

CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Revista Científica Multidisciplinar

Multidisciplinary Scientific Journal



Registo MCS nº. 183/B/97 — Dep. Legal nº 300/2011 — ISSN: 2223-9189 — N. 2 – OUT – 2011

Edição Especial

**Trabalhos da 1ª. Conferência Nacional
de Ciência e Tecnologia**

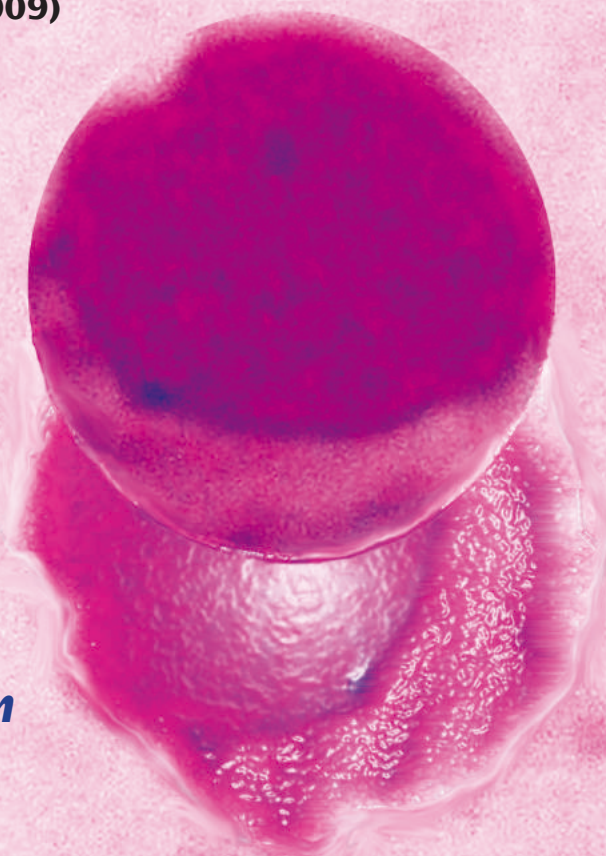
(Luanda/Angola, 20—21/Outubro 2009)

**Caracterização
da malária placentária
por *Plasmodium falciparum***

Biotecnologia da terra pela Terra

As ferramentas da biotecnologia do arroz

Microscopia óptica e PCR para identificação *Plasmodium* spp. em crianças



05 05

Nota do Editor-Chefe

Note of the Editor-in-Chief
Domingos da Silva Neto

07 15

BIOLOGIA MOLECULAR

Aplicação do teste dos micronúcleos em células binucleadas, como marcador de genotoxicidade.
Application of micronucleus test in binucleated cells as a marker of genotoxicity.
Miguel Brito e Carina Ladeira

BIOTECNOLOGIA MÉDICA

17 27

Estudo comparativo entre microscopia óptica e PCR para identificação de *Plasmodium* spp. em crianças em Angola.
Comparison between optical microscopy and PCR for identification of Plasmodium spp. in children in Angola.
Filomeno Fortes, Rafael Dímbo, Zoraima Neto, Carolina Ferreira, Nilton Saraiva, Virgílio E. do Rosário, Dinora Lopes

29 38

Correlação entre marcadores moleculares de resistência e falência terapêutica na malária por *Plasmodium falciparum*.
Correlation between molecular markers of resistance and treatment failure in Plasmodium falciparum malaria.
Fátima Nogueira e Virgílio E. do Rosário

39 50

SAÚDE PÚBLICA

Caracterização da malária placentária por *Plasmodium falciparum* em Luanda (Angola).
Characterization of placental malaria by Plasmodium falciparum infection in Luanda (Angola).
Paulo A. Campos, Bianor Valente, Virgílio E. do Rosário, Luís Varandas, Henrique Silveira

51 62

BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA

AS FERRAMENTAS DA BIOTECNOLOGIA NO MELHORAMENTO DE PLANTAS: *o exemplo do arroz.*
THE TOOLS OF BIOTECHNOLOGY IN PLANT BREEDING: *the example of rice.*
M. Margarida Oliveira, Nelson Saibo, Sónia Negrão, Rita Batista, Ana Paula Santos, Isabel Abreu, Tiago Lourenço, Duarte Figueiredo, Tânia Serra, Subhash Chander, Cecília Pina, Diego Almeida, Liliana Ferreira, Pedro Barros, Inês Pires, Mafalda Rodrigues.

63 72

BIOENGENHARIA DA RIZOSFERA

Biotechnologia da terra pela Terra.
Biotechnolgy of the earth for the Eart.
Cristina Cruz, Teresa Dias, Maria Amélia Martins-Loução

73 75

Apresentação de Livro

Texto de apresentação do livro “história da educação e cultura de Angola” de autoria da Prof. Dr. Teresa José Adelina da Silva Neto



FICHA TÉCNICA

PROPRIEDADE

Ministério do Ensino Superior
e da Ciência e Tecnologia

DIRECÇÃO

Promotores

Prof. Dr. Maria Cândida Pereira Teixeira
Prof. Dr. Orlando da Mata

Editor-Chefe

Prof. Dr. Domingos da Silva Neto

Editores Associados

Prof. Dr. António Alcochete
Prof. Dr. Gabriel L. Miguel

REFEREES DESTA EDIÇÃO

António Alcochete – PhD, FC-UAN; Luanda/Angola
Cristina Cruz PhD, FCUL, Lisboa/Portugal
Dinora Lopes PhD, IHMT, Lisboa/Portugal
Domingos Neto – PhD, FC-UAN, Luanda/Angola
Fátima Nogueira PhD, IHMT, Lisboa/Portugal
Fernanda Dias – MD, MSc., FM-UAN, Luanda/Angola
Miguel Brito PhD, ESTeSL, Lisboa/Portugal

REDACÇÃO

Direcção Nacional de Investigação Científica
(DNACIC)
Rua Cônego Manuel das Neves, Edifício da EDEL,
10º andar
C.P. 34
Luanda - República de Angola
E-mail: revistacienciatecnologia@gmail.com

PAGINAÇÃO, GRAFISMO E TRATAMENTO DE IMAGEM

RCBEG-Angola

REVISÃO DE TEXTO

EPROS-Service

IMPRESSÃO

Damer SA
Luanda - República de Angola

TIRAGEM

2.000 Exemplares

PRODUÇÃO

DNACIC/MESCT

Registo nº 183/B/97

Dep. Legal nº 300/2011

ISSN: 2223-9189

Edição nº: 2, especial com trabalhos da 1ª. Conferência Nacional de Ciência e Tecnologia, realizada em 2009 em Luanda, Angola

Data publicação: 17 Outubro de 2011.



Ministério do Ensino Superior e da Ciência e Tecnologia



A Capa: Do artº sobre Micronúcleos

Av. Lenine, 106/108, C. P. 34

Tel: +244 222 331820

Fax: +244 222 331082 / 331500

Luanda – Angola

Website: www.mesct.gov.ao

PUBLICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO GRATUITA



A Revista Científica CIÊNCIA E TECNOLOGIA, é uma publicação, do Ministério do Ensino Superior e da Ciência e Tecnologia. Todos os artigos aqui publicados são da inteira responsabilidade dos seus Autores, não representam necessariamente a opinião da Direcção da Revista. Todos os direitos reservados. Proibida a cópia ou reprodução (parcial ou integral) das matérias, fotos e gráficos aqui publicadas.

A Revista Científica CIÊNCIA E TECNOLOGIA foi lançada no dia 6 de Maio de 2011, num acto singelo presidido por Sua Excelência Senhora Ministra do Ensino Superior e da Ciência e Tecnologia (MESCT). O acto contou com a participação de gestores, docentes, investigadores e estudantes.

A 1ª edição teve como destaque de capa a produção de café, numa clara contribuição ao relançamento do seu cultivo, visto que esta cultura esteve praticamente votada ao “abandono” durante os 30 anos que se seguiram a independência nacional (1975).

