa

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

Continuação do Parecer: 1.177.858

Wuelton Marcelo Monteiro, Raquel de Medeiros Pinto e Lucélia Fuziel. O estudo é nacional, e não se trata de Área Temática Especial, não devendo ser apreciado pela CONEP. De acordo com informações na Metodologia Proposta, o estudo tem modelo retrospectivo do tipo série de casos, o qual parte da observação da exposição aos antimaláricos em busca da avaliação do desfecho de interesse, a resistência parasitária. Será realizado no Laboratório de Malária da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, sendo as variáveis seguintes: data do atendimento, sexo, idade, medicamento utilizado, número de leucócitos contados, leucometria, parasitemia sexual e assexual ao diagnóstico (D0) e nos dias de seguimento (D1-D7, D14, D21, D28 e D35). Serão incluídos dados referentes aos pacientes com diagnóstico de (D0), de infecção pelo *P. falciparum* que receberam tratamento e acompanhamento da parasitemia pela gota espessa. Amostra de 4.000 indivíduo, sendo do grupo controle - Sensibilidade = 2.000 e grupo de estudo - Resistência = 2.000

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Estimar, através de estudo retrospectivo, a frequência de resistência de espécies de *P. falciparum* aos antimaláricos e o tempo médio de clareamento parasitário, em pacientes atendidos na FMT-HVD, no período de 1980 até 2015.

Objetivo Secundário:

* Estimar a frequência de resistência parasitária de *Plasmodium falciparum* aos diferentes antimaláricos*
Descrever o perfil de resposta dos parasitos assexuados às drogas esquizotomicidas sanguíneas *
Determinar o tempo de clareamento parasitário e a ocorrência da recrudescência dentro de um período de observação (D0-D35).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: não existe a previsão de riscos associados a este estudo, uma vez que o mesmo é um estudo retrospectivos e não envolve diretamente o sujeito da pesquisa, e sim apenas dados registrados em livros e prontuários. Benefícios: Acredita-se que a estimativa da frequência de resistência parasitária para a espécie *P. falciparum* terá um papel importante no controle da disseminação e erradicação da malária *falciparum*. Os resultados obtidos poderão servir de base para estudos futuros referentes aos polimorfismos

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

Continuação do Parecer: 1.177.858

genéticos associados à diminuição do tempo de clareamento do parasita nas Américas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A proposta é relevante e dentro do contexto, é plenamente factível, portanto, devidamente instruído, está apto para análise.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo deste estudo traz a documentação: 1.folha de rosto da CONEP; 2. carta de anuência do Diretor de Ensino e Pesquisa da FMT-HVD; 3. projeto gerado pela Plataforma Brasil (PB); 4. projeto detalhado; 5. carta de anuência da pesquisadora responsável pelo projeto informando sobre sua participação no desenvolvimento da pesquisa no Centro Internacional de Pesquisa Clínica em Malária da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD); 6. carta de anuência/ declaração de todos os membros do grupo envolvidos na execução da pesquisa; 7. solicitação de dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; 8. currículo Lattes da pesquisadora responsável pelo projeto; 9. cronograma de execução previsto para iniciar em 14/09/2015 com término em 29/01/2016, e orçamento de R\$ 1.500,00. Na folha de rosto da CONEP não consta data e nem assinatura da pesquisadora responsável pelo projeto, e o campo 12 necessita ser preenchido.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

PENDÊNCIA 1. Na folha de rosto da CONEP não consta informação no campo 12. Cargo e ainda no campo Termo de Compromisso, não foi mencionada data e nem consta assinatura da pesquisadora responsável pelo projeto. Diante disso, solicita-se o preenchimento do campo 12 e data e assinatura da pesquisadora responsável pela pesquisa.

RESPOSTA DA PESQUISADORA: Na folha de rosto da CONEP foram preenchido os campos referente ao cargo e termo de compromisso com data e assinatura do pesquisador responsável pelo projeto. A folha de rosto foi novamente anexada on line na Plataforma Brasil, com as devidas alterações.

ANÁLISE: verificou-se que a pesquisadora atendeu conforme solicitação. PENDÊNCIA ATENDIDA.

