

# Estratégia genómica para identificação rápida de mutações associadas a resistência a fármacos em parasitas de malária

*Genomics strategy for rapid identification of mutations associated with drug resistance in malaria parasites*

**Pedro Cravo**

B.Sc., M.Sc., Ph.D

GHTM/IHMT/Universidade Nova de Lisboa, UNL, Lisboa, Portugal

pcravo@ihmt.unl.pt

## Resumo

A malária causada por *Plasmodium falciparum* representa uma das principais causas de mortalidade infantil em regiões tropicais e subtropicais. Dado não existir vacina disponível, o tratamento de casos é a principal opção para o controle da malária. No entanto, no decorrer do tempo, o parasita *P. falciparum* adquiriu resistência a todos os fármacos disponíveis. O nosso grupo desenvolveu um novo paradigma que congrega princípios de genética clássica e conceitos inovadores de genómica, no intuito de compreender as bases genéticas e moleculares da resistência a antimaláricos. Esta estratégia faz uso de uma linhagem isogénica do parasita de roedores *Plasmodium chabaudi*, constituída por clones sensíveis ou resistentes a diversos fármacos, cujos genomas são escrutinados na procura de mutações responsáveis pela farmacoresistência. Usando esta estratégia, foram clarificadas as bases genéticas da resistência a vários antimaláricos, tais como pirimetamina, cloroquina, mefloquina e artemisinina.

### Palavras Chave:

Malária, fármaco-resistência, genética, genómica.

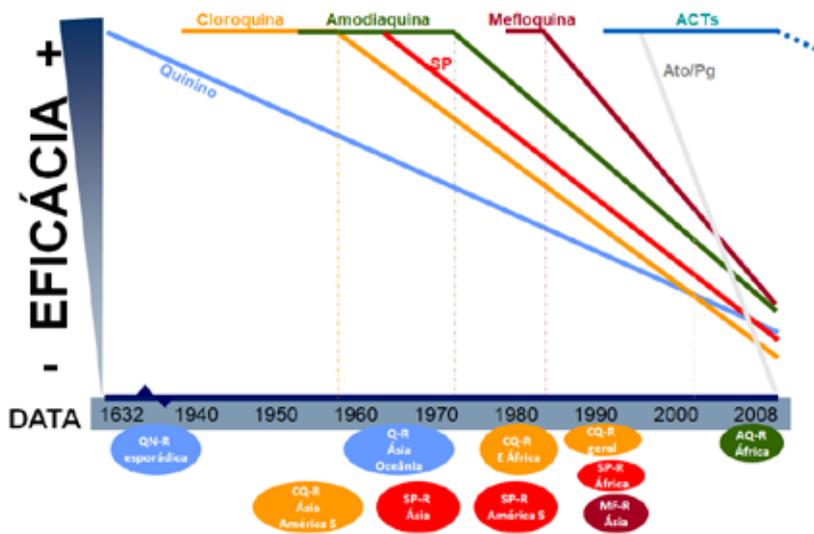
## Abstract

Malaria caused by *Plasmodium falciparum* represents one of the leading causes of child mortality in tropical and subtropical regions. Because no vaccine is available, treatment-based case management is the primary option for malaria control. However, over time, *P. falciparum* parasites have evolved resistance to all available drugs. Our group has developed a novel paradigm that brings together principles of classical genetics and innovative concepts of genomics, in order to understand the genetic and molecular basis of resistance to antimalarials. This strategy makes use of an isogenic lineage of the rodent parasite *Plasmodium chabaudi*, consisting of various clones that are either sensitive or resistant to different drugs, whose genomes are scrutinized in search for mutations responsible drug resistance. Using this strategy, the genetic basis of resistance to various antimalarials, such as pyrimethamine, chloroquine, mefloquine and artemisinin, has been clarified.

### Key Words:

Malaria, drug resistance, genetics, genomics.

**Fig.1** - Evolução cronológica da resistência aos diferentes fármacos antimaláricos em *P. falciparum*, de acordo com área geográfica



A malária é uma doença devastadora, transmitida por vetores, que reivindica quase meio milhão de vidas humanas a cada ano (WHO, 2017). A grande maioria das mortes é causada por *Plasmodium falciparum*, a espécie mais letal de parasitas de malária humana. A introdução de derivados de artemisinina combinados com fármacos quimicamente distintos sob uma prática conhecida como Terapia Combinada com Artemisinina (ACT), para o tratamento de in-