A presente edição tem um carácter especial, já que comporta exclusivamente trabalhos apresentados durante a 1ª Conferência Nacional de Ciência e Tecnologia, realizada nos dias 20 e 21 de Outubro de 2009 em Luanda, Angola.

O tema de capa é uma contribuição ao melhor conhecimento sobre a prevalência e factores de risco da malária placentária, sendo que este estudo teve como área de incidência a cidade de Luanda. É de domínio público, que a malária é tida como a principal causa de morte na cidade em que foi realizado este estudo, o que por si só torna este estudo um contributo valioso.

Em suma, o tema “malária” é abordado em 50% dos artigos desta edição, o que demonstra bem o interesse que suscita nos cientistas, perante a necessidade de se responder cada vez mais aos problemas da sociedade com recurso à ciência.

A submissão de trabalhos para esta revista deve ser feita de acordo com as normas publicadas na sua 1ª edição.

“Bom apetite”

Note of the Editor-in-Chief

The journal SCIENCE AND TECHNOLOGY was launched on May 6, 2011, in a simple act chaired by His Excellency the Minister of Higher Education and Science and Technology (MESCT). Managers, teachers, researchers and students attended the event.

The 1st edition focused on the coffee production and the negative effects of the civilian war on the culture.

The 2nd edition is a special issue including only papers presented at the 1st National Conference on Science and Technology, held on 20 and 21 October 2009 in Luanda, Angola.

The cover story is a contribution to a better knowledge about the prevalence and risk factors of placental malaria in Luanda, Angola. The relevance of the study is highlighted by the fact that Malaria is the main cause of death in Luanda,.

The theme “Malaria” directly or indirectly is discussed in 50% of the papers in this issue, which clearly demonstrates the increased interest of scientists in this theme and their engagement in contributing to solve the major problems of the society.

Submission of papers to the 3rd edition of this journal should be in accordance with the guidelines published in its first edition.

Contribute!



Ministério do Ensino Superior
e da Ciência e Tecnologia

1ª Conferência Nacional sobre o Ensino Superior

Luanda 2012



Aplicação do teste dos micronúcleos em células binucleadas, como marcador de genotoxicidade

Application of micronucleus test in binucleated cells as a marker of genotoxicity

Miguel Brito* e Carina Ladeira

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Portugal, Av. D. João II, Lote 4.69.01, 1990-096 Lisboa, Portugal

Resumo

Com o aumento da mortalidade por cancro, tornou-se urgente identificar e validar marcadores preditivos de risco e que permitam um diagnóstico precoce. Existem evidências que os biomarcadores citogenéticos estão correlacionados positivamente com risco de cancro, sendo este facto validado por estudos de coortes e caso-controlo. O teste de micronúcleos em células bloqueadas na citocinese é utilizado extensivamente em epidemiologia molecular, uma vez que permite determinar vários biomarcadores de genotoxicidade, tais como: micronúcleos (biomarcador de quebra ou perda de cromossomas), pontes nucleoplasmáticas (biomarcador de re-arranjo cromossómico, má reparação e/ou fusão de telómeros) e protusões nucleares (biomarcador de eliminação de DNA amplificado e/ou complexos de reparação de DNA). A utilização do teste dos micronúcleos em estudos de biomonitorização teve um grande aumento nos últimos 15 anos e projectos internacionais tais como o HUMN (HUMAN MicroNucleus Project) têm contribuído para aumentar a aplicabilidade e fidedignidade destes ensaios.

Palavras-chave: genotoxicidade, micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas, protusões nucleares, estudo de micronucleos em células bloqueadas na citocinese.

*Autor correspondente: Dr Miguel Brito, E-mail:miguel.brito@estesl.ipl.pt

Abstract

With the increase of mortality by cancer, it becomes urgent to identify and validate predictive biomarkers of risk that allows a precoce diagnosis. There are evidences that cytogenetic biomarkers are positive correlated with risk of cancer, been this fact validated by cohort and case-control studies. MN test *in* cytokinesis-blocked cells is extensively used *in* molecular epidemiology because is possible to determine various genotoxicity biomarkers, such as: micronuclei (biomarker of chromosome breakage and/or chromosome loss), nucleoplasmic bridges (biomarker of chromosomal rearrangement, DNA misrepair and/or telomere end-fusions) and nuclear buds (biomarker of elimination of amplified DNA and/or DNA complexes). The utilization of the micronucleus test *in* biomonitoring studies have been increasing *in* the last 15 years and international projects like the HUMN (HUMAN MicroNucleus Project) have contributed to amplify the applicability and fidedignity of these tests.

Keywords: genotoxicity, micronucleus, nucleoplasmic bridges, nuclear buds, micronucleus study in cytokinesis-block cells.

Introduction

O estudo do dano no DNA a nível cromossómico é uma das áreas fundamentais da toxicologia genética, uma vez que a mutação cromossómica é um evento importante na carcinogénese. Muitos tumores são originados por eventos associados a translocações, como por exemplo as leucemias, por deleções associadas a determinadas regiões específicas do genoma ou ainda por euploidias ou aneuploidias.

O teste do micronúcleos em células binucleadas possibilita, de forma eficaz, determinar a existência de danos nos cromossomas, quer ao nível de perda de cromossomas (fenómenos aneugénicos), quer ao nível de quebras cromossómicas (fenómenos clastogénicos) como ao nível de rearranjos cromossómicos.

A observação que agentes mutagénicos, quer físicos quer químicos, podem causar dano no DNA, nomeadamente quebras, conduziu ao desenvolvimento de técnicas de estudo citogenético como medida de genotoxicidade. Apesar do conhecimento de muitos destes mecanismos ainda ser insuficiente, as evidências sugerem que as alterações cromossómicas são uma consequência directa de danos ao nível do DNA causados pelo agente mutagénico.

Abordagens epidemiológicas moleculares são utilizadas frequentemente para identificar etiologias para os problemas de saúde em humanos. O grande foco neste tipo de abordagens consiste na identificação de condições e substâncias ambientais perigosas e no risco preditivo de desenvolvimento de cancro.

Uma vez que a carcinogénese é um processo prolongado, a variedade de biomarcadores que têm sido associados a eventos biológicos anormais têm

sido desenvolvidos e integrados em estudos epidemiológicos moleculares. Os biomarcadores são determinantes quantificáveis de eventos biológicos que permitem a diferenciação de condições biológicas normais de anormais (Au, 2007). De forma geral, os biomarcadores são classificados em biomarcadores de exposição, efeito e de susceptibilidade genética (Waterfield e Timbrell, 1999). Neste artigo será dado ênfase aos biomarcadores genotóxicos, inseridos nos biomarcadores de efeito.

Biomarcadores de Genotoxicidade

O desenvolvimento do cancro requer em geral vários anos a décadas, existindo por isso interesse em determinar biomarcadores de dano de DNA que possam ser preditivos de risco de cancro. Os marcadores biológicos, ou biomarcadores, podem ser definidos “como alterações celulares, bioquímicas ou moleculares mensuráveis em meios biológicos, tais como tecidos, células ou fluidos” (Vine, 1994).

Exemplos dos biomarcadores de dano de DNA correntemente utilizados em estudos de células humanas *in vitro* ou *in vivo* são: quebras nas cadeias de DNA, aberrações cromossómicas, ensaio dos micronúcleos por bloqueio da citocinese, aneuploidia, encurtamento de telómeros, aductos de DNA, oxidação de DNA, metilação de DNA, entre outros (Fenech, 2002). As aberrações cromossómicas, as trocas de cromátídeos-irmãos e os micronúcleos em linfócitos do sangue periférico são muito utilizados como biomarcadores citogenéticos de efeitos genotóxicos (Tuimala *et al.*, 2004).

