

Mais de meio século da investigação de malária no IHMT

More than half a century in the research of malaria in IHMT

Ana Paula Arez

UEIPM/GHTM/IHMT/UNL UEI Parasitologia Médica, GHTM,
Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.
aparez@ihmt.unl.pt

Henrique Silveira

UEIPM/GHTM/IHMT/UNL UEI Parasitologia Médica, GHTM,
Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.
hsilveira@ihmt.unl.pt

Fátima Nogueira

UEIPM/GHTM/IHMT/UNL UEI Parasitologia Médica, GHTM,
Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.
fnogueira@ihmt.unl.pt

Resumo

A malária é uma infeção parasitária transmitida por mosquitos do género *Anopheles*. Cinco espécies do género *Plasmodium* causam doença em seres humanos: *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi* e *P. falciparum* sendo o último, aquele que causa maior mortalidade e morbilidade. Durante as décadas de 1950 e 1960, acreditava-se ser possível a erradicação global da malária, mas os programas de erradicação implementados falharam sucessivamente, exceto na Europa onde, durante a década de 1970 foi possível declarar erradicada a doença. Como consequência da presença histórica de Portugal em áreas endémicas de malária e devido ao facto de que a malária foi também um problema de saúde em Portugal continental, cientistas portugueses nomeadamente do IHMT, tiveram um papel muito relevante no estudo e controlo da malária. O IHMT manteve uma monitorização regular da doença a partir de 1950 em diante, principalmente em Angola, Moçambique e São Tomé e Príncipe. Com fim do domínio colonial e a criação do CMTD em 1992, o estudo da malária no IHMT tornou-se mais orientado para a investigação e menos para o controlo.

Palavras Chave:

Malária, IHMT, resistência aos antimaláricos, interação parasita-hospedeiro, interação parasitavector.

Abstract

Malaria is a parasitic infection transmitted by *Anopheles* mosquitoes. Five species of the genus *Plasmodium* cause disease in humans: *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi* and *P. falciparum* being the last, the one that causes most mortality and morbidity. During 1950s and early 1960s, the global eradication of malaria was believed possible, but the successively implemented eradication programmes failed and eradication was achieved only in Europe and during the 1970's. As a consequence of the historical presence of Portugal in malaria endemic areas and due to the fact that malaria was also a health problem in Portugal, Portuguese scientists namely from IHMT, had a very relevant role in the study and control of malaria. IHMT kept a regular monitoring of the disease from 1950 onward, mostly in Angola, Mozambique and São Tomé e Príncipe. With end of the colonial rule and with the creation of CMTD in 1992, the study of malaria in IHMT took a more research oriented turn.

Key Words:

Malaria, IHMT, antimalarial drug resistance, host-parasite interaction, parasite-vector interaction.

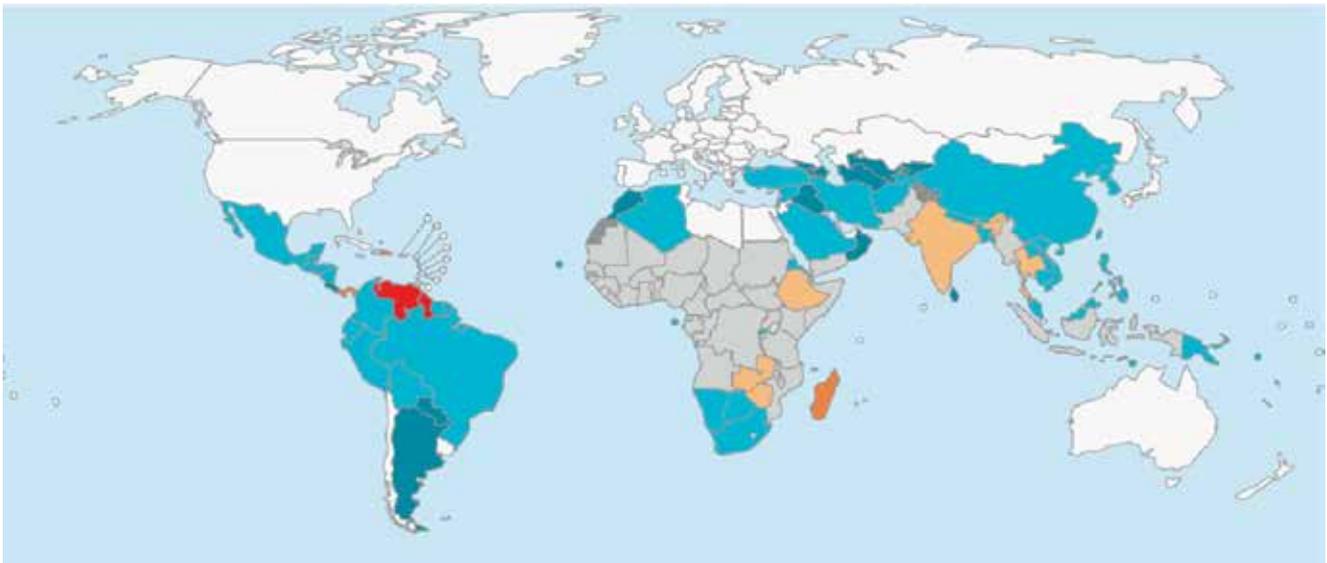


Fig. 1 – Distribuição dos casos de malária entre 2000 e 2013. ► redução do nº de casos para zero desde 2000; ► a caminho da redução de >70% dos casos; ► 50-75% de decréscimo; ► decréscimo de <50%; ► aumento da incidência; ► dados insuficientes; ► não aplicável; ► sem transmissão de malária (adaptado de (4)).

Durante os anos 50 e início da década de 60, acreditava-se possível a erradicação da malária dada a disponibilidade de antimaláricos eficazes para o tratamento dos doentes, inseticidas para interromper a transmissão e a ausência de um reservatório animal para o parasita. Assim, a OMS a fim de erradicar a malária organizou programas em que utilizava a pulverização residual interior e administração em massa de cloroquina (CQ) e pirimetamina (Pyr). Estes esforços globais, levaram à erradicação oficial da malária no continente europeu em 1975 [1].

Em Portugal os programas de erradicação resultaram na interrupção da transmissão em 1958. Em 1973 a erradicação da malária em Portugal é confirmada pela OMS. O Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), e particularmente um dos seus académicos Prof. Cambournac, desempenharam um papel fundamental nesta erradicação.

No entanto, em vastas áreas endémicas, a ausência de infraestruturas de saúde sólidas e organizadas impediam o estabelecimento de uma vigilância eficaz.

No início dos anos 70, os consultores da OMS [2] começam a perceber, devido à ausência do impacto esperado dos programas, que a erradicação na grande maioria dos países não era uma meta realista. Apesar disto, somente em 1993 foi reconhecido pela OMS que era necessário mudar de programas centralizados e baseados em regimes de administração de antimaláricos em massa para programas flexíveis, com uma boa relação custo benefício, sustentáveis, adaptados às condições e necessidades locais [3]. O aparecimento e propagação da resistência à CQ e, em seguida, à Pyr, comprometeram ainda mais a eficácia dos programas baseados na administração em massa de antimaláricos, até então um dos pilares dos programas de erradicação.

O Plano Global de Ação para Controlo da Malária, outra estratégia da OMS para a prevenção da mortalidade e redução da morbilidade, foi adotado pela conferência ministerial reali-

zada em Amsterdão em 1992 [3].

Em 2013 cerca de 3,2 bilhões de pessoas quase metade da população mundial estavam em risco de contrair malária, foram registados 124 a 283 milhões de casos e cerca de 584.000 mortes. Desde 2000, programas de controlo e prevenção levaram a uma redução de 47% e 54%, respetivamente, taxas de mortalidade por malária na região africana [4]. No entanto, a taxa de declínio da mortalidade diminuiu entre 2011 e 2013, facto que é atribuído pela OMS aos fundos insuficientes para fornecer redes mosquiteiras impregnadas com inseticidas [4] e às interrupções no fornecimento das terapias combinadas à base de artemisinina (ACTs) em especial a grávidas e crianças com menos de 5 anos, assim como, à relativamente lenta, implementação da terapêutica da malária grave com AS intravenoso. Os ACTs são oficialmente recomendados pela OMS desde 2010 para o tratamento da malária não complicada por *P. falciparum* [5].

As pessoas que vivem nos países mais pobres são as mais vulneráveis à malária. Em 2013, 90% de todas as mortes por malária ocorreram na região africana da OMS, principalmente entre crianças menores de 5 anos de idade. O atual compromisso das organizações e doadores internacionais, regionais e nacionais é de disponibilizar fundos, tendo concertado estratégias no sentido de em 2015 se diminuírem as taxas de mortalidade global em 55% e infantil (<5anos) em 61% (fig.1).

O IHMT no combate à malária na CPLP

A presença histórica de Portugal em áreas endémicas de malária, bem como o facto de a malária também ter sido um problema de saúde em Portugal [6;7] fez com que equipas portuguesas, nomeadamente do IHMT, tenham vindo a adotar um papel muito relevante no estudo e controlo desta doença. Missões do IHMT para o estudo e prevenção de

endemias eram frequentes e estão documentadas desde os anos 50, maioritariamente em Moçambique [8;9;10;11;12], em São Tomé e Príncipe (STP) [13;14] e em Angola [12;15;16;17;18;11;19]. Os resultados destas missões foram a base de tomada de decisão em matéria de controlo da malária à época, revelando-se essenciais para manter a malária administrável até o fim do domínio colonial, em 1974.

Após o domínio colonial em 1974 e, especialmente, com a criação do Centro de Malária e outras Doenças Tropicais (CMDT <http://cmdtla.org>) no IHMT em 1992 (financiado pela FCT) o trabalho no IHMT passa a ser focalizado principalmente na Comunidade dos Países de Língua Portuguesa (CPLP) como está patente pelo número de publicações: Angola [20;21;22;23;24;25;26;27;28;29;30;31;32;33], Brasil [34;21;35;36;37;38], Cabo Verde [39;40;41], Guiné Bissau [28;42;43], Guiné Equatorial [25;44;44], Moçambique [45; 21;29;46;26;47;48;49;50;51;33], STP [21;44;50;52;53;54 ;55;56;57;58;59;60;61;62;64;63;65;66;27;67;52] e Timor Leste [69;70]. Mas também em outros países como a Colômbia [71] ou a Tailândia [68].