PENDÊNCIA 2. No item Avaliação dos Riscos e Benefícios do projeto gerado na PB foi mencionado o seguinte " não existe a previsão de riscos associados a este estudo, uma vez que o mesmo é um estudo retrospectivos e não envolve diretamente o sujeito da pesquisa, e sim apenas dados registrados em livros e prontuários". Solicita-se readequação da informação sobre a existência de risco mínimo para o participante da pesquisa, para atender o item V, "Caput" da Resolução No. 466/2012, Conselho Nacional de Saúde.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

Continuação do Parecer: 1.177.858

RESPOSTA DA PESQUISADORA: Com relação ao item Avaliação de risco e Benefícios do projeto, foram realizadas as readequações solicitadas de acordo com a Resolução 466/2012 do CNS. As adequações foram realizadas no protocolo on line da Plataforma Brasil, no item referente à Avaliação de risco do projeto.

ANÁLISE: foi verificado que a pesquisadora atendeu a solicitação. Diante disso, PENDÊNCIA ATENDIDA.

PENDÊNCIA 3. No item Avaliação dos Riscos e Benefícios do projeto gerado pela PB, foi mencionada que a utilização de dados registrados será também de prontuários. Diante disso, solicita-se a inclusão da anuência da Diretoria de Assistência Médica, no protocolo.

RESPOSTA DA PESQUISADORA: A menção de utilização de dados registrados em prontuários foi retirada do item Avaliação de risco e benefícios do projeto, uma vez que não será necessário para o estudo. Assim, desconsideramos a exigência de Anuência da Diretoria de Assistência Médica.

ANÁLISE: observou-se que a pesquisadora fez readequação conforme consta na folha resposta. Sendo assim, PENDÊNCIA ATENDIDA.

PENDÊNCIA 4: inclusão Termo de Compromisso de Utilização de Dados-TECUD.

RESPOSTA DA PESQUISADORA: Foi incluído, on line na PB, o Termo de Compromisso de Utilização de Dados (TECUD), devidamente assinado pelos pesquisadores que terão acesso aos dados de registro, conforme exigência deste CEP.

ANÁLISE: verificou-se que o Termo de Compromisso de Utilização de Dados foi incluído no protocolo, e que consta nomes dos pesquisadores, categoria, RG, Instituição de vínculo e assinatura dos envolvidos na execução da pesquisa. Considera-se a PENDÊNCIA ATENDIDA, mas

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 1.177.858

vale ressaltar que a Resolução CNS em vigor, é a de número 466/2012 que substitui a Resolução CNS no. 196/96 mencionada no referido documento.

PENDÊNCIA 5: Inclusão do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE para os participantes que serão avaliados no ano de 2015, e

PENDÊNCIA 6: Incluir Termo de Assentimento Livre e Esclarecido-TALE para menores de 18 anos, para os participantes que serão avaliados no ano de 2015.

RESPOSTA DA PESQUISADORA: Pendência 5 e 6: A data final da captação de dados para o estudo foi alterada no protocolo da Plataforma, nos itens: Objetivo primário, Metodologia proposta e Desfecho secundário. Foi também incluída no TCUD. Como o estudo será apenas retrospectivo, de 1980 até 2010, desconsideramos a necessidade de TCLE para participantes em 2015, bem como do TALE para menores de 18 anos em 2015.

ANÁLISE: foi verificado que ocorreu readequação das informações conforme mencionado na folha resposta pela pesquisadora. Diante disso, PENDÊNCIA ATENDIDA.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS POR PARTE DA PESQUISADORA: projeto detalhado com as alterações pós -parecer foi anexado novamente na Plataforma Brasil e o antigo foi excluído. ANÁLISE: verificou-se que a informação por parte da pesquisadora é verdadeira.

Diante do exposto, sugere-se que o presente protocolo seja APROVADO.

S.M.J. É o parecer.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 1.177.858

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto está APROVADO e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios parciais e final do estudo, conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

MANAUS, 10 de Agosto de 2015

Assinado por:
Adriana Malheiro
(Coordenador)

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