Micronúcleos

Os micronúcleos são estruturas celulares que se formam em consequência

de cromossomas que não migram correctamente ao longo do fuso mitótico (perda de cromossoma – aneuploidia), ou então fragmentos acêntricos, que pelo facto de não possuírem centromero, não são puxados pelo fuso mitótico (Larmarcovai *et al.*, 2008; Mateuca *et al.*, 2006). Estes fragmentos de DNA são então envolvidos por membrana nuclear durante a telofase, originando assim núcleos extra, de menores dimensões – os micronúcleos (Figura 1).

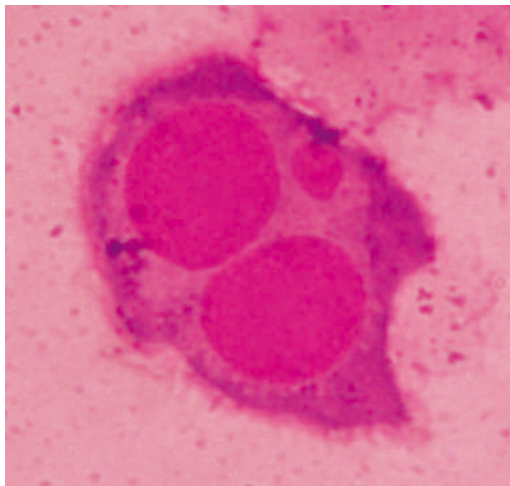


Figura 1. Linfócito binucleado com micronúcleo (coloração MGG, 1000X, fotografia inédita).

Durante a replicação e divisão do material genético, podem ocorrer erros que levem a danos cromossómicos, potenciados por agentes genotóxicos e radiações. Desta forma, pode ocorrer separação desigual do material genético e existir material genético que é excluído ou não se incorpora correctamente no núcleo da célula-filha, originando um núcleo de menores dimensões designado de micronúcleo (Fenech, 2002).

A combinação entre o estudo dos micronúcleos e FISH (Fluorescent *in Situ* Hybridization) com recurso a sondas específicas para a região pan (peri) centromérica dos cromossomas forne-

ce uma metodologia que permite distinguir entre micronúcleos que contêm cromossomas totais ou fragmentos acêntricos (Mateuca *et al.*, 2006). Este ensaio é muito sensível, uma vez que permite a discriminação entre agentes mutagénicos que induzem as quebras no DNA (clastogénicos) ou perda/não disjunção de cromossomas (aneugénicos) (Mateuca *et al.*, 2006).

Os agentes clastogénicos induzem a formação de micronúcleos por quebra da dupla hélice de DNA, formando-se fragmentos acêntricos incapazes de aderência às fibras do fuso mitótico e integração nos núcleos das células-filhas. No caso de cromossomas inteiros com cinetocoros danificados, não podem ligar-se aos microtúbulos que puxam os cromátídeos para cada célula-filha durante a mitose, permanecendo no exterior do novo núcleo formado. Estes danos podem ser provocados para agentes químicos que reagem com as proteínas constituintes dos cinetocoros. Agentes aneuploidogénicos são químicos que impedem a formação do fuso mitótico.

Estes agentes provocam a formação de células multinucleadas, em que cada núcleo contém um número diferente de cromossomas, bem como a exclusão de cromátídeos inteiros do núcleo da célula, formando micronúcleos. Assim, através da simples análise de micronúcleos é possível a distinção entre agentes clastogénicos e aneugénicos (Speit *et al.*, 2007; Serrano-García, *et al.*, 2001).

Pontes Nucleoplasmáticas

Outra estrutura com interesse são as pontes nucleoplasmáticas, que se ex-

pressam em células que terminaram a divisão celular possuindo cromossomas com arranjos especiais, nomeadamente dicêntricos, não sendo assim possível a individualização dos dois núcleos principais, mantendo-se estes unidos por extensões da membrana nuclear (Figura 2).

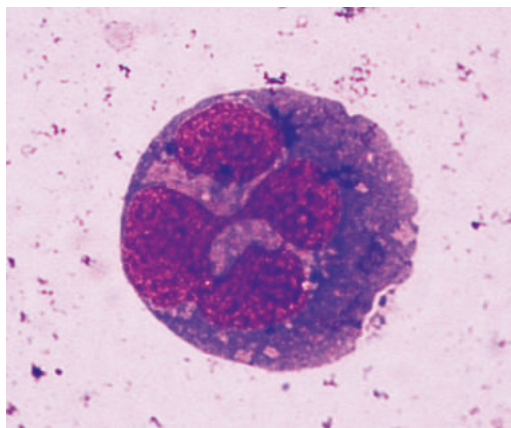


Figura 2. Linfócito tetranucleado com ponte nucleoplasmática (coloração MGG, 1000X, fotografia inédita).

A análise de pontes nucleoplasmáticas foi validada como biomarcador de dano de DNA, com o estudo de Ume-gaki e Fenech (2002), em células humanas WIL2-NS tratadas com peróxido de hidrogénio, superóxidos após co-incubação com neutrófilos humanos activados.

As pontes nucleoplasmáticas são originadas quando os centrómeros de cromossomas ou cromátídeos dicêntricos são puxados para pólos opostos da célula durante a anáfase, sendo indicativas de má reparação do DNA, rearranjos cromossómicos, fusão de telómeros (Fenech, 2006) e a não reparação do dano no genoma resultante de quebras nas cadeias de DNA (Zalacain *et al.*, 2005). A não reparação de quebras em dois cromossomas pode conduzir a um rearranjo cromossómico assimétrico tendo como produto final um cro-

mossoma dicêntrico e um fragmento acêntrico (Lindeberg *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2003). As pontes nucleoplasmáticas podem quebrar e formar micronúcleos (Lindeberg *et al.*, 2007; Fenech, 2006). Em cerca de 40% dos casos, dois ou mais micronúcleos são formados a partir de uma única ponte. Quando dois micronúcleos são observados após a resolução de uma ponte nucleoplasmática, normalmente permanece um micronúcleo em cada célula-filha (Hoffelder *et al.*, 2004).

A contagem de pontes nucleoplasmáticas reveste-se de grande importância, uma vez que providencia evidências directas do dano no genoma resultante da não reparação de quebras nas cadeias de DNA (Fenech, 2006).

Protusões nucleares

As protusões nucleares representam material nuclear que mimetiza um micronúcleo e encontra-se associado ao núcleo principal através de uma conexão nucleoplasmática (Figura 3).

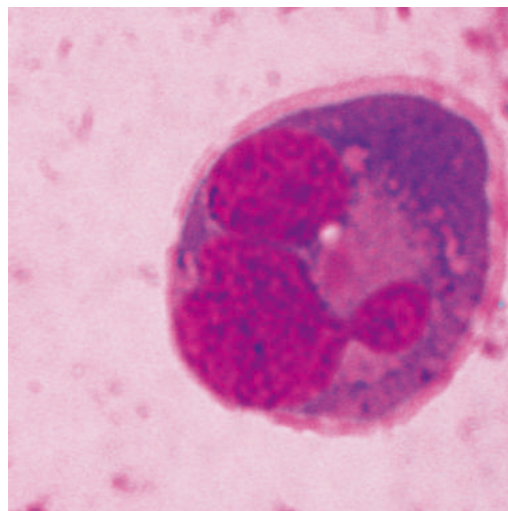


Figura 3. Linfócito binucleado com protusão nuclear a partir do núcleo principal maior. (coloração MGG, 1000X, fotografia inédita)

É constituído por DNA amplificado, que se localiza selectivamente em locais específicos na periferia do núcleo. O DNA amplificado pode ser eliminado via recombinação entre regiões homólogas com sequências amplificadas, formando os minicírculos de DNA acêntrico e atelomérico (duplos minutos), localizados em regiões distintas do núcleo ou como excisão de sequências amplificadas depois da segregação para regiões distintas do núcleo (Fenech, 2005; Fenech, 2006).