As atividades de controlo da malária em países da CPLP com diferentes condições epidemiológicas de malária – Angola, Brasil, Cabo Verde, Guiné Bissau, Guiné Equatorial, Moçambique, STP e Timor Leste são bons exemplos deste trabalho.

O arquipélago de Cabo Verde tem sido considerado uma área de malária instável, com taxas de incidência superiores a 100 indivíduos por cada 1000 habitantes. Em 2012 foi incluído numa série de estudos de caso para a eliminação da malária (Cabo Verde, Maurícias, Sri Lanka, Turquemenistão e Turquia) pelo Programa Global da OMS de Malária e Global Health Group da Universidade da Califórnia (UCSF). Em 2013 foram registados pelo Serviço de Vigilância Epidemiológica do Ministério de Saúde de Cabo Verde 22 casos de malária autóctone e 12 importados. Atualmente a malária em Cabo Verde está em fase de pré-eliminação.

De acordo com Meira et al. [72] a epidemia de malária é conhecida por ocorrer no arquipélago de Cabo Verde desde o passado remoto. O parasita da malária deve ter sido introduzido no arquipélago durante a sua colonização no século XV [73]. Em 1952 Costa Monteiro considerava a malária como o mais grave problema de saúde pública no arquipélago, sendo Santiago a ilha mais afetada, seguida pelo Fogo, São Vicente, São Nicolau e Boavista.

Entre 1940 e 1970, as medidas de controlo, principalmente medidas anti-vector [pulverização com DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane) e eliminação de larvas de mosquito], permitiram a erradicação da malária nas ilhas do Sal em 1950, São Vicente em 1954, Boavista e Maio em 1962 e Santiago em 1968 [73].

No início da década de 70 a Missão de Controlo e Combate a Endemias de Cabo Verde, responsável por toda a estratégia de controlo no arquipélago (pulverização residual interior principalmente com DDT, anti-larvas de mosquito e busca

ativa de casos de infeção), foi extinta. Em setembro de 1973, depois de uma entrada maciça de pessoas vindas da África continental e de STP e com a ajuda das chuvas de agosto, ocorreu um surto com 148 casos de malária [73].

Uma série de surtos normalmente associados à entrada descontrolada de pessoas provenientes de áreas endémicas da África [74] ocorreram desde então. Com o aumento do número de casos em Santiago, bem como com o alargamento da área de risco à ilha da Boavista, a decisão política de intensificar as medidas de controlo para, eventualmente, erradicar a malária até 2020 foi incluída no documento 20072020 da política nacional de saúde [75]. O surto, em 1995, no bairro de Santa Catarina foi acompanhado e caracterizado do ponto de vista parasitológico e molecular, durante um ano por uma equipa do IHMT [39]. Este limitou-se a uma aldeia isolada, Achada Leite, resultando na infeção de pelo menos 40% dos moradores com *P. falciparum* geneticamente homogéneo e resistente à CQ. Um ano após o surto, 10% dos habitantes ainda apresentavam parasitas do mesmo genótipo. Nesse estudo o potencial para portadores assintomáticos transmitirem malária muito tempo depois da infeção inicial foi demonstrado. É provável que o surto inicial tenha resultado da ocorrência simultânea de duas condições que favorecem a transmissão: (i) a presença de gametócitos infeciosos em pelo menos um indivíduo e (ii) a existência de condições climáticas que permitiram que a população do mosquito prosperasse e propagasse os parasitas à população remanescente. Deve ter envolvido um único caso primário, uma população altamente suscetível e uma taxa reprodutiva alta, o que, coletivamente, determina um elevado potencial de transmissão [39].

Surpreendentemente, nestes dois estudos anteriores não se registaram casos de malária grave, apesar das altas parasitémias [39;40]; a maior parte dos indivíduos com parasitemia patente tinha >10000.000 parasitas/ μ l de sangue, que é geralmente considerado o *cutoff* para a malária clínica. No entanto, nenhum dos infetados apresentou mais do que sintomas leves de malária, como febre, dor de cabeça, náuseas e malestar geral [39; 40].

A sintomatologia atenuada pode dever-se à premunicação, já descrita para outras áreas de transmissão instável e de baixo nível de endemicidade de malária. Além disso, as diferenças de impacto clínico da infeção pode ser consequência de fatores do hospedeiro, como já foi demonstrado. Os polimorfismos mais comuns e mais bem caracterizados, associados à proteção, são os que envolvem proteínas específicas do eritrócitos tais como hemoglobina (Hb) e enzimas, tais como a glucose6fosfato desidrogenase (G6PD) e piruvatoquinase (PK). Os alelos associados a estas variantes apresentam alta frequência em áreas onde a malária ainda é ou foi muito prevalente, devido à sua pressão seletiva no genoma humano.

No sentido de se entender qual a possível influência destes polimorfismos na baixa morbidade dos casos de malária observados (em especial na Ilha de Santiago) foi efetuado um

estudo da frequência desses polimorfismos genéticos humanos no arquipélago de Cabo Verde. Foram estudados dois fatores genéticos clássicos fortemente associados à resistência contra as formas graves de malária: alelo HbS responsável pelo traço falciforme (heterozigotia para a mutação no gene HbS β globina, Hb β globina) e a prevalência de variantes de G6PD (alelos A e MED), [41]. A PK, codificada pelo gene *pklr*, foi associada com a resistência à doença em modelos de roedores e em seres humanos. Os resultados mostraram que as frequências alélicas dos polimorfismos examinados estavam mais próximas das encontradas nas populações Europeias do que nas africanas. Não foi encontrada associação entre os fatores humanos analisados e a infecção, mas um resultado é de grande interesse: um teste de desequilíbrio de *linkage* revelou uma associação do gene *pklr* apenas em indivíduos não infetados. Isto poderia significar uma região do gene mais conservada selecionada em associação com proteção contra a infecção e/ou doença. Devido a este resultado esta linha de pesquisa foi continuada noutra área endêmica de malária - Moçambique.

Em Moçambique a malária é endêmica em todo o país, especialmente em áreas onde o clima favorece a transmissão; esta é perene com um pico após a temporada das chuvas. Moçambique tem vindo a alcançar bons resultados no controlo da malária. Cerca de 6,5 milhões de casos foram registados em 2006, enquanto em 2014 apenas foram reportados cerca de 3 milhões (2.941 mortes) como resultado de estratégias de intervenção eficazes.

Durante os anos 50, Soeiro e colegas apresentaram descrições epidemiológicas muito detalhadas da situação da malária nos diversos distritos do território moçambicano, abordando aspetos como a distribuição dos casos, morbidade, mortalidade e transmissão [8;9;76;77]. Nessa época, a luta contra a malária em Moçambique era realizada pela EAM - Estação Anti Malárica de Lourenço Marques (hoje Maputo), criada em 1937. A EAM incluía três secções entomologia, hematologia e trabalho de campo; operava como um Centro de Supervisão e Coordenação de controlo da malária em todo o território, em estreita colaboração com os Municípios locais e Juntas, delegados de saúde e estações menores de luta contra a malária espalhadas pelas diferentes regiões, onde trabalhava pessoal especialmente treinado. Um ênfase especial era colocado nas medidas anti-vetor e estudos de comportamento do mesmo, tendo sido realizadas tentativas de controlar a resistência aos inseticidas [78].

Entre abril e junho de 1984, houve oito casos de *P. falciparum* malária resistentes à CQ em expatriados que regressaram de Moçambique. A resistência à terapêutica com AMQ e Pyr também foi demonstrada em dois casos. Embora os marcadores moleculares de resistência à CQ, sulfadoxina e Pyr (SP) tenham sido de valor operacional limitado, porque foram descritos após a resistência ter emergido e se ter disseminado globalmente, eles ainda são úteis para monitorizar

os ACTs [51] e os níveis de resistência à SP [50], uma combinação ainda em uso para o tratamento preventivo intermitente (IPT) na gravidez e recém-nascidos em Moçambique. Na verdade, com base em marcadores moleculares, foi possível determinar que um único alelo do gene *pfprt* originado no sudeste asiático invadiu África (e Moçambique).

Quanto à relação parasitahospedeiro e ao estudo dos fatores humanos que podem estar associados à proteção contra a malária, no seguimento dos resultados obtidos na população de Cabo Verde relativos ao gene *pklr*, prosseguiu-se o estudo deste gene em duas populações subsarianas (Moçambique e Angola) e fazendo uma análise combinada de vários tipos de polimorfismos (*Short Tandem Repeats, STRs e Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs*) na região do gene *pklr* e regiões adjacentes (cromossoma 1q21) para detetar eventuais sinais de seleção exercida pela malária em grupos com diferentes desenlaces clínicos de malária, tendo sido também utilizados dois grupos portugueses para comparação, um controlo normal e outro com deficiência diagnosticada de PK [29].

Esta análise revelou uma diferenciação significativa entre os grupos africanos e portugueses e mais elevada do que quando são utilizados marcadores neutrais.

Adicionalmente foi encontrado novamente um desequilíbrio de *linkage* significativo na mesma região genómica que em Cabo Verde e apenas no grupo com malária não complicada. No conjunto, estes resultados sugerem que a malária poderá estar a atuar como uma pressão seletiva sobre esta região do genoma humano.

No IHMT o estudo da diversidade de PK prosseguiu, estendendo-se a outras populações da África subsariana – Angola, Guiné Bissau, Guiné Equatorial e São Tomé e Príncipe [44]. A percentagem de indivíduos exibindo uma atividade de PK reduzida foi de 4,1% em Maputo e a mutação não sinónima G829A (Glu277Lys) no gene *pklr*, à data apenas identificada em três indivíduos mundialmente, foi identificada em frequência elevada frequência de heterozigóticos portadores estimada entre 2,6% e 6,7%. Não foi encontrada uma associação significativa entre a atividade reduzida da PK ou a frequência do alelo 829A e a infecção malárica ou o desenlace clínico; no entanto, esta variante foi mais frequente nos indivíduos com malária não complicada. Uma distribuição geográfica entre a malária e uma frequência elevada de deficiência em PK parece ocorrer o que sugere que a malária poderá ser uma força seletiva que faz aumentar a frequência desta variante 277Lys.