feções por *P. falciparum*, tem sido extremamente bem sucedida na redução do número de casos e óbitos relacionados à malária nos últimos 15 anos. No entanto, à semelhança de todos ou outros antimaláricos, o parasita acabou também por evoluir resistência a estes fármacos (Haldar et al, 2018; Figura 1). Deste modo, a identificação dos genes subjacentes à resistência assume-se como uma prioridade fundamental. No entanto, o conhecimento atual sobre mecanismos de resistência a drogas antimaláricas é limitado pelo fato de a grande parte das abordagens disponíveis se concentrarem na procura de mutações em um número pequeno de genes. Assim, o objetivo do nosso modelo de trabalho é investigar as características evolutivas, genéticas e genómicas determinantes de quimioresistência em parasitas de malária, utilizando uma abordagem que permite explorar a globalidade do genoma do Plasmodio, detetando todas as mutações responsáveis pela resistência. Este paradigma faz uso de uma linhagem de *Plasmodium chabaudi* isogénica, denominada AS, constituída por parasitas mutantes resistentes a diversas drogas, tais como cloroquina, mefloquina e derivados da artemisinina (Tabela 1).

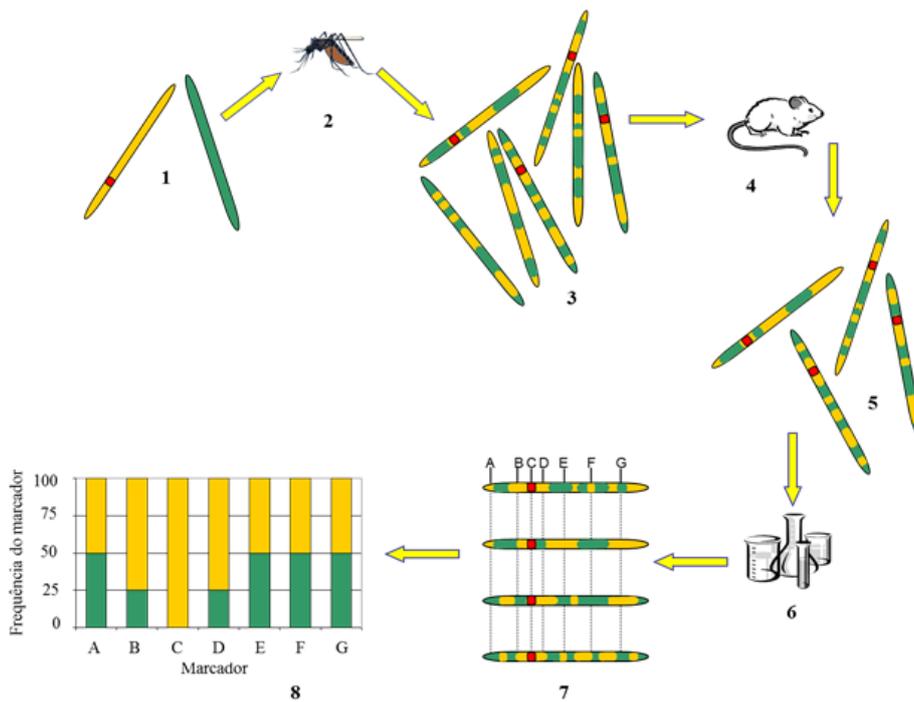
**Tabela 1.** Linhagem AS de *P. chabaudi*

| Clone AS | Resposta do clone à droga |    |      |    |     |     |    |        |
|----------|---------------------------|----|------|----|-----|-----|----|--------|
|          | PYR                       | SP | CQ   | MF | ART | ATN | LM | ATN+MF |
| SENS*    | S                         | S  | S    | S  | S   | S   | S  | S      |
| PYR      | R                         | S  | S    | S  | S   | S   | S  | S      |
| 50SP*    | R                         | R  | S    | S  | S   | S   | S  | S      |
| 3CQ      | R                         | nd | lowR | S  | S   | S   | S  | S      |
| 15CQ     | R                         | nd | intR | S  | S   | S   | S  | S      |
| 30CQ*    | R                         | nd | hiR  | R  | R   | R   | nd | nd     |
| 15MF*    | R                         | nd | hiR  | S  | hiR | R   | R  | S      |
| ART*     | R                         | nd | nd   | S  | R   | R   | nd | S      |
| ATN      | R                         | nd | nd   | S  | R   | R   | nd | S      |
| ATNMF1*  | R                         | nd | nd   | R  | R   | R   | nd | R      |
| MFATN5*  | R                         | nd | nd   | R  | R   | R   | nd | R      |

A denominação dos clones de parasitas é apresentada na primeira coluna da esquerda. As restantes colunas da figura representam o fenótipo de cada clone à droga em questão. PYR: pirimetamina; SP: sulfadoxina + pirimetamina; CQ: cloroquina; MF: mefloquina; ART: artemisinina; ATN: artesunato; LM: lumefantrina; S: sensível; R: resistente; lowR: baixa resistência; intR: resistência intermédia; nd: não determinado. Todos os clones resistentes foram derivados do seu progenitor sensível através de selecção *in vivo* por pressão contínua de fármaco (setas bordeaux). Asteriscos denominam os parasitas cujo genoma foi totalmente resequenciado. Fonte: autoria própria