Estes achados sugerem a hipótese de que o núcleo possui uma capacidade de detectar o excesso de DNA desencadeando processos de reparação de DNA e activando genes housekeeping nucleares. Shimizu *et al.* (1998), sugere que o núcleo elimina o excesso de DNA amplificado através de um processo activo que concentra DNA amplificado num ponto periférico do núcleo, sendo posteriormente excluído da célula por extrusão formando uma “mini célula”. O processo da formação das protusões nucleares ocorre durante a fase S e a duração deste processo e extrusão permanece desconhecido (Fenech, 2006; Shimizu *et al.*, 1998; Utani *et al.*, 2007).

Metodologias laboratoriais no teste de micronúcleos em células bloqueadas na citocinese

De forma a facilitar a detecção dos micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e protusões nucleares foram desenvolvidas técnicas que permitem que a célula termine a telofase, no entanto impedindo que esta efectue a citocinese, obtendo como resultado final células binucleadas. Este fenómeno é possível com recurso à Citoclasina B, um inibidor da polimerização da actina, que impede assim que o anel contráctil efectue a sua função celular (Fenech, 2006).

Esta técnica pode ser aplicada a células

eucariotas em divisão nomeadamente em células sanguíneas (ex. linfócitos), e com o recurso à Citoclasina B é possível a acumulação de todas as células em divisão no estágio de binucleadas sem necessidade de sincronização, e permitindo assim a detecção de micronúcleos, de pontes nucleoplasmáticas e protusões nucleares. Pode-se ainda, com recurso a esta técnica, detectar a existência de células em apoptose ou em necrose, servindo como índice de viabilidade celular e avaliar a citotoxicidade e citoestase.

Talvez os linfócitos sejam o tipo de células mais utilizado para testes *in vivo* e *in vitro* de genotoxicidade. O procedimento geral associado a esta técnica implica vários passos que se passarão a descrever.

Em primeiro lugar é necessário a recolha de linfócitos, isolados a partir de sangue periférico total obtido por venopunctura, por meio de um gradiente de concentrações utilizando para essa finalidade o Ficoll-Paque Plus. De seguida, os linfócitos isolados são semeados em meio de cultura apropriado. A divisão dos linfócitos é estimulada por um agente mitogénico (Fitohemaglutinina), sendo as células incubadas durante 44h na estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após o período de estimulação, a citocinese é bloqueada utilizando um agente inibidor da polimerização dos filamentos de actina (citocalasina), que actua durante 28h.

Este mecanismo induz a mitose e inibe a citocinese, ficando as células com aparência binucleada. Finalmente, a cultura é terminada e os linfócitos são recolhidos e projectados em lâminas de vidro recorrendo a cytopspin. As lâminas são coradas com a técnica de May-Grünwald Giemsa (MGG), a qual utiliza como corantes as soluções de May-Grünwald, que cora o núcleo de azul e o citoplasma basófilo de rosa; e Giem-

sa que aumenta a coloração nuclear e a capacidade de demonstrar selectivamente determinadas estruturas celulares. A análise microscópica efectua-se em microscópio óptico composto, com óleo de imersão e ampliação 1000X, devendo ser visualizadas pelo menos 1000 células binucleadas.

Dada a possível variabilidade inter-individual na detecção e contagem de destas estruturas, foi criado um projecto de colaboração internacional entre vários laboratórios designado de projecto HUMN (HUMAn MicroNucleus) de forma a validar os critérios de avaliação (Fenech, 2003). Passar-se-á a descrever de forma sucinta estes critérios.

Em primeiro lugar, há que seleccionar as células em que se pode estudar a presença de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e protusões nucleares. As células deverão ter as seguintes características:

- 1) Devem ser binucleadas;
- 2) As membranas nucleares têm de estar intactas;
- 3) Os dois núcleos devem ter o mesmo tamanho e o mesmo padrão e intensidade de coloração;
- 4) Os dois núcleos podem estar unidos por uma fina ponte nucleoplasmática, que não pode ser mais espessa que um quarto do diâmetro do núcleo maior;
- 5) Os dois núcleos podem-se tocar mas idealmente não se devem sobrepor, devendo-se sempre identificar as membranas nucleares dos dois;
- 6) A membrana citoplasmática de uma célula binucleada deverá estar intacta e ser distinta da membrana citoplasmática das células adjacentes.

Uma vez seleccionadas as células binucleadas que obedeçam aos critérios acima descritos, poder-se-á então pro-

ceder à determinação e contagem dos micronúcleos de acordo com os seguintes critérios:

- 1) O diâmetro de um micronúcleo varia entre 1/256 e 1/9 da área de um dos núcleos da célula binucleada;
- 2) Os micronúcleos possuem forma esférica ou oval;
- 3) Os micronúcleos não são refractivos por isso são facilmente distinguidos de artefactos;
- 4) Os micronúcleos não estão ligados ao núcleo principal;
- 5) Os micronúcleos podem-se tocar no entanto não se podem sobrepor aos núcleos principais e a membrana do micronúcleo tem de se distinguir correctamente da membrana nuclear;
- 6) Usualmente os micronúcleos e os núcleos principais têm a mesma intensidade de coloração.

A Figura 4a apresenta três linfócitos, um mononucleado, um binucleado sem micronúcleos e um binucleado com um micronúcleo;

A Figura 4b apresenta um linfócito binucleado com dois micronúcleos. Para a identificação de pontes nucleoplasmáticas é necessário em primeiro lugar ter células binucleadas com os dois núcleos claramente separados e então é possível detectar a sua presença em células que possuam as seguintes características (Fenech, 2003):

- 1) As pontes nucleoplasmáticas são ligações contínuas entre os dois núcleos;
- 2) Apesar da largura das pontes ser variável em geral não deve exceder em um quarto o diâmetro do núcleo;
- 3) As características da coloração das

pontes nucleoplasmática devem ser idêntico às da coloração do núcleo principal;

4) Apesar de raro é possível observar mais do que uma ponte nucleoplasmá-

tica numa célula binucleada;

5) Uma célula binucleada com uma ponte nucleoplasmática pode ou não conter um ou mais micronúcleos.

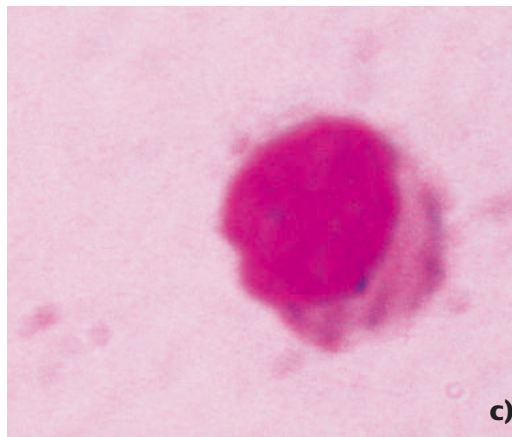
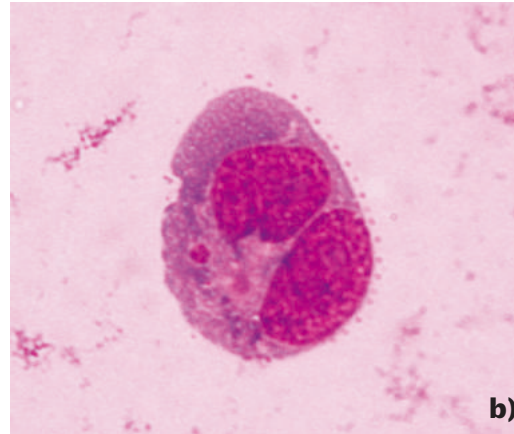
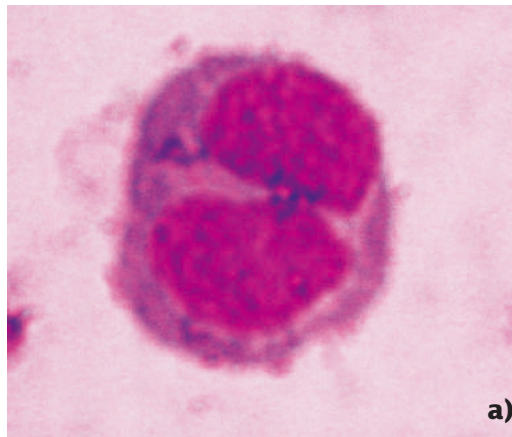


Figura 4.- Micronúcleos.

a) linfócitos binucleados sem micronúcleos

b) linfócito binucleado com dois micronúcleos

c) linfócito mononucleado ;

(coloração MGG, 1000X, fotografia inédita)

Para a identificação de protusões nucleares é necessário ter células binucleadas e é possível detectar a sua presença em células que possuam as seguintes características:

1) As protusões nucleares consistem em micronúcleos com ligação ao núcleo principal por uma ponte nucleoplasmática;

2) O diâmetro da protusão propriamente dita é de cerca de 1/16 e 1/3 do diâ-

metro médio do núcleo principal;

3) Tem as mesmas características a nível de coloração que o núcleo principal.