Em STP, as missões do IHMT para o estudo e prevenção de endemias eram frequentes nos anos 50 [13;14]. Os resultados dessas missões eram relatadas ao governo de Lisboa e constituíam as bases de tomada de decisão em matéria de controlo da malária nas ilhas. Estas missões foram de suma importância para manter a malária manejável até o fim do domínio colonial em 1974.

Neste arquipélago, em 2002, a prevalência de resistência *in vitro* à CQ era de 92%. O marcador molecular *pfprt* mutação

76T, responsável pela resistência à CQ encontrava-se fixado na população parasitária com uma taxa de 96,9% e o marcador adicional *pfmdr1* mutação 86Y estava presente em 68% dos casos [55]. Até cerca de 2004, a CQ e SP permaneceram respectivamente a 1ª e 2ª linhas de tratamento para a malária não complicada em STP. Os altos níveis de resistência a estes antimaláricos, tanto *in vivo* como *in vitro* bem como as elevadas taxas de prevalência dos correspondentes marcadores moleculares *pfmdr1*, *pfprt*, *pfdhps* e *pfdhfr* [53;55;54] levaram a uma mudança no regime terapêutico para a malária. Em 2004 o governo STP aderiu aos ACTs. Em 2007 os ACTs mostravam-se eficazes mas, mais uma vez, cientistas do IHMT descreveram uma elevada prevalência de parasitas resistentes à AMQ (fármaco companheiro em ACTs) e confirmaram as taxas de mutação perto da fixação para os genes *pfprt* e *pfmdr1*, muito provavelmente devido ao passado de resistência à CQ [61].

Analisando as origens dos sinais de seleção dos marcadores de resistência de *P. falciparum* à SP na população parasitária de STP foi possível concluir que uma vez na ilha (resultante de várias introduções de parasitas mutantes oriundos do continente África Ocidental), demorou uma década para os mutantes atingirem frequências perto da fixação [52].

A intervenção do IHMT no contexto do controlo da malária em Angola remonta ao domínio colonial [79] e foi mantida de forma mais ou menos regular ao longo das últimas 4 décadas [30;31;32]. A falência terapêutica à CQ neste país foi relatada pela 1ª vez em 1984 e à SP em 1985. Em 2002 registavam-se elevadas taxas de falência à CQ (83,5%) e SP (25,3%), e mais baixas à AMQ (17,3%). Estes dados em conjunto com dados de marcadores moleculares [27] confirmaram a necessidade de alteração das terapêuticas de 1ª linha para os ACTs, conforme recomendava a OMS [81]. Dado que os ACTs incluem um fármaco já associado a algum grau de resistência pelas populações de parasitas - ex. amodiaquina (AMQ), mefloquina (MEF) e lumefantrina (LUM) -, é necessário manter a vigilância através da análise de marcadores moleculares [31;32]. Apesar da alta eficácia das duas combinações ACT - artesunato (AS) + AMQ e artemeter + LUM - em Angola, recentemente foi documentado um caso de malária grave que não respondeu ao tratamento com ACTs num paciente de origem vietnamita infetado em Angola.

Dois componentes muito importantes das estratégias de controlo da malária são o diagnóstico precoce e tratamento correto e atempado, este último com base em medicamentos antimaláricos acessíveis, como a CQ ou a combinação sulfadoxinaPyr (SP). No entanto, a emergência de resistência de *P. falciparum* à CQ surgiu no final de 1950 no sudeste asiático espalhando-se na Ásia e, depois, para África nas três décadas seguintes. A resistência à SP, que veio substituir a CQ, seguiu aproximadamente o mesmo padrão, dispersando-se ainda mais rapidamente. Apesar de falência terapêutica ao tratamento com SP ser generalizada nas regiões endêmi-

cas, a OMS continua a recomendar a utilização de SP para o tratamento intermitente preventivo (TIP) da malária em crianças e em grávidas [82].

A CQ deixou de ser usada para o tratamento de malária por *P. falciparum*, continuando a ser a terapia de 1ª linha para a malária por *P. vivax* desde 1946.

P. vivax é a espécie mais prevalente na América Latina, Sudeste da Ásia, Mediterrâneo Oriental e Pacífico Ocidental. É uma potencial causa de morbidade e mortalidade entre os 2,85 bilhões de pessoas que vivem em risco de contrair a infeção, a maioria dos quais estão nas regiões tropicais da América Latina e Central e Sudeste da Ásia.

Os primeiros casos de resistência de *P. vivax* à CQ foram documentados na Papua Nova Guiné em 1989. No Brasil, o *P. vivax* tem sido responsável por mais de 80% dos episódios de malária nos últimos anos. Nesta região, a resistência à CQ foi primeiramente relatada em Manaus em 1999. Dados mais recentes obtidos no estudo multicêntrico RAVREDA (Rede Amazônica de Vigilância de Resistência às Drogas Antimaláricas) com pacientes tratados com CQ nos quais a concentração plasmática do fármaco foi avaliada, confirmam isso mesmo. A eficácia da CQ contra *P. vivax* tem vindo a diminuir na maioria dos locais onde *P. vivax* é endêmica nomeadamente no Brasil como ilustrado pelos trabalhos do IHMT em colaboração com a FMTHVD do Amazonas [37;38]. Estes estudos mostraram que: 1) a prevalência da resistência à CQ determinada *in vitro* é semelhante à obtida em ensaios clínicos de monitorização de pacientes na mesma área, sugerindo que os testes *in vitro* desenvolvidos localmente são úteis para a vigilância da resistência de *P. vivax* à CQ na Amazônia; 2) é necessário clarificar a existência de estirpes de *P. vivax* simultaneamente resistentes à CQ e à MEF na Amazônia; e 3) foi detetada uma mutação não sinónima S382C no gene *pvdhps* associada à suscetibilidade *in vitro* de *P. vivax* à CQ.

Dado o aumento de casos de resistência à CQ por *P. vivax*, ameaçando a saúde de milhões de pessoas em todo o mundo, a OMS recomenda atualmente o tratamento dos casos de *P. vivax* com CQ onde esta ainda é eficaz, e um outro antimalárico (ex. ACT) em áreas onde *P. vivax* é resistente à CQ [83].

Apesar de *P. vivax* poder ocorrer em toda a África, o risco de infeção é menor pela alta frequência de indivíduos Duffy-negativos entre as populações africanas. Mas isso pode estar a mudar, pois evidências surgiram sustentando que a ausência do antígeno Duffy não é mais uma barreira para *P. vivax* infetar esse indivíduo. Isto foi demonstrado pelo estudo pioneiro realizado no IHMT que mostrou evidências moleculares da presença de *P. vivax* em indivíduos Duffy-negativos da Costa Oeste Africana (Angola e Guiné Equatorial) [25] em que quase a totalidade da população é Duffy-negativa, bem como em mosquitos, o que confirma a existência de transmissão desta espécie.

Na República Democrática de Timor Leste, a malária por *P. falciparum* e *P. vivax* coexistem, mas a informação disponível sobre marcadores moleculares de resistência antes de

2003 era limitada. Um estudo pioneiro de Almeida [70] em pacientes com *P. vivax*, demonstrou uma elevada frequência de mutações no gene *pvdhfr* (codões 33L, 58R e 117N, associados à resistência à Pyr), com as respectivas frequências de 48%, 76% e 82% mas não foram detetadas mutações no *pvdhps* (codões 383 e 553, associados à resistência à sulfadoxina). Além disso, um terço dos pacientes possuía parasitas com ambos os alelos mutantes 58R e 117N em simultâneo. O estudo da resistência aos antimaláricos, além da monitorização epidemiológica tratada acima, inclui também a pesquisa dos mecanismos associados e de novos fármacos e tem sido uma prioridade do IHMT especialmente desde a implementação do CMDT.

Antimaláricos e alvos terapêuticos

A digestão de hemoglobina no vacúolo digestivo do parasita da malária é o alvo celular reconhecido das quinolinas, nomeadamente da CQ. A hipótese mais fundamentada é de que a CQ impeça a polimerização dos grupos heme (resultantes da digestão da hemoglobina) em hemozoina, induzindo stresse oxidativo a níveis letais. A estrutura e morfologia dos cristais de hemozoina tem vindo a ser estudada no IHMT [84] com o intuito de, em colaboração com a Faculdade de Farmácia de Lisboa, desenvolver moléculas capazes de se ligarem especificamente às faces dos cristais de hemozoina impedindo o seu crescimento e nucleação. Várias destas moléculas foram sintetizadas e testadas *in vitro* com resultados promissores contra *P. falciparum* resistente a múltiplos fármacos [85;86]. Como parte dos sistemas de alívio de stress oxidativo, os parasitas da malária possuem também todo um conjunto de enzimas de resposta ao stress baseado no tripéptido glutatião (GSH). Este é um importante antioxidante intracelular que é oxidado em dissulfureto de glutatião (GSSG) durante a desintoxicação de peróxidos e radicais livres de oxigénio. Os parasitas da malária têm um sistema redox baseado no glutatião totalmente funcional. O aumento da transcrição dos genes que codificam as enzimas de resposta ao stress oxidativo parece ser parte da 1ª linha de defesa à CQ de *P. falciparum* [87] mas o mesmo não foi observado em *P. chabaudi chabaudi* [88]. Os transportadores transmembranares ABC como PfMRP1 e PfMRP2 [89] participam no transporte de antimaláricos e conjugados de glutatião constituindo parte do sistema de defesa do parasita aos antimaláricos. Várias mutações foram identificadas nestes genes e implicadas em fenótipos de resistência a antimaláricos.