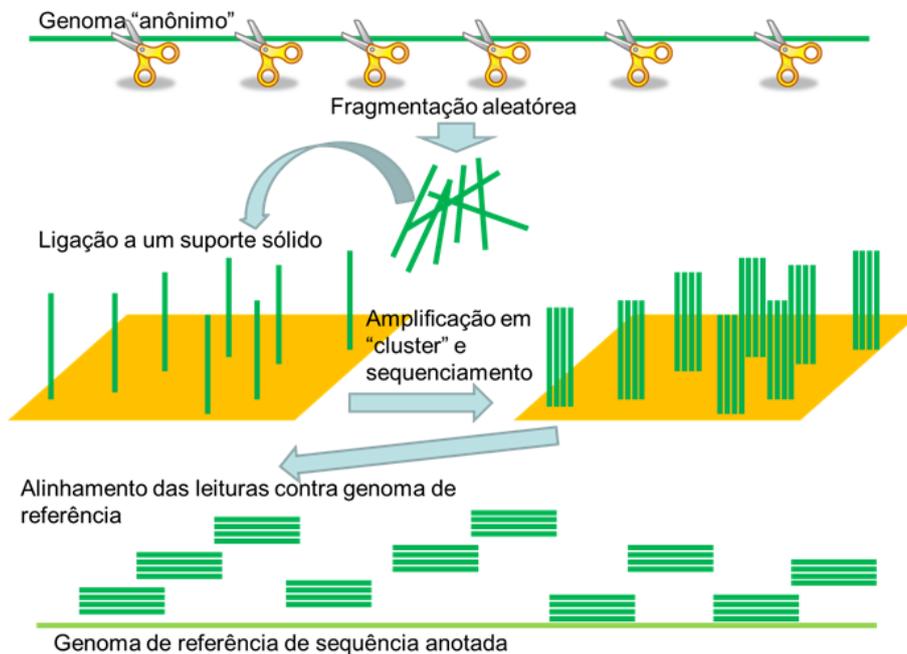
Estes parasitas foram utilizados para uma rápida detecção de *loci* associados a diferentes fenótipos, à escala genética global, usando uma tecnologia denominada *Linkage Group Selection* (Carter et al, 2007; Figura 2). Em complemento, os genomas completos dos parasitas resistentes foram sequenciados e comparados com os dos seus progenitores sensíveis, usando tecnologias de sequenciamento de genomas de segunda geração (Solexa, Illumina; Figura 3).

Fig.2 - Linkage Group Selection



Os genomas de dois parasitas de malária geneticamente distintos estão representados pelas barras coloridas (1). Um dos parasitas é resistente a uma determinada droga e o outro é sensível. A resistência é conferida por alelo mutante de um gene no *locus* marcado a vermelho. Os dois parasitas são passados juntos por mosquitos (2) onde a reprodução sexual ocorre, produzindo milhares de recombinantes (3), alguns dos quais herdam o alelo mutante e outros, o sensível. A prole recombinante (não clonada) é inoculada em ratinhos que são tratados com a droga sendo investigada (4), resultando na eliminação de todos os parasitas que não têm o alelo resistente (5). Estes parasitas selecionados são então tipados usando um grande número de marcadores genéticos distribuídos por todo o genoma, e que distinguem as duas formas parentais (7). Os marcadores do parental sensível localizados próximo do gene que confere resistência são removidos após seleção por droga. Quanto mais próximo um marcador estiver do gene alvo, maior a redução da sua frequência após tratamento. Assim, forma-se um “vale de seleção” (8) em torno do *locus* alvo, permitindo a identificação do gene(s) que conferem resistência. Fonte: autoria própria

Fig.3 - Re-sequencição de genomas pela plataforma Illumina



O genoma do parasita resistente (genoma anônimo) é fragmentado aleatoriamente por digestão enzimática. Cada um dos fragmentos de DNA é ligado a um suporte sólido (*chip*). Em seguida cada fragmento individual é amplificado várias vezes (amplificação em *cluster*) e sequenciado. Os dados da sequência dos fragmentos de cada *cluster* são processados por computador de modo a que sejam alinhados contra um genoma de referência de sequência conhecida. O novo genoma do parasita resistente pode agora ser reconstruído através da junção na posição correta da sequência de cada *cluster*. A sequência deste genoma do parasita mutante resistente pode ser comparado com a sequência do parasita ancestral sensível, através de métodos bioinformáticos. Fonte: autoria própria