Associação preditiva com desenvolvimento de cancro

A maioria dos tumores apresenta cariótipos anormais, envolvendo re-arranjos cromossómicos e/ou aneuploidia. O número anormal de cromossomas pode

ocorrer por uma variedade de mecanismos, tais como: o número anormal de centríolos que conduz a mitoses multipolares, a perda de cromossomas durante a anáfase como resultado de defeitos no cinetocoro, a malsegregação de cromossomas durante a anáfase como resultado do defeito na separação dos cromátídeos, a inibição da mitose conduzindo à formação de células tetraplóides e a falha na citocinese por defeitos na montagem de microfilamentos (Larmarcovai *et al.*, 2008).

A hipótese de uma associação preditiva entre a frequência de micronúcleos em linfócitos cuja citocinese foi bloqueada e o desenvolvimento de cancro é suportada por várias premissas (Mateuca *et al.*, 2006): a associação entre a frequência de micronúcleos e o risco de cancro foi aferida pelas semelhanças mecanísticas entre aberrações cromossómicas, as quais se mostraram ser preditivas de cancro; elevada concordância observada entre os métodos de aberrações cromossómicas e micronúcleos em estudos *in vitro*; aumento da frequência de micronúcleos é observado em linfócitos de pacientes com can-

cro e em pacientes com síndrome de Bloom e Ataxia Telangiectasia; frequência de micronúcleos está associada significativamente com uma concentração baixa de vitaminas, como o folato, no sangue, cujas deficiências estão associadas a um aumento do risco de alguns cancros; relação directa entre a frequência de micronúcleos e estádios precoces da carcinogénese, com no caso de cancro cervical.

Estudos desenvolvidos por Bonassi *et al.* (2007) suportam a hipótese de a frequência de micronúcleos nos linfócitos do sangue periférico ser um biomarcador de risco de cancro. Alterações da estrutura do núcleo como micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas, são eventos comumente visualizados em estádios precoces de carcinogénese. Níveis elevados de micronúcleos são indicativos de defeitos na reparação de DNA e na segregação de cromossomas.

Estes resultam na geração de células-filhas com a “dose génica” alterada e desregulação da expressão de genes que pode evoluir para um fenótipo de instabilidade cromossómica observado

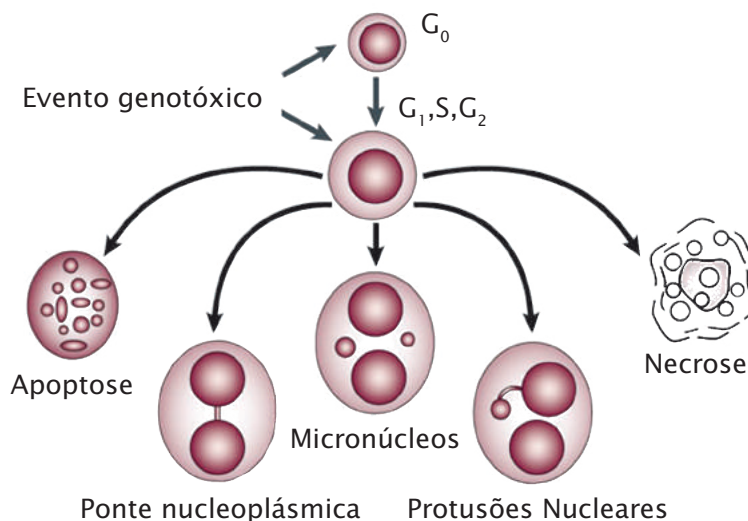


Figura 5. Fenómenos possíveis de estudar através de CBMN (adaptado de Fenech, 2007)

em situações de cancro.

O estudo de micronúcleos em células bloqueadas na citocinese é um ensaio de genotoxicidade que permite obter informação simultânea acerca de dano cromossómico resultante de quebras de cromossomas, rearranjos cromossómicos e amplificação génica. Comparado com outros ensaios citogenéticos, a quantificação de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e protusões nucleares (Figura 5) confere várias vantagens, incluindo a rapidez e facilidade da análise, não é necessário células em metáfase e a identificação clara das células que completaram apenas uma divisão celular. Este último pressuposto, previne factores de confundimento causados pelas diferenças na cinética da divisão celular (Utani *et al.*, 2007; El-Zein *et al.*, 2006; El-Zein, *et al.*, 2008).

Referências bibliográficas

- Au W., 2007. Usefulness of biomarkers *in* population studies: From exposure to susceptibility and to prediction of cancer, *Int. J. Environ.-Health* 210: 239-246.
- Bonassi S, Znaor A, Ceppi M., Lando C., Chang W., Holland N., Kirsch-Volders M., El-Zeiger R., Ban S., Barale R, Bigatti M., Bolognesi C., Cebulka-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic A, Hagmar L, Joksic G, Martelli A., Migliore L., Mirkova E., Scarfi M., Zijno A., Norppa H., Fenech M., 2007. An increased micronucleus frequency *in* peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer *in* humans, *Carcinogenesis*, 28: 625-631.
- El-Zein R., Schabath M., Etzel C., Lopez M., Franklin J., Spitz M., 2006. Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay as a Novel Biomarker for Lung Cancer Risk, *Cancer Res.* 66: 6449 – 6456.
- El-Zein R, Fenech M., Lopez M., Spitz M., Etzel C., 2008. Cytokinesis-Blocked Cytome Assay Biomarkers Identify Lung Cancer Cases amongst Smokers, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 17: 1111 – 1119.
- Fenech M., 2002. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer, *Drug Discovery Today* 22, vol. 7.
- Fenech M., Chang W.P., Kirsch-Volders M, Holland N., Bonassi S., Zeiger E., 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research* 534: 65–75.
- Fenech M., 2005. The Genome Health Clinic and Genome Health Nutrigenomics concepts: diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis, *Mutagenesis*, 20: 225 – 269.
- Fenech M., 2006. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death, *Mutation Research* 600: 58-66.
- Fenech M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay *Nature Protocols* 2: 1084-1104.
- Hoffelder D., Luo L., Burke N., Watkins S., Gollin S., Saunders W., 2004. Resolution of anaphase bridges *in* cancer cells, *Chromosoma* 112: 389 – 397.
- Larmarcovai G., Bonassi S, Botta A., Bann R.A., Orsière T., 2008. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature, *Mutat. Res.* 658: 215 – 233.
- Lindeberg H., Wang X, Järventaus H, Falck G., Norppa H., Fenech M., 2007. Origin of nuclear buds and micronuclei *in* normal and folate-deprived human lymphocytes, *Mutat. Res.* 617: 33 – 45.
- Mateuca R., Lombaert N., Aka P., Decor-