A primaquina (PMQ) é o único fármaco disponível ativo contra os hipnozoítos (formas latentes no fígado) de *P. vivax* e *P. ovale* causadoras de recaídas da doença e contra os gametócitos de todas as espécies, bloqueando assim a transmissão aos mosquitos. No entanto, a PMQ apresenta uma semi-vida curta (± 6 h) e hemotoxicidade elevada, causando também anemia hemolítica em portadores de glicose 6 fosfato

desidrogenase (G6PD) deficiente devido à capacidade da PMQ para induzir a oxidação da oxihemoglobina em metahemoglobina.

Uma abordagem prática para combater a resistência do parasita é o desenvolvimento de análogos de antimaláricos já existentes, devidamente adaptados, a fim de restaurar a sua relevância na quimioterapia antimalárica. A fim de superar estas limitações da PMQ, durante as últimas duas décadas o IHMT, a Faculdade de Farmácia de Lisboa e a Universidade do Porto em colaboração, têm vindo a sintetizar e testar novas moléculas e derivados da PMQ.

Foram usadas diversas estratégias como: 1) adição de aminoácidos à PMQ de forma a reduzir a sua toxicidade e suprimir a metabolização; embora muitos derivados tenham apresentado melhor índice de atividade/toxicidade continuaram a ser rapidamente hidrolisados a PMQ por aminopeptidases e endopeptidases; 2) incorporação de imidazolidinas em derivados dipeptídicos de PMQ para proteger o resíduo de aminoácido Nterminal dos péptidos da hidrólise; as imidazoquinas resultantes apresentavam muito baixa citotoxicidade contra linhas celulares humanas e uma boa atividade de bloqueio de transmissão por eliminação dos gametócitos, comparável à PMQ e aos derivados dipeptídicos [90]; estas imidazoquinas apresentaram também atividade comparável à da PMQ contra estádios eritrocitários de *P. falciparum* [91]; 3) a adição de metaloceno à PMQ resultou na seleção de um primaceno com um nível de atividade *in vitro* contra esquizontes hepáticos e de bloqueio de transmissão 45 vezes maior do que a da PMQ [92].

A artemisinina (ART) e seus derivados são os antimaláricos mais potentes e de ação mais rápida disponíveis, sendo esta também a principal razão pela qual o AS está gradualmente a substituir o quinino no tratamento da malária grave. Os derivados da ART são ativos contra todos os estádios eritrocitários do parasita (incluindo a redução da produção de gametócitos) reduzindo até 10.000 vezes o número de parasitas por ciclo e proporcionando um alívio rápido dos sintomas.

Com a emergência de resistência aos ACTs, mais uma vez no sudeste asiático, tornou-se imperativo encontrar alternativas viáveis. Em 2003 foi proposta a ATPase dependente de cálcio do retículo sarcoplasmático (PfATP6) codificada pelo gene *pfatp6* como alvo molecular dos derivados da ART. Em 2007, Hunt e colaboradores (no IHMT) selecionaram pela primeira vez linhas de *Plasmodium* resistentes à ART, usando o modelo murino *P. chabaudi* [93]. A sequenciação total do genoma dos clones resultantes permitiu identificar possíveis alvos na via metabólica da ubiquitina [94;95]. Com base na inibição funcional da proteína PfATP6, esta foi proposta como um alvo da ART. No entanto foi demonstrado por expressão heteróloga de PfATP6 em membranas de levedura era insensível à ART. No entanto, as mutações no gene *pfatp6* anteriormente identificadas como estando associadas à resistência não se encontram nos clones de *P. chabaudi* resistentes [94]. Recentemente, um marcador molecular de

resistência aos ACTs foi identificado – na hélice 13 da proteína kelch (k13). A descoberta de K13 cria uma oportunidade de ouro para a monitorização da resistência a estes antimaláricos. No IHMT um trabalho que compara as sequências de K13 em isolados de Angola e Moçambique colhidos antes e depois da introdução dos ACTs nos respetivos países, permitiu identificar uma mutação (R471R) em K13 anteriormente identificada na República Democrática do Congo e no Gabão e duas novas mutações não descritas, R575R em Angola e V494I em Moçambique [33]. A V494I situa-se no a.a. adjacente a Y493H associado à resistência no sudeste asiático.

A busca de novos compostos antimaláricos

Os antimaláricos mais importantes atualmente disponíveis para o tratamento da malária, o quinino e a ART (ou seus derivados) foram originalmente isolados a partir de extratos de plantas respetivamente *Cinchona officinalis* e *Artemisia annua*. Tendo em conta o papel crucial que os compostos derivados de plantas têm desempenhado na descoberta e desenvolvimento de medicamentos (não só em malária), o isolamento de novos compostos bioativos a partir de plantas medicinais parece ser uma abordagem muito promissora. O IHMT tem estado na linha da frente no estudo de plantas medicinais como recurso para o controlo da malária.

Um estudo fitoquímico realizado pelo IHMT com plantas utilizadas na medicina tradicional em STP identificou quatro plantas com potencial, *Struchium sparganophorum*, *Tithonia diversifolia*, *Pycnanthus angolensis* e *Morinda lucida* [96]. Em Moçambique e África do Sul, um vegetal utilizado como alimento, *Momordica balsamina*, também tem sido amplamente utilizado na medicina tradicional, especialmente para o tratamento da febre e malária. A atividade antimalárica de extratos e frações desta planta foram sucessivamente avaliados até à identificação do triacetilbalsaminol como composto mais ativo contra formas eritrocitárias de *P. falciparum* (IC50 de 0.4 μM em 3D7 e 0,2 μM em Dd2) e com atividade contra formas hepáticas de *P. berghei* superior à PMQ [97].

Resultados mais promissores foram obtidos a partir de *Ampeloziphys amazonicus* Ducke (Rhamnaceae), chamado localmente “cerveja do índio”, utilizado na região amazónica para prevenir a malária. O trabalho produziu evidências sólidas da atividade antimalárica dos extratos contra formas hepáticas de *P. berghei* [35]. Também com resultados promissores, no IHMT foram testados análogos de xantonas, cloro9H xantonas, também extraídas de plantas, contra as formas eritrocitárias de *P. falciparum* [98].

Outro produto natural, as auronas (isómeros estruturais de flavonas) foram exploradas como base para o desenho

de novos antimaláricos bloqueadores de bombas de efluxo transportadores ABC. Uma biblioteca de novas auronas foi sintetizada e avaliada no IHMT para a atividade antimalárica, onde se identificaram auronas com atividade na ordem dos μM e com baixa citotoxicidade para células de mamíferos [99].

A abordagem de “recuperar antimaláricos clássicos” resultou recentemente no desenho de compostos análogos de acridinas com elevada atividade contra as formas eritrocitárias de *P. falciparum* e dois dos derivados mais ativos também apresentaram atividade *in vitro* contra as formas hepáticas *P. berghei* superior à da PMQ (100).

A destoxificação dos grupos heme é um dos alvos mais atraentes para o desenho de antimaláricos, vários quimiotipos de antimaláricos, tais como 4-aminoquinolinas (por exemplo, CQ), xantonas, acridinas e indoloquinolinas atuam aumentando a toxicidade do heme livre através da inibição da polimerização da hemozoína [101]. A fusão das estruturas de indol [3,2b] quinolinas e acridonas permitiu obter uma quindolona. Os derivados foram testados *in vitro* contra as formas eritrocitárias de *P. falciparum*, tendo o derivado mais ativo demonstrado ser 100 vezes mais ativo contra o parasita do que contra células de hepatoma humano (101). Com base nestes resultados, novas quindolonas para atuar como ligandos da hemozoína foram sintetizadas e testadas. O derivado mais ativo e seletivo contra *P. falciparum* mostrou um IC50 de 25 nM e foi 212 vezes mais tóxico para o parasita do que para as células de hepatoma humano [85]. Este constitui o primeiro relato de ligandos da hemozoína com atividade antimalárica. Com base no conceito de moléculas híbridas com um duplo modo de ação, uma série de compostos híbridos que combinam trioxanos ou tetraoxanos (endoperoxidos) e 8-aminoquinolinas, foram sintetizados e avaliados revelando elevada atividade antimalárica contra formas eritrocitárias e hepáticas do parasita comparáveis aos homólogos com base de trioxano representativos [102]. Além disso, bloquearam eficientemente o desenvolvimento do ciclo esporogónico no mosquito vetor [102]. Estes resultados indicam que os híbridos peróxido-8-aminoquinolina são um ponto de partida excelente para o desenvolvimento de um antimalárico que atue quer nas formas sanguíneas, quer nos gametócitos impedindo a transmissão, com elevado potencial para ser utilizado em campanhas de eliminação da malária.

Interação vetorparasita

Outra área em que IHMT tem estado na vanguarda da investigação é o estudo das interações do vetor com o parasita. Historicamente, o controlo de doenças transmitidas por vetores foi conseguido principalmente através de controlo de vetores, em vez do controlo direto da doença nos humanos, mas só muito recentemente na história

da malária os mecanismos de interação entre parasita e mosquito captaram o interesse dos investigadores como potencial ferramenta na luta contra a malária.

Dentro do mosquito os plasmódios têm de ultrapassar muitas barreiras físicas, tais como a matriz peritrófica, o epitélio do intestino médio, o hemocélio e as glândulas salivares, a fim de completar o seu ciclo de vida, no entanto, a base molecular que permite o estabelecimento destas interações não é totalmente conhecida, apesar de muitos trabalhos realizados nesta área. O IHMT tem contribuído para o conhecimento desses mecanismos e interações, esperando contribuir para o desenvolvimento de ferramentas inovadoras para controlar a transmissão da doença.

As formas parasitárias no vetor são extracelulares e portanto estão expostas aos fatores imunes do vertebrado absorvidas em conjunto com a refeição sanguínea infetada ou refeições subsequentes. Esta ação do sistema imune do hospedeiro vertebrado tem sido explorada na busca de candidatos para vacinas de bloqueio de transmissão. Moléculas candidatas como Pfs48 / 45 e P25P28, foram identificadas e pensa-se estarem relacionadas com a formação de nanotúbulos que facilitam o contacto intercelular durante a fertilização. Estudos sobre a resposta imune humana direcionada para os mosquitos e o seu efeito sobre a fisiologia do parasita e mortalidade têm sido desenvolvidos no IHMT, mostrando que os anticorpos produzidos contra o intestino médio do mosquito reduzem a longevidade e fecundidade [103].