**Tabela 2.** Mutações identificadas em *P. chabaudi* que conferem resistência a diferentes fármacos

| <b>Mutação identificada</b>                      | <b>Confere resistência</b>   |
|--|--|
| <b>dihidrofolato-resutase (DHFR) S106N</b>       | <b>Pirimetamina, SP</b>  |
| <b>Amplificação do gene <i>mdr2</i></b>          | <b>SP</b>  |
| <b>Aminoacid transporter A173E</b>               | <b>Cloroquina</b>  |
| <b>12-transmembrane domain transporter T719N</b> | <b>Cloroquina</b>  |
| <b>Ubiquitin Protease 1 V2697F</b>               | <b>Cloroquina, Artesunato</b>  |
| <b>Ubiquitin Protease 1 V2728F</b>               | <b>Cloroquina, Artemisinina, Mefloquina</b>  |
| <b>Amplificação do gene <i>mdr1</i></b>          | <b>Artesunato, Artemisinina, Mefloquina, Lumefantrina, Artesunato + mefloquina</b> |
| <b>Clathrin <i>mu</i> adaptor S160N</b>          | <b>Artemisinina</b>  |
| <b>Proteasome subunit gene</b>                   | <b>Artesunato</b>  |

A combinação destas técnicas resultou assim na síntese de uma abordagem inovadora que permitiu compilar uma lista de várias mutações associadas à resistência a inúmeros fármacos antimaláricos (Borges et al, 2011; Hayton et al, 2002; Henriques et al, 2013; Hunt et al, 2010; Kinga Modrzynska et al, 2012; Martinelli et al, 2011; Martinelli et al, 2018; Tabela 2).

que conferem resistência a vários compostos, incluindo combinações terapêuticas. As mutações identificadas permitem entender os mecanismos moleculares de resistência e ação dos fármacos, ajudando na síntese racional de novos compostos e podem ser usadas como marcadores moleculares para monitorar o aparecimento e propagação de parasitas resistentes em malária de humanos.

Em conclusão, foi concebido um paradigma que integra princípios e métodos de análise genética e genómica em larga escala, que permite detetar rapidamente mutações que conferem resistência a fármacos antimaláricos. Esta abordagem analisa a globalidade do genoma do Plasmódio sem necessidade de informação *a priori*, tendo sido identificadas mutações

## Referências Bibliográficas

- Borges S, Cravo P, Creasey A, Fawcett R, Modrzynska K, Rodrigues L, Martinelli A, Hunt P. Genomewide scan reveals amplification of *mdr1* as a common denominator of resistance to mefloquine, lumefantrine, and artemisinin in *Plasmodium chabaudi* malaria parasites. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Oct;55(10):4858-65
- Carter R, Hunt P, Cheesman S. Linkage Group Selection—a fast approach to the genetic analysis of malaria parasites. *Int J Parasitol*. 2007 Mar;37(3-4):285-93
- Haldar K, Bhattacharjee S, Safeukui I. Drug resistance in *Plasmodium*. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Mar;16(3):156-170
- Hayton K, Ranford-Cartwright LC, Walliker D. Sulfadoxine-pyrimethamine resistance in the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Aug;46(8):2482-9.
- Henriques G, Martinelli A, Rodrigues L, Modrzynska K, Fawcett R, Houston DR, Borges ST, d'Alessandro U, Tinto H, Karema C, Hunt P, Cravo P. Artemisinin resistance in rodent malaria—mutation in the AP2 adaptor  $\mu$ -chain suggests involvement of endocytosis and membrane protein trafficking. *Malar J*. 2013 Apr 5;12:118
- 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 re-sequencing reveal the mutation conferring artemisinin resistance in an isogenic lineage of malaria parasites. *BMC Genomics*. 2010 Sep 16;11:499
- Kinga Modrzynska K, Creasey A, Loewe L, Cezard T, Trindade Borges S, Martinelli A, Rodrigues L, Cravo P, Blaxter M, Carter R, Hunt P. Quantitative genome re-sequencing defines multiple mutations conferring chloroquine resistance in rodent malaria. *BMC Genomics*. 2012 Mar 21;13:106
- Martinelli A, Henriques G, Cravo P, Hunt P. Whole genome re-sequencing identifies a mutation in an ABC transporter (*mdr2*) in a *Plasmodium chabaudi* clone with altered susceptibility to antifolate drugs. *Int J Parasitol*. 2011 Feb;41(2):165-71
- Martinelli et al. Rodent malaria parasites resistant to artesunate + mefloquine evolve amplification of the *mdr1* gene and mutation in a 26s proteasome subunit. Submitted to JAC.
- WHO World Malaria Report 2017. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/report/en/>