- dier I, Kirsch-Volders M., 2006. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability *in* human biomonitoring, *Biochimie* 88: 1515-1531.
- Serrano-García L., Montero-Montoya R., 2001. Micronuclei and Chromatid Buds are result of related genotoxic events, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 38: 38 – 45.
- Shimizu N., Itoh N., Utiyama H., Wahl G., 1998. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase, *Journal Cell Biology* 140: 1307-1320.
- Speit G., Schmid O., Fröhler-Keller M., Lang I., Triebig G., 2007. Assessment of local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by micronucleus test with exfoliated buccal mucosa cell, *Mutation Research* 627:129-135.
- Thomas P., Umegaki K., Fenech M., 2003. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement *in* the cytokinesis-block micronucleus assay, *Mutagenesis* 18:187 – 194.
- Tuimala J., Szekely G., Wikman H., Järventaus H., Hirvonen A., Gundy S., Norppa H., 2004. Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: effects on levels of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations, *Mutation Research* 554: 319-33.
- Umegaki K., Fenech M., 2000. Cytokinesis-block micronucleus assay *in* WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils, *Mutagenesis* 15: 261-269.
- Utani K., Kawamoto J., Shimizu N., 2007. Micronuclei bearing acentric extrachromosomal chromatin are transcriptionally competent and may perturb the cancer cell phenotype, *Mol. Cancer Res.* 5: 695 – 704.
- Vine M., 1994. Biological markers: their use *in* quantitative assessments. *Adv Dent Res* 8: 92-99.
- Waterfield C., Timbrell J., 1999. Biomarkers – An Overview. Em B. Ballantyne, T. Marrs & T. Syversen (Eds.), *General and Applied Toxicology*. Stockton Press.
- Zalacain M., Sierrasesúmagu L, Patiño A, 2005. The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents, *An. Sist. Sanit. Navar.* 28: 227-236.

Estudo comparativo entre microscopia óptica e PCR para identificação de *Plasmodium* spp. em crianças em Angola

Comparison between optical microscopy and PCR for identification of *Plasmodium* spp. in children in Angola

JFilomeno Fortes¹, Rafael Dímbu¹, Zoraima Neto², Carolina Ferreira ¹, Nilton Saraiva ¹, Virgílio E. do Rosário², Dinora Lopes².

¹ Programa Nacional de Controlo da Malária, MINSA, Luanda, Angola

² Centro Malaria e Doenças Tropicais/Instituto de Higiene e Medicina Tropical/ Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.

Resumo

A malária é a principal causa de morbimortalidade em Angola. A infeção assintomática é frequente e a implementação da política de tratamento na base das combinações dos derivados de artemisinina (ACTs), apresenta alguns constrangimentos relacionados com a insuficiente e duvidosa qualidade de diagnóstico microscópico, e ao fraco conhecimento das espécies plasmódicas circulantes. O estudo por técnica de PCR, em crianças assintomáticas menores de cinco anos, permitiu confirmar o elevado nível de endemidade da malária (índice plasmódico de 45%), identificar 3 espécies de *Plasmodium* (*falciparum*, *Malariae* e *ovale*), com predomínio do *Plasmodium falciparum* (87%), e um percentual importante de infeções mistas (10%). A avaliação comparativa da sensibilidade do diagnóstico parasitológico por microscopia óptica em relação ao PCR, mostrou um percentual de 41% de falsos positivos e 27% de falsos negativos. Recomenda-se a discussão dos critérios de diagnóstico e de tratamento da malária em Angola tendo em conta a endemidade, a qualidade da microscopia óptica e a possibilidade alternativa do uso de testes sero-imunológicos, assim como o percentual de infeções mistas não diagnosticadas através da microscopia óptica.

Palavras-chave: *Plasmodium*, microscopia óptica, PCR, qualidade de diagnóstico parasitológico

Autor correspondente: Dr Dinora Lopes (PhD), E-mail: dferreira@ihmt.unl.pt

Abstract

Malaria is the leading cause of morbidity and mortality in Angola. The asymptomatic infection is frequent, and the implementation of the treatment policy based in artemisinin combinations is confronted by the insufficient and bad quality of the microscopic diagnosis, aggravated by the absence of knowledge of the specimens of *Plasmodium* in the country. The use of PCR diagnosis in asymptomatic under five, allowed to confirm the high level of the endemic of malaria in the country (45%), to identify three out of the four specimens of *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*) with the predominance of *P. falciparum* (87%), and to identify an important rate of mixed infections. The comparison of the sensitivity and specificity between PCR and the microscopic diagnosis showed a higher percentage of

wrong positive and negative cases, 41% and 27%, respectively. The study recommends the discussion of the criteria used *in* the diagnosis and treatment of malaria *in* the country, based *in* the endemic level, the improvement of the coverage and quality of the microscopic diagnosis, the possibility of the use of the rapid diagnostic test methods, and the existence of an important level of mixed infections not observed by the microscopic method.

Keywords: *Plasmodium*, optical microscopy, PCR, Parasitological diagnosis quality.

Introdução

Angola é um país situado na Costa Ocidental de África, com diferentes níveis de endemidade de malária. A doença constitui a principal causa de morbimortalidade no país, afectando principalmente menores de cinco anos e mulheres grávidas.

O Programa Nacional de Controlo da Malária estimou em 2005 uma prevalência de 4 milhões de casos clínicos por ano, e 20 mil óbitos. O padrão atual de estratificação epidemiológica baseia-se essencialmente no conhecimento da prevalência da infecção plasmódica assintomática obtida através de estudos parasitológicos baseados na microscopia óptica, estratificando o país em áreas de alta transmissão, transmissão moderada estável e transmissão moderada instável.

Até à realização deste estudo os relatórios oficiais faziam referência à alta prevalência de *Plasmodium falciparum* (acima dos 90%) e negavam a existência de *Plasmodium ovale*. O país iniciou em 2007 a implementação do uso das combinações terapêuticas baseadas nos derivados de artemisinina, com critérios clínicos sustentados sempre que possível pelo diagnóstico parasitológico por microscopia óptica. Mais recentemente, em algumas áreas iniciou-se a utilização de testes rápidos de diagnóstico (sero-imunológicos) sem uma política ainda bem definida.

Uma terapia racional no tratamento da malária é essencial para retardar a disseminação da resistência aos antimaláricos. O diagnóstico clínico apesar da sua ambiguidade, mantém-se a base da decisão terapêutica para a maioria dos pacientes com síndromes febris nas áreas endêmicas para malária, onde o suporte laboratorial é muitas vezes inacessível ou inadequado (Jonkman *et al.*, 1995; Luxemburger *et al.*, 1998; Bojang *et al.*, 2000).

O tratamento eficaz da malária necessita de um diagnóstico laboratorial preciso, que permita a identificação e diferenciação das espécies de *Plasmodium* entre si. A detecção e identificação das espécies de *Plasmodium* por microscopia óptica em gota espessa ou esfregaço corado com Giemsa continua a ser a técnica designada de “gold standard” no diagnóstico laboratorial da malária.

Um microscopista experiente detecta aproximadamente 20 parasitas/ μ l (Jonkman *et al.*, 1995). Esta técnica é barata e simples, e é capaz de definir a densidade do parasita, estágio do ciclo de vida, e identificação de espécie, mas requer treino contínuo, controlo ou supervisão e condições mínimas de laboratório para poder efectuar um diagnóstico correcto (Reyburn *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos por esta técnica dependem da qualidade da coloração e da experiência do técnico microscopista (Alexander *et al.*, 2010; Bowers *et*

al., 2009; Coleman *et al.*, 2002), sendo uma técnica que apresenta pouca sensibilidade e especificidade em parasitemias extremamente baixas e na detecção de infecções mistas (Speers *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2006). A qualidade da coloração constitui um factor fundamental (Inkathone *et al.*, 2001; Amexo *et al.*, 2004; Humar *et al.*, 1997; Fogg *et al.*, 2008; Ndao *et al.*, 2005; Kain *et al.*, 1998).

Novas metodologias têm sido desenvolvidas para ultrapassar os problemas associados ao diagnóstico da malária por microscopia, tais como metodologias baseadas em técnicas moleculares ou imunológicas.