Vários alvos foram estudados a fim de quebrar a cadeia de transmissão, particularmente no passo crítico da invasão do epitélio pelo oocineto. Esta é uma área cada vez com maior interesse científico que tem vindo a ser explorada no IHMT, nomeadamente em relação à associação do citocromo P450 e da tubulina A e B com a reduzida penetração do epitélio de *A. gambiae* pelos oocinetos de *P. berghei* [104]. Além disso, foi demonstrado pela primeira vez que a injeção de oligonucleótidos (ODN) contendo motivos CpG tornava os mosquitos mais resistentes ao *Plasmodium*, tendo sido isto associado com a atividade de enzimas transglutaminase [105]. Estes resultados abrem caminhos promissores na busca de novos alvos para o controlo da transmissão da malária. As microvilosidades do epitélio também têm sido exploradas como um alvo para a interrupção da transmissão. A imunização com extratos de microvilosidades resultou numa maior mortalidade dos mosquitos e diminuição da infeção por plasmódio [106].

Os mosquitos *Anopheles* são capazes de montar uma resposta imune eficaz contra a infeção pelo *Plasmodium*, a qual é responsável por grandes perdas de parasitas durante o desenvolvimento esporogónico no mosquito. Os

mosquitos parecem ser mais bem sucedidos a controlar a infeção pelo *Plasmodium* do que os humanos. Em áreas hiperendémicas para malária onde a prevalência da malária pode atingir até 91%, as taxas de infeção do mosquito são de uma ordem de grandeza menor. No entanto, a imunidade natural não é suficiente para suprimir totalmente a infeção do mosquito. A ideia de modular a infeção no mosquito como medida de controlo tem vindo a ser desenvolvida no IHMT usando fatores externos como a CQ (Abrantes et al, 2005 108; Abrantes et al, 2008 108) e ODN com CpG sintéticos para induzir respostas protetoras em *Anopheles* contra *Plasmodium* [105].

Com as mudanças climáticas e aumento dos movimentos populacionais, o risco de reintrodução da malária nos países que anteriormente tinham malária torna-se uma ideia mais plausível, donde a investigação sobre a possível suscetibilidade do mosquito *Anopheles atroparvus*, vetor da malária em Portugal, a estirpes importadas de *P. falciparum* ser muito relevante. A tentativa de infetar *A. atroparvus* com *P. falciparum* de origem africana não foi bem sucedida, o que sugere que as espécies locais de *Anopheles* são refratárias aquela espécie de *Plasmodium* [109]. No entanto, mais recentemente, experiências realizadas sob condições específicas de temperatura e refeição sanguínea revelaram que existe de facto suscetibilidade de *A. atroparvus* para *P. falciparum* estirpe NF54, com prevalência de infeção de até 13,5%.

A libertação dos esporozoítos dos oócitos para a hemolinfa leva a uma reorganização do epitélio do mosquito com alteração da expressão de genes associados com citoesqueleto como a tubulina [104], e produção de NO, desencadeando uma resposta que envolve a ativação de vários genes de resposta ao stress oxidativo [110]. Neste contexto, os citocromos P450 estão profundamente envolvidos na resposta à infeção do mosquito pelo *Plasmodium* [104], desempenhando um papel importante em diferentes fases de desenvolvimento do parasita e envolvendo diferentes tecidos do mosquito.

O ensino em saúde tropical foi a missão original do IHMT, talvez por força das circunstâncias sociopolíticas (mas muito claramente pela dedicação e entusiasmo dos que nele trabalhavam), o combate à malária no continente e nas ex-colónias rapidamente se tornou uma componente major na sua atividade institucional. Pensamos ter conseguido evidenciar aqui o impacto mensurável que o IHMT teve na investigação fundamental em malária nestes últimos 50 anos, nomeadamente nas áreas interação parasita-hospedeiro, interação parasitavector e na resistência aos antimaláricos.