Nas últimas décadas, novos métodos moleculares têm sido introduzidas, tais como a reacção em cadeia da polimerase (PCR) e em tempo real, reacção em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR). *Polimerase chain reaction* (PCR) é um método que permite a identificação das *Plasmodium spp.*

Vários protocolos de PCR têm sido desenvolvidos para o diagnóstico laboratorial da malária, incluindo técnicas de PCR convencional e de “real time” PCR, os quais permitem a diferenciação entre as 4 espécies de *Plasmodium* que infectam o Homem (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2005; Mangold, *et al.*, 2005; Milne *et al.*, 1994; Myjak *et al.*, 2002; Ndao *et al.*, 2004; Perandin *et al.*, 2004; Rougemont *et al.*, 2004; Speers *et al.*, 2003, Andrade *et al.*, 2010).

O *Nested* PCR e o *real time* PCR apresentam uma elevada sensibilidade e especificidade comparativamente com microscopia óptica (Khairnar *et al.*, 2009; Shokoples *et al.*, 2009). No entanto estas técnicas moleculares são bastante mais dispendiosos e necessitam de mais equipamento e de técnicos com formação na área, tornando-as de difícil implementação de rotina em áreas endémicas. Estas técnicas apresentam uma sensibilidade muito supe-

rior à microscopia óptica, sendo o limite de detecção do PCR entre 0.7 e 0.02 parasites/ μ l (Hermesen *et al.*, 2001; Bell & Ranford Catwright 2002; Schneider *et al.*, 2005).

Recentemente têm sido desenvolvidos vários testes rápidos de diagnóstico, estes testes são rápidos, baratos fáceis de realizar e não requerem equipamento específico (Wongsrichanalai 2001; Moody, 2002; Mboera *et al.*, 2006; Murray *et al.*, 2008). Baseiam-se no reconhecimento de antígenos de *Plasmodium* na circulação sanguínea do paciente, detectam <100 parasitas/l verificando-se um decréscimo da sensibilidade em parasitemias baixas (Moody, 2002; Murray *et al.*, 2003).

Um dos grandes problemas associados aos testes rápidos está relacionado com a persistência dos antígenos na circulação, após a eliminação dos parasitas, em particular a *histidine rich protein II* (HRP-II), este facto origina falsos positivos quando a microscopia é utilizada como teste de referência (Tjitra *et al.*, 1999; Mayxay *et al.*, 2001; Moody, 2002). Alguns testes úteis na identificação de *P. falciparum*, mas apenas permitem a identificação das espécies não *P. falciparum* não permitindo a distinção de *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*.

Pretende-se com este estudo melhorar o conhecimento da prevalência de casos assintomáticos no grupo alvo de menores de cinco anos, clarificar a existência das espécies de *Plasmodium* circulantes, e avaliar a qualidade do diagnóstico parasitológico efectuado por microscopia óptica. O conjunto desta informação deverá contribuir para uma melhor discussão e adequação da política nacional de diagnóstico e de tratamento da malária.

Material e métodos

Colheita de amostras

Num universo de 5000 crianças fo-

ram selecionadas aleatoriamente em conglomerados dos diversos estratos epidemiológicos 1012 amostras de sangue periférico (punção digital) de crianças, com idades compreendidas entre os 6 meses e os 5 anos. Foram incluídas crianças sem sintomas de malária e de outras patologias. A colheita foi realizada entre Janeiro e Setembro de 2007, nas províncias de Malanje, Uíge, Kuanza Norte, Huambo, Cabinda.

Foi realizado esfregaço sanguíneo e gota espessa para diagnóstico parasitológico de malária por microscopia óptica, com coloração de Giemsa (Warhurst *et al.*, 1996; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2005). O restante sangue colhido foi conservado em papel de filtro *Whatman* nº4 para posterior extração de DNA.

Extração de DNA

A extração do DNA total das amostras foi realizada através da técnica de fenol-cloroformio (Snounou *et al.*, 1993). Que consiste em três passos distintos:

(a) hemólise do sangue, contido no papel de filtro, com saponina e tampão de lise (Tris 40 mM (pH 8.0), EDTA 80 mM (pH 8.0), SDS 2%) a 37°C; **(b)** extração do DNA, realizada pela adição de fenol e fenol-cloroformio; **(c)** precipitação do DNA com acetato de sódio e etanol a -70°C.

Foram incluídos no processo de extração de DNA controlos positivos (DNA parasita) e negativos (brancos) de forma a podermos controlar quer a eficiência da extração quer a existência de contaminações cruzadas entre amostras durante a extração.

Identificação de espécies

A identificação das espécies de *Plasmodium* *sp.* foi realizada através de Nested PCR por amplificação dum fragmento específico de DNA em duas reacções de PCR distintas. Na primeira reacção amplificou-se uma região do gene *ssrRNA* – específico para o género *Plasmodium* e na segunda amplificou-se uma região dentro do primeiro fragmento utilizando primers específicos (tabela 1) para cada uma das quatro espécies: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. vivax* (Figura 1).

Em cada reacção de PCR foram incluídos controlos positivos (DNA das quatro espécies de *Plasmodium*) e controlos negativos (mistura de reacção), para controlo da eficiência da reacção e da existência de eventuais contaminações dos componentes da mistura de reacção. Apenas foram consideradas válidas as amplificações onde todos os controlos utilizados amplificaram correctamente.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleótidos utilizados na detecção de quatro espécies de *Plasmodium* spp. (*P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. vivax*) e tamanhos dos fragmentos amplificados (Snounou *et al.*, 1993).

Género	Reacção	Nome	Sequência	Tam. do fragmento amplificado
<i>Plasmodium</i>	1ª	rPLU5 rPLU6	5'-CTTGTGTTGCCTTAACTTC-3' 5'-TTAAATTTGTTGCAGTTAAACG-3'	1200pb
<i>P. Falciparum</i>	2ª	rFAL1 rFAL2	5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT-3' 5'-ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC-3'	205pb

Continuação

Gênero	Reacção	Nome	Sequência	Tam. do fragmento amplificado
P. Malariae	2ª	rMAL1 rMAL2	5'-ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC-3' 5'-AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA-3'	144pb
P. Ovale	2ª	rOVA1 rOVA2	5'-ATCTCTTTTGTCTATTTTCTAGTATTGGAGA-3' 5'-CGAAAAGGACACATTAATTGTATCCTAGTG-3'	800pb
P. vivax	2ª	rVIV1 rVIV2	5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3' 5'-ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCT- TA-3'	120pb

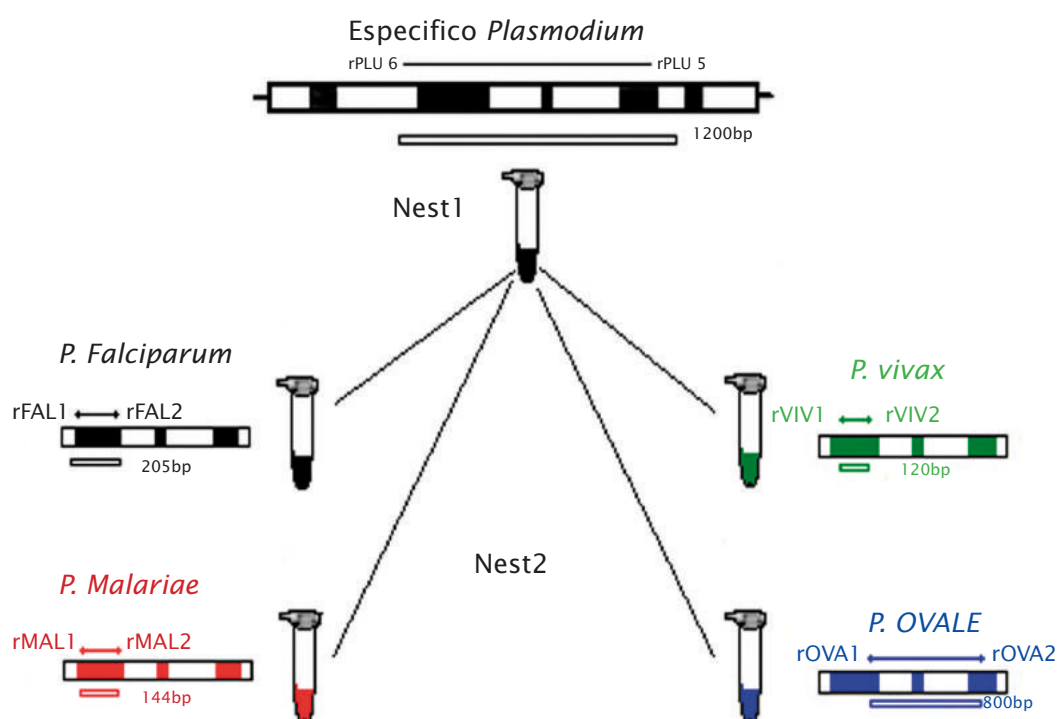


Figura 1. Representação esquemática da amplificação específica obtida por nested PCR do gene ssrRNA das quatro espécies de *Plasmodium* que infectam o Homem.