Bibliografia

1. Who 1978 Declaration of AlmaAta. Consultado em 16 fevereiro de 2015. In: http://www.who.int/social_determinants/tools/multimedia/alma_ata/en/
2. WHO, 1973. Consultado em 16 fevereiro de 2015. In: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_529.pdf
3. WHO (1993). Implementation of the global malaria control strategy. Report of a WHO Study Group on the Implementation of the Global Plan of Action for Malaria Control 19932000. World Health Organ Tech Rep Ser. 1993;839:157. PubMed PMID: 8284937.
4. WHO malaria report 2014. Consultado em 16 de Fevereiro de 2015. In: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/144852/2/9789241564830_eng.pdf?ua=1
5. WHO: World Malaria Report: 2010. WHO Press, Geneva; 2010:5862.
6. Cambournac FJC (1952a). Sobre a epidemiologia e a luta antisezonática em Portugal. Anais do Instituto Medicina Tropical, IX: 391406.
7. Cambournac FJC 1966. Erradicação da malária. Considerações sobre a organização dos serviços para a sua realização. Anais do Instituto Medicina Tropical, 23: 3351.
8. Soeiro A 1952. O sezonismo em Moçambique. Contribuição para o estudo epidemiológico. Anais do Instituto de Medicina Tropical, IX: 343286.
9. Soeiro A 1956. A malária em Moçambique, com especial referência à Campanha Antimalárica numa região predominantemente urbana (Lourenço Marques) e uma região predominantemente rural (Vale do Limpopo). Contribuição para o estudo epidemiológico. Anais do Instituto de Medicina Tropical, 13: 615634.
10. Pinhão RC. [HEALTH SURVEY IN THE VALLEY OF THE ZAMBEZI]. An Inst Med Trop (Lisb). 1963 JanDec; 20:12538. Portuguese. PubMed PMID: 14203067.
11. Ribeiro H, Casaca VM, Cochofel JA. A malaria survey in the LobitoCatumbela region, Angola (Portuguese West Africa). An Inst Med Trop (Lisb). 1964 Jul Dec;21(3):33751. PubMed PMID: 5880312.
12. Cambournac FJ, Gandara AF, Pena AJ, Teixeira WL. [Aids for the malariological survey in Angola]. An Inst Med Trop (Lisb). 1955 Mar-Jun;12(1-2): 12153. Portuguese. PubMed PMID: 13314083.
13. de Azevedo J, Mourão MC, Salazar JM, Tendeiro J, Franco IT. [Malaria on the island of Príncipe (1958)]. An Inst Med Trop (Lisb). 1960 Dec;17:95566. Portuguese. PubMed PMID: 13863544.
14. Mourão Mda C. [Report of the Mission of Study and Prevention of Endemics in São Tomé and Príncipe Island (1st Semester of 1962)]. An Inst Med Trop (Lisb). 1964 JulDec; 21(3):50139. Portuguese. PubMed PMID: 5880313.
15. Casaca VR, DE Carvalho AM. [Survey of endemics in the Villa Salazar area (DalatandoAngola)]. An Inst Med Trop (Lisb). 1955 Dec;12(4):57591. Portuguese. PubMed PMID: 13327247.
16. Cambournac FJ, Casaca VR (1956). [Data on endemic diseases reigning in the area of Mulondo (Rio Cunene, Angola)]. An Inst Med Trop (Lisb). MarJun;13(1-2):1725. English, Portuguese. PubMed PMID: 13411512.
17. David JH. [Aids for the study of malarial endemia in municipality of Chititi (LundaAngola)]. An Inst Med Trop (Lisb). 1960 JanJun;17:25781. Portuguese. PubMed PMID: 13719992.
18. David S, Trincão C. [drepanocytomia, erythrocytic glucose6phosphate dehydrogenase deficiency (g6pd) and malaria in the cuango post (lundaangola)]. An Inst Med Trop (Lisb). 1963 JanDec;20:515. Portuguese. PubMed PMID: 14203077.
19. de Moraes JA. [Macroglobulinemic splenomegaly of Charnot or tropical splenomegaly syndrome: report of the 1st case diagnosed in Angola and review of the world literature]. An Inst Hig Med Trop (Lisb). 19771978;5(14):293323. Portuguese. PubMed PMID: 121952.
20. Campos P A, Valente B, Campos R B, Gonçalves L, Rosário V E, Varandas L, Silveira H. Plasmodium falciparum infection in pregnant women attending antenatal care in Luanda, Angola. Rev Soc Bras Med Trop. 2012 Jun;45(3):36974. PubMed PMID: 22760138.
21. Silva JR, Ramos A de S, Machado M, de Moura DF, Neto Z, Canto Cavalheiro MM, Figueiredo P, do Rosário VE, Amaral AC, Lopes D. A review of antimalarial plants used in traditional medicine in communities in Portuguesespeaking countries: Brazil, Mozambique, Cape Verde, GuineaBissau, São Tomé and Príncipe and Angola. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011 Aug;106 Suppl 1:14258. Review. PubMed PMID: 21881769.
22. Gama BE, Pereira Carvalho GA, Lutucuta Kosi FJ, Almeida de Oliveira NK, Fortes F, Rosenthal PJ, do Rosário VE, Daniel Ribeiro CT, de Fátima Ferreira da Cruz M. Molecular markers of antifolate resistance in Plasmodium falciparum isolates from Luanda, Angola. Malar J. 2011 Aug 24;10:248. doi: 10.1186/1475287510248. PubMed PMID: 21864379; PubMed Central PMCID: PMC3176256.
23. Valente B, Campos PA, do Rosário VE, Silveira H. Natural frequency of polymorphisms linked to the chondroitin 4sulfotransferase genes and its association with placental malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2010 Oct;104(10):6879. doi: 10.1016/j.trstmh.2010.05.005. Epub 2010 Jun 30. PubMed PMID: 20580388.
24. Valente B, Campos PA, do Rosário VE, Varandas L, Silveira H. Prevalence and risk factors of Plasmodium falciparum infections in pregnant women of Luanda, Angola. Trop Med Int Health. 2011 Oct;16(10):120614. doi: 10.1111/j.1365-3156.2011.02830.x. Epub 2011 Jul 6. PubMed PMID: 21729222.
25. Mendes C, Dias F, Figueiredo J, Mora VG, Cano J, de Sousa B, do Rosário VE, Benito A, Berzosa P, Arez AP. Duffy negative antigen is no longer a barrier to Plasmodium vivaxmolecular evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea). PLoS Negl Trop Dis. 2011 Jun;5(6):e1192. doi: 10.1371/journal.pntd.0001192. Epub 2011 Jun 21. PubMed PMID: 21713024; PubMed Central PMCID: PMC3119644.
26. Manco L, Machado P, Lopes D, Nogueira F, Do Rosário VE, Alonso PL, Varandas L, Trovoada Mde J, Amorim A, Arez AP. Analysis of TPII gene promoter variation in three sub Saharan Africa population samples. Am J Hum Biol. 2009 Jan Feb;21(1):11820. doi: 10.1002/ajhb.20819. PubMed PMID: 18792062.
27. Janeiro F, Vicente JL, Kanganje Y, Moreno M, Do Rosário VE, Cravo P, Pinto J. A primerintroduced restriction analysispolymerase chain reaction method to detect knockdown resistance mutations in Anopheles gambiae. J Med Entomol. 2008 Mar;45(2):23741. PubMed PMID: 18402139.
28. Pinheiro L, Franco S, Adagu IS, Rosa R, Rosário VE, Warhurst DC. [Presence of the double pfmdr1 mutation 86Tyr and 1246Tyr in clones of a chloroquineresistant west African isolate of Plasmodium falciparum]. Acta Med Port. 2003 Jul Aug;16(4):22933. Portuguese. PubMed PMID: 22226207.
29. Machado P, Pereira R, Rocha AM, Manco L, Fernandes N, Miranda J, Ribeiro L, do Rosário VE, Amorim A, Gusmão L, Arez AP. Malaria: looking for selection signatures in the human PKLR gene region. Br J Haematol. 2010 Jun;149(5):77584. doi: 10.1111/j.13652141.2010.08165.x. Epub 2010 Apr 4. PubMed PMID: 20377593.
30. Pimentel S, Nogueira F, Benchimol C, Quinhentos V, Bom J, Varandas L, do Rosário V, Bernardino L. Detection of atovaquoneproguanil resistance conferring mutations in Plasmodium falciparum cytochrome b gene in Luanda, Angola. Malar J. 2006 Apr 5;5:30. PubMed PMID: 16597338; PubMed Central PMCID: PMC1513587.
31. Figueiredo P, Benchimol C, Lopes D, Bernardino L, do Rosário VE, Varandas L, Nogueira F. Prevalence of pfmdr1, pfprt, pfldr and pfldhrs mutations associated with drug resistance, in Luanda, Angola. Malar J. 2008 Nov 17;7:236. doi: 10.1186/147528757236. PubMed PMID: 19014684; PubMed Central PMCID: PMC2613152.
32. Fortes F, Dimbu R, Figueiredo P, Neto Z, do Rosário VE, Lopes D. Evaluation of prevalence's of pfldr and pfldhrs mutations in Angola. Malar J. 2011 Feb 2;10(1):22. doi: 10.1186/147528751022. PubMed PMID: 21288345; PubMed Central PMCID: PMC3039635.
33. Carlos Escobar, Sara Pateira Elsa Lobo, Lis Lobo, Rosa Teodosio, Fernanda Dias, Natercia Fernandes, Ana Paula Arez, Luis Varandas, Fatima Nogueira. Polymorphisms in Plasmodium falciparum K13propeller in Angola and Mozambique after the introduction of the ACTs. (2015) (in press)
34. Inoue J, Lopes D, do Rosário V, Machado M, Hristov AD, Lima GF, Costa Nascimento MJ, Segurado AC, Di Santi SM. Analysis of polymorphisms in Plasmodium falciparum genes related to drug resistance: a survey over four decades under different treatment policies in Brazil. Malar J. 2014 Sep 19;13:372. doi: 10.1186/1475287513372. PubMed PMID: 25239550; PubMed Central PMCID: PMC4177603.
35. Andrade Neto VF, Brandão MG, Nogueira F, Rosário VE, Krettl AU (2008). Ampeloziphys amazonicus Ducke (Rhamnaceae), a medicinal plant used to prevent malaria in the Amazon Region, hampers the development of Plasmodium berghei sporozoites. Int J Parasitol. Nov;38(13):150511.
36. Ferreira ID, Martinelli A, Rodrigues LA, do Carmo EL, do Rosário VE, Póvoa MM, Cravo P. Plasmodium falciparum from Pará state (Brazil) shows satisfactory in vitro response to artemisinin derivatives and absence of the S769N mutation in the SERCA-type PfATPase6. Trop Med Int Health. 2008 Feb;13(2):199207. doi:10.1111/j.13653156.2007.01991.x. PubMed PMID: 18304266.
37. Marques MM, Costa MR, Santana Filho FS, Vieira JL, Nascimento MT, Brasil LW, Nogueira F, Silveira H, ReyesLecca RC, Monteiro WM, Lacerda MV, Alecrim MG. Plasmodium vivax chloroquine resistance and anemia in the western Brazilian Amazon. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(1):3427. doi: 10.1128/AAC.02279.12.Epub 2013 Oct 28. PubMed PMID: 24165179; PubMed Central PMCID: PMC3910749.
38. Chehuan YF, Costa MR, Costa JS, Alecrim MG, Nogueira F, Silveira H, Brasil LW, Melo GC, Monteiro WM, Lacerda MV. In vitro chloroquine resistance for Plasmodium vivax isolates from the Western Brazilian Amazon. Malar J. 2013 Jul 3;12:226. doi: 10.1186/1475287512226. PubMed PMID: 23819884; PubMed Central PMCID: PMC3704965.
39. Arez AP, Snounou G, Pinto J, Sousa CA, Modiano D, Ribeiro H, Franco AS, Alves J, do Rosário VE (1999). A clonal Plasmodium falciparum population in an isolated outbreak of malaria in the Republic of Cabo Verde. Parasitology, 118: 347355.
40. Alves J, Roque AL, Cravo P, Valdez T, Jelinek T, do Rosário VE, Arez AP (2006). Epidemiological characterization of Plasmodium falciparum in the Republic of Cabo Verde: implications for potential largescale reemergence of malaria. Malaria Journal, 5: e32.
41. Alves J, Machado P, Silva J, Gonçalves N, Ribeiro L, Faustino P, do Rosário VE, Manco L, Gusmão L, Amorim A, Arez AP (2010). Analysis of malaria associated genetic traits in Cabo Verde, a melting pot of European and sub Saharan settlers. Blood Cells, Molecules and Diseases, 44: 6268.
42. Arez AP, Pålsson K, Pinto J, Franco AS, Dinis J, Jaenson TG, Snounou G, do Rosário VE. Transmission of mixed malaria species and strains by mosquitoes, as detected by PCR, in a study area in GuineaBissau. Parasitologia. 1997 Mar;39(1):65 70. PubMed PMID: 9419850.
43. Arez AP, Pinto J, Pålsson K, Snounou G, Jaenson TG, do Rosário VE.

- Transmission of mixed *Plasmodium* species and *Plasmodium falciparum* genotypes. *Am J Trop Med Hyg*. 2003 Feb;68(2):1618. PubMed PMID: 12641406.
44. Machado P, Manco L, Gomes C, Mendes C, Fernandes N, Salomé G, Siteo L, Chibute S, Langa J, Ribeiro L, Miranda J, Cano J, Pinto J, Amorim A, do Rosário VE, Arez AP. Pyruvate kinase deficiency in subSaharan Africa: identification of a highly frequent missense mutation (G829A;Glu277Lys) and association with malaria. *PLoS One*. 2012;7(10):e47071. doi: 10.1371/journal.pone.0047071. Epub 2012 Oct 17. PubMed PMID: 23082140; PubMed Central PMCID: PMC3474807.
45. Noormahomed EV, Orlov M, do Rosario V, Petersen BW, Guthrie C, Badaro R, Schooley RT. A cross-sectional study of subclinical *Plasmodium falciparum* infection in HIV1 infected and uninfected populations in Mozambique, SouthEastern Africa. *Malar J*. 2012 Aug 1;11:252. doi: 10.1186/1475287511252. PubMed PMID: 22853699; PubMed Central PMCID: PMC3468410.
46. Mendes C, Felix R, Sousa AM, Lamego J, Charlwood D, do Rosário VE, Pinto J, Silveira H. Molecular evolution of the three short PGRPs of the malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* in East Africa. *BMC Evol Biol*. 2010 Jan 12;10:9. doi: 10.1186/14712148109. PubMed PMID: 20067637; PubMed Central PMCID: PMC2820002.
47. Marques PX, Saúte F, Pinto VV, Cardoso S, Pinto J, Alonso PL, Rosário VE, Arez AP. *Plasmodium* species mixed infections in two areas of Manhica district, Mozambique. *Int J Biol Sci*. 2005;1(3):96102. Epub 2005 May 1. PubMed PMID: 16094461; PubMed Central PMCID: PMC1182231.
48. Aranda C, Aponte JJ, Saute F, Casimiro S, Pinto J, Sousa C, RosarioVD, Petrarca V, Dgedge M, Alonso P (2005). Entomological characteristics of malaria transmission in Manhica, a rural area in southern Mozambique. *J Med Entomol*. Mar;42(2):1806. PubMed PMID: 15799528.
49. Fernandes NE, Silveira H, Franco AS, Arez AP, Forte JM, do Rosário VE. Detection of malaria parasites in paraffinembedded spleen and placental tissues by nested PCR. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001 MayJun;95(3):2934. PubMed PMID: 11491000.
50. Fernandes N, Figueiredo P, do Rosário VE, Cravo P. Analysis of sulphadoxine/pyrimethamine resistance conferring mutations of *Plasmodium falciparum* from Mozambique reveals the absence of the dihydrofolate reductase 164L mutant. *Malar J*. 2007 Mar 23;6:35. PubMed PMID: 17378942; PubMed Central PMCID: PMC1950477.
51. Lobo E, de Sousa B, Rosa S, Figueiredo P, Lobo L, Pateira S, Fernandes N, Nogueira F. Prevalence of pfmdr1 alleles associated with artemetherlumefantrine tolerance/resistance in Maputo before and after the implementation of artemisininbased combination therapy. *Malar J*. 2014 Aug 6;13(1):300. doi: 10.1186/1475287513300. PubMed PMID: 25098280.
52. Salgueiro P, Vicente JL, Ferreira C, Teófilo V, Galvão A, do Rosário VE, Cravo P, Pinto J. Tracing the origins and signatures of selection of antifolate resistance in island populations of *Plasmodium falciparum*. *BMC Infect Dis*. 2010 Jun 9;10:163. doi: 10.1186/1471233410163. PubMed PMID: 20534146; PubMed Central PMCID: PMC2898820.
53. Cravo P, Figueiredo S, Nogueira F, Lopes D, Ferreira ID, Ferreira C, Gil JP, do Rosario VE. High frequency of the genetic polymorphisms associated with sulfadoxine pyrimethamine resistance, among *Plasmodium falciparum* isolates from São Tomé and Príncipe, West Africa. *Ann Trop Med Parasitol*. 2004 Apr;98(3):2936. PubMed PMID: 15119975.
54. Loureiro LF, Cesário AM, Franco AS, Rosário VE. Malaria in São Tomé and Príncipe: prevalence and drug susceptibility. *Ann Trop Med Parasitol*. 1996 Apr;90(2):2234. PubMed PMID: 8762414.
55. Lopes D, Nogueira F, Gil JP, Ferreira C, do Rosário VE, Cravo P. pfprt and pfmdr1 mutations and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* from São Tomé and Príncipe, West Africa. *Ann Trop Med Parasitol*. 2002 Dec; 96(8):8314. PubMed PMID: 12625938.
56. Lee PW, Ji DD, Liu CT, Rampao HS, do Rosario VE, Lin IF, Shao MF. Application of loopmediated isothermal amplification for malaria diagnosis during a followup study in São Tomé. *Malar J*. 2012 Dec 6;11:408. doi: 10.1186/1475287511408. PubMed PMID: 23217163; PubMed Central PMCID: PMC3528453.
57. Gonçalves L, Subtil A, de Oliveira MR, do Rosário V, Lee PW, Shao MF. Bayesian Latent Class Models in malaria diagnosis. *PLoS One*. 2012;7(7):e40633. doi: 10.1371/journal.pone.0040633. Epub 2012 Jul 23. PubMed PMID: 22844405; PubMed Central PMCID: PMC3402519.
58. Lee PW, Liu CT, do Rosario VE, de Sousa B, Rampao HS, Shao MF. Potential threat of malaria epidemics in a low transmission area, as exemplified by São Tomé and Príncipe. *Malar J*. 2010 Sep 2;9:264. doi: 10.1186/147528759264. PubMed PMID: 20920216; PubMed Central PMCID: PMC2955676.
59. Culleton RL, Mita T, Ndounga M, Unger H, Cravo PV, Paganotti GM, Takahashi N, Kaneko A, Eto H, Tinto H, Karema C, D'Alessandro U, do Rosário V, Kobayakawa T, Ntoumi F, Carter R, Tanabe K. Failure to detect *Plasmodium vivax* in West and Central Africa by PCR species typing. *Malar J*. 2008 Sep 11;7:174. doi: 10.1186/147528757174. PubMed PMID: 18783630; PubMed Central PMCID: PMC2546428.
60. Sutherland CJ, Tanomsing N, Nolder D, Oguike M, Jennison C, Pukrittayakamee S, Dolecek C, Hien TT, do Rosário VE, Arez AP, Pinto J, Michon P, Escalante AA, Nosten F, Burke M, Lee R, Blaze M, Otto TD, Barnwell JW, Pain A, Williams J, White NJ, Day NP, Snounou G, Lockhart PJ, Chiodini PL, Imwong M, Polley SD. Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. *J Infect Dis*. 2010 May 15;201(10):154450. doi: 10.1086/652240. PubMed PMID: 20380562.
61. Ferreira ID, Lopes D, Martinelli A, Ferreira C, do Rosário VE, Cravo P. In vitro assessment of artesunate, artemether and amodiaquine susceptibility and molecular analysis of putative resistance-associated mutations of *Plasmodium falciparum* from São Tomé and Príncipe. *Trop Med Int Health*. 2007 Mar;12(3):35362. PubMed PMID: 17313506.
62. Ferreira ID, Rosário VE, Cravo PV. Realtime quantitative PCR with SYBR Green I detection for estimating copy numbers of nine drug resistance candidate genes in *Plasmodium falciparum*. *Malar J*. 2006 Jan 18;5:1. PubMed PMID: 16420686; PubMed Central PMCID: PMC1363351.
63. Charlwood JD, Pinto J, Ferrara PR, Sousa CA, Ferreira C, Gil V, Do Rosário VE. Raised houses reduce mosquito bites. *Malar J*. 2003 Dec 10;2(1):45. PubMed PMID: 14667242; PubMed Central PMCID: PMC317347.
64. Charlwood JD, Alcántara J, Pinto J, Sousa CA, Rompão H, Gil V, Rosário VE. Do bednets reduce malaria transmission by exophagic mosquitoes? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2005 Dec; 99(12):9014. Epub 2005 Aug 29. PubMed PMID: 16129466.
65. Pinto J, Donnelly MJ, Sousa CA, MaltaVacas J, Gil V, Ferreira C, Petrarca V, do Rosário VE, Charlwood JD. An island within an island: genetic differentiation of *Anopheles gambiae* in São Tomé, West Africa, and its relevance to malaria vector control. *Heredity (Edinb)*. 2003 Oct;91(4):40714. PubMed PMID: 14512957.
66. Hagemann R, Charlwood JD, Gil V, Ferreira C, do Rosário V, Smith TA. Malaria and its possible control on the island of Príncipe. *Malar J*. 2003 Jun 18;2:15. Epub 2003 Jun 18. PubMed PMID: 12875660; PubMed Central PMCID: PMC166171.
67. Moraes MF, Soares M, Arroz MJ, Do Rosário VE, Da Graça JP, Abecasis P. [New concepts in hyperactive malarial splenomegaly]. *Acta Med Port*. 2003 Jan Feb;16(1):416. Portuguese. PubMed PMID: 12828005.
68. Lopes D, Rungshirunrat K, Nogueira F, Seugorn A, Gil JP, do Rosário VE, Cravo P. Molecular characterisation of drugresistant *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Malar J*. 2002 Oct 14;1:12. Epub 2002 Oct 14. PubMed PMID: 12423551; PubMed Central PMCID: PMC149383.
69. de Almeida A, Arez AP, Cravo PV, do Rosário VE. Analysis of genetic mutations associated with antimalarial drug resistance in *Plasmodium falciparum* from the Democratic Republic of East Timor. *Malar J*. 2009 Apr 9;8:59. doi: 10.1186/14752875859. PubMed PMID: 19358729; PubMed Central PMCID: PMC2672086.
70. de Almeida A, Rosário VE, Henriques G, Arez AP, Cravo P. *Plasmodium vivax* in the Democratic Republic of East Timor: Parasite prevalence and antifolate resistance associated mutations. *Acta Trop*. 2010 Sep;115(3):28892. doi: 10.1016/j.actatropica.2010.04.008. Epub 2010 Apr 20. PubMed PMID: 20412783.
71. Restrepo Pineda E, Arango E, Maestre A, Do Rosário VE, Cravo P. Studies on antimalarial drug susceptibility in Colombia, in relation to Pfmdr1 and Pfprt. *Parasitology*. 2008 Apr;135(5):54753. doi: 10.1017/S0031182008004307. PubMed PMID: 18426617.
72. de Meira MTV, Simões TS, Pinto Nogueira JF 1947. Observações sobre sezonismo nas ilhas do Sal, Boa Vista e S. Nicolau (Cabo Verde). *Anais do Instituto de Medicina Tropical*, IV: 213238.
73. Cambournac FJC, Santa Rita Vieira H, Coutinho MA, Soares FA, Brito Soares A, Janz GJ 1984. Note sur l'éradication du paludisme dans l'île de Santiago (Republique du CapVert). *Anais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical*, 10: 2334.
74. Alves J 1994. Programme National de Lutte contre le Paludisme. Plan d'Action 1994/1998. Ministère de la Santé, République du CapVert.
75. WHO 2012a. Moving towards sustainable elimination in Cape Verde. (Eliminating malaria case study, 2). WHO Press. Geneva. 41pp.
76. Soeiro A, de Moraes T 1959a. Subsídios para o estudo da endemia de malária no distrito de Moçambique. *Anais do Instituto de Medicina Tropical*, 16: 159167.
77. Soeiro A, de Moraes T 1959b. Subsídios para o estudo da endemia de malária no distrito de Niassa. *Anais do Instituto de Medicina Tropical*, 16: 169178.
78. Pereira MC 1957. Sobre a possível mudança de comportamento dos mosquitos vetores (*A. funestus* e *A. gambiae*) numa zona da região de Lourenço Marques. *Anais do Instituto de Medicina Tropical*, 14: 179186.
79. Cambournac FJ, Gandara AF, Pena AJ, [Preventive effects of daraprim in a native community (Catholic Mission of Huambo, Angola)]. *An Inst Med Trop (Lisb)*. 1955 Sep;12(3):34157. Portuguese. PubMed PMID: 13314092.
80. Pinheiro L, Rosário VE. [Presence of pyrimethamine and cycloguanil resistance genotype in West Africa? Evidence of a single mutation 59Arg in the dhfr gene of *Plasmodium falciparum*]. *Acta Med Port*. 2003 JulAug; 16(4):2358. Portuguese. PubMed PMID: 22226208.
81. WHO, 2005. Global AMD database. AFRO. Consultado em 16 fevereiro de 2015. In: http://www.who.int/malaria/amdp/amdp_afro.htm. Accessed October 11, 2005.
82. WHO. Technical Consultation on Intermittent Preventive Treatment of Infants (IPTi) Geneva, Switzerland: WHO; 2009.
83. WHO 2013. World Malaria Report 2013. Global Malaria Programme, World Health Organization, Geneva. 253 pp.
84. Carvalho PA, L. Coelho, R. Martins and F. Nogueira. Differences between synthetic haematin and native hemozoin crystals. *Microscopy and Microanalysis / Volume 19 / Supplement S4 / August 2013*, pp 4950
85. Paulo A, Figueiras M, Machado M, Charneira C, Lavrado J, Santos SA, Lopes D, Gut J, Rosenthal PJ, Nogueira F, Moreira R. Bisalkylamine Indolo[3,2-b]quinolines as hemozoin ligands: implications for antimalarial cytotostatic and cytotoxic activities. *J*

- Med Chem. 2014 Apr 24;57(8):3295313. doi: 10.1021/jm500075d. Epub 2014 Apr 15. PubMed PMID: 24673163.
86. Figueiras M, Coelho L, Kathryn J, Wicht, Sofia A Santos, João Lavrado, Jiri Gut, Philip J. Rosenthal, Fátima Nogueira, Timothy J. Egan, Rui Moreira, Alexandra Paulo (2015). N10, N11dialkylamine indolo[3,2b]quinolines as hemozoin inhibitors: design, synthesis and antiplasmodial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 13 February 2015
87. Nogueira F, Diez A, Radfar A, PérezBenavente S, do Rosario VE, Puyet A, Bautista JM. Early transcriptional response to chloroquine of the *Plasmodium falciparum* antioxidant defence in sensitive and resistant clones. *Acta Trop*. 2010 May;114(2):10915. doi: 10.1016/j.actatropica.2010.01.013. Epub 2010 Feb 6. PubMed PMID: 20138820.
88. Ferreira ID, Nogueira F, Borges ST, do Rosário VE, Cravo P. Is the expression of genes encoding enzymes of glutathione (GSH) metabolism involved in chloroquine resistance in *Plasmodium chabaudi* parasites? *Mol Biochem Parasitol*. 2004 Jul;136(1):4350. PubMed PMID: 15138066.
89. Nogueira F, Alves C, Estolito do Rosario V: *Plasmodium falciparum* multidrug resistance protein (MRP) gene expression under chloroquine and mefloquine challenge. *Journal of Cell and Animal Biology* 2008, 2:1020.
90. Araujo MJ, Bom J, Capela R, Casimiro C, Chambel P, Gomes P, Iley J, Lopes F, Morais J, Moreira R, de Oliveira E, do Rosario V, Vale N (2005). Imidazolidinone derivatives of primaquine as novel transmission blocking antimalarials. *J Med Chem*. Feb 10; 48(3):88892.
91. Vale N, Matos J, Gut J, Nogueira F, do Rosário V, Rosenthal PJ, Moreira R, Gomes P. Imidazolidinone peptidomimetic derivatives of primaquine: synthesis and antimalarial activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008 Jul 15;18(14):41503. doi: 10.1016/j.bmcl.2008.05.076. Epub 2008 May 23. PubMed PMID: 18539459.
92. Matos J, da Cruz FP, Cabrita É, Gut J, Nogueira F, do Rosário VE, Moreira R, Rosenthal PJ, Prudêncio M, Gomes P. Novel potent metalloenes against liver stage malaria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Mar; 56(3):156470. doi: 10.1128/AAC.0534511. Epub 2011 Dec 12. PubMed PMID: 22155838; PubMed Central PMCID: PMC3294896.
93. Hunt P, Afonso A, Creasey A, Culleton R, Sidhu AB, Logan J, Valderramos SG, McNae I, Cheesman S, do Rosario V, Carter R, Fidock DA, Cravo P. Gene encoding a deubiquitinating enzyme is mutated in artesunate and chloroquine resistant rodent malaria parasites. *Mol Microbiol*. 2007 Jul; 65(1):2740. PubMed PMID: 17581118; PubMed Central PMCID: PMC1974797.
94. Hunt P, Martinelli A, Modrzynska K, Borges S, Creasey A, Rodrigues L, Beraldi D, Loewe L, Fawcett R, Kumar S, Thomson M, Trivedi U, Otto TD, Pain A, Blaxter M, Cravo P. Experimental evolution, genetic analysis and genome resequencing reveal the mutation conferring artemisinin resistance in an isogenic lineage of malaria parasites. *BMC Genomics*. 2010 Sep 16;11:499. doi: 10.1186/1471216411499. PubMed PMID: 20846421; PubMed Central PMCID: PMC2996995.
95. Borges S, Cravo P, Creasey A, Fawcett R, Modrzynska K, Rodrigues L, Martinelli A, Hunt P (2011). Genomewide scan reveals amplification of *mdr1* as a common denominator of resistance to mefloquine, lumefantrine, and artemisinin in *Plasmodium chabaudi* malaria parasites. *Antimicrob Agents Chem Ther*. Oct;55(10):485865. doi:10.1128/AAC.0174810. Epub 2011 Jun 27. PubMed PMID: 21709099; PubMed Central PMCID: PMC3186966.
96. do Céu de Madureira M, Paula Martins A, Gomes M, Paiva J, Proença da Cunha A, do Rosário V. Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tomé and Príncipe islands. *J Ethnopharmacol*. 2002 Jun;81(1):239.
97. Ramalhe C, da Cruz FP, Lopes D, Mulhovo S, Rosário VE, Prudêncio M, Ferreira MJ. Triterpenoids as inhibitors of erythrocytic and liver stages of *Plasmodium* infections. *Bioorg Med Chem*. 2011 Dec 15;19(24):747481. doi: 10.1016/j.bmc.2011.10.044. Epub 2011 Oct 20. PubMed PMID: 22071523.
98. Portela C, Afonso CM, Pinto MM, Lopes D, Nogueira F, do Rosário V. Synthesis and antimalarial properties of new chloro9Hxanthones with an aminoalkyl side chain. *Chem Biodivers*. 2007 Jul;4(7):150819. PubMed PMID: 17638332.
99. Carrasco MP, Newton AS, Gonçalves L, Góis A, Machado M, Gut J, Nogueira F, Hänscheid T, Guedes RC, dos Santos DJ, Rosenthal PJ, Moreira R. Probing the auroene scaffold against *Plasmodium falciparum*: design, synthesis and antimalarial activity. *Eur J Med Chem*. 2014 Jun 10;80:52334. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.04.076. Epub 2014 Apr 28. PubMed PMID: 24813880.
100. Gomes A, Pérez B, Albuquerque I, Machado M, Prudêncio M, Nogueira F, Teixeira C, Gomes P. Ncinnamoylation of antimalarial classics: quinacrine analogues with decreased toxicity and dualstage activity. *ChemMedChem*. 2014 Feb;9(2):30510. doi: 10.1002/cmcc.201300459. Epub 2013 Dec 27. PubMed PMID: 24474655.
101. Lavrado J, Gani K, Nobre PA, Santos SA, Figueiredo P, Lopes D, Rosário Vd, Gut J, Rosenthal PJ, Moreira R, Paulo A. Bisalkylamine quindolone derivatives as new antimalarial leads. *BioorgMed Chem Lett*. 2010 Oct 1;20(19):56347. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.08.043. Epub 2010 Aug 12. PubMed PMID: 20801652.
102. Miranda D, Capela R, Albuquerque IS, Meireles P, Paiva I, Nogueira F, Amewu R, Gut J, Rosenthal PJ, Oliveira R, Mota MM, Moreira R, Marti F, Prudêncio M, O'Neill PM, Lopes F. Novel endoperoxide based transmission blocking antimalarials with liver and blood schizontocidal activities. *ACS Med Chem Lett*. 2013 Dec 20;5(2):10812. doi: 10.1021/ml4002985. eCollection 2014 Feb 13. PubMed PMID: 24900781; PubMed Central PMCID: PMC4027774.
103. Almeida AP & Billingsley PF (1998). Induced immunity against the mosquito *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae): effects on mosquito survival and fecundity. *Int J Parasitol*. Nov;28(11):172131.
104. Félix RC, Silveira H (2011). The Interplay between Tubulins and P450 Cytochromes during *Plasmodium berghei* Invasion of *Anopheles gambiae* Midgut. *PLoS ONE* 6: e24181.
105. Silveira H, Gabriel A, Ramos S, Palma J, Felix R, Custódio A, Collins LV. CpG-containing oligodeoxynucleotides increases resistance of *Anopheles* mosquitoes to *Plasmodium* infection. *Insect Biochem Mol Biol*. 2012 Oct;42(10):75865. doi: 10.1016/j.ibmb.2012.07.003. Epub 2012 Jul 31. PubMed PMID: 22885118.
106. Almeida AP & Billingsley PF (2002). Induced immunity against the mosquito *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae): effects of cell fraction antigens on survival, fecundity, and transmission of *Plasmodium berghei* (Eucoccidiida: Plasmodiida) transmission. *J Med Entomol* 39:20714.
107. Abrantes P, Lopes LF, do Rosário VE, Silveira H (2005). Effect of chloroquine on the expression of genes involved in the mosquito immune response to *Plasmodium* infection. *Insect Biochem Mol Biol* 35:11241132.
108. Abrantes P, Dimopoulos G, Grosso AR, do Rosário VE, Silveira H (2008) Chloroquine mediated modulation of *Anopheles gambiae* gene expression. *PLoS One* 3:e2587.
109. Ribeiro H, Batista JL, Ramos HC, Pires CA, Champalimaud JL, Costa JM, Araújo C, Mansinho K, Pina MC (1989). An attempt to infect *Anopheles atroparvus* from Portugal with African *Plasmodium falciparum*. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas* 12:8182.
110. Félix RC, Müller P, Ribeiro V, Ranson H, Silveira H. (2010). *Plasmodium* infection alters *Anopheles gambiae* detoxification gene expression. *BMC genomics*. 11:312.