Na figura 1 encontra-se a posição aproximada dos pares de oligonucleótidos e o tamanho dos produtos obtidos. As áreas a cheio representam zonas do gene que são específicas para cada espécie, enquanto que as zonas a branco representam regiões que são altamente conservadas entre as diferentes espécies (Adaptado de Snounou, 1996).

As colheitas, a preparação e a leitura das lâminas foram efetuadas por técnicos de laboratório previamente treinados. Os resultados obtidos pela microscopia óptica e através da técnica de PCR foram comparados entre si através duma tabela de dupla entrada.

Resultados

A figura 2 representa as bandas DNA amplificado obtidas em gel de agarose e visualizados sob luz ultra-violeta.

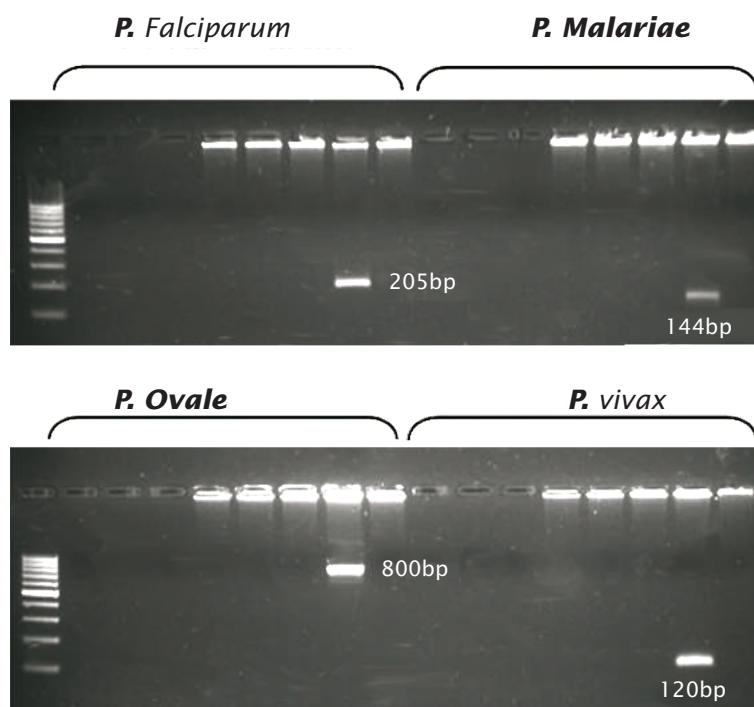


Figura 2. Fotografia representativa do produto amplificado das 4 espécies que infectam o Homem, com o tamanho dos respectivos fragmentos.

Nas 1012 amostras analisadas neste estudo verificou-se que existe uma discrepância significativa entre os resultados obtidos por microscopia optica e por PCR (Tabela 2).

Tabela 2. Taxa de infeção plasmódica obtida através da microscopia óptica e de PCR em menores de 5 anos (n=1012)

	Microscopia Óptica		PCR	
Positivos	576	57%	453	45%
Negativos	436	43%	559	55%
Total	1012	100%	1012	100%

Os resultados obtidos por microscopia óptica e por PCR foram tratados de forma a permitirem a comparação de amostras positivas e negativas para *Plasmodium* em ambas as técnicas (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação entre os resultados da microscopia óptica e PCR no estudo da infeção plasmódica em crianças dos 6 meses aos 5 anos (n=1012)

		PCR		Total
		Positivos	Negativos	
Microscopia Óptica	Positivos	336 (59%)	240 (41%)	576
	Negativos	117 (27%)	319 (73%)	436
	Total	453 (45%)	559 (55%)	1012

Pela leitura das lâminas (gota espessa e/ou esfregaço) foram apenas identificadas infecções simples por *P. falciparum*. No entanto a técnica de PCR permitiu a identificação das espécies de *Plasmodium* existentes em Angola, tendo sido identificadas todas as espécies com excepção do *Plasmodium vivax*. Foram ainda identificadas infecções mistas com duas ou três das espécies encontradas na amostra em estudo (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição das espécies de *Plasmodium* por PCR (n = 453)

Formas Simples				Formas Mistas			
<i>P. Falciparum</i>	<i>P. Vivax</i>	<i>P. Malariae</i>	<i>P. Ovale</i>	f+m	f+o	f+o+m	m+o
408 (87%)	0	10 (2%)	4 (0,85%)	28 (6%)	13 (3%)	3 (0,6%)	1 (0,2%)

Discussão

Neste estudo, embora os dados apresentados não estejam detalhados por estratos epidemiológicos, a taxa de infeção em crianças que não apresentavam sintomas no momento da colheita foi de 45% (PCR), comprovando a importância do nível de endemicidade da doença no país.

A especificidade do PCR permitiu confirmar a predominância das infecções simples por *Plasmodium falciparum* (87%), e chamar a atenção para um número importante de infecções mistas (10%) (Tabela 4), que regra geral não são detectadas na microscopia óptica e que podem ter relevância na conduta

terapêutica. Outro resultado relevante obtido a partir da análise das amostras por PCR, foi demonstração da existência de *P. ovale* em Angola, quer na forma simples quer em infecções mistas.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram a necessidade de dar continuidade a estes estudos para permitir uma actualização do perfil epidemiológico do país.

Em relação aos resultados comparativos do diagnóstico parasitológico por microscopia e por PCR como pode ser observada na tabela 2, a prevalência obtida por microscopia óptica é superior ao valor determinado por PCR (57% e 45% respectivamente). Uma la-

cuna deste trabalho, consiste no facto de não ter sido efectuado um controlo de qualidade da leitura das laminas por microscopia optica, de forma a eliminar o factor experiencia do observador, dos resultados obtidos.

Os resultados obtidos neste trabalho são preocupantes, devido aos valores exagerados de falsos negativos (27%) e de falsos positivos (41%) verificados na tabela 3, o que revela uma falência exagerada do diagnóstico parasitológico por microscopia óptica no país, agravado pelo facto dos técnicos envolvidos no estudo terem sido previamente treinados.

A microscopia óptica apresenta várias limitações associadas às condições laboratoriais, com destaque para a preparação e reutilização do corante, à experiência/formação dos próprios técnicos de diagnostico que efectuam as leituras, bem como ao elevado numero de diagnósticos efectuados diariamente.

A técnica de PCR é bastante mais fidedigna sendo baseada na presença/ausência de DNA do parasita na amostra de sangue apresentando, portanto, maior sensibilidade e especificidade. Nesta técnica foram utilizados controlos positivos e negativos quer da técnica de extracção de DNA quer no PCR. Os controlos negativos permitem-nos eliminar a possibilidade de contaminação (falsos positivos) em qualquer uma das fases de processamento. Em relação aos controlos positivos (DNA das 4 especies) garantem-nos a eficiencia da extracção e da reacção de PCR.

A existência de amostras positivas por PCR e negativas por microscopia deve-se à sensibilidade da técnica, como já foi amplamente descrito, o PCR é bastante mais sensível, permitindo detectar parasitemias extremamente baixas, o que não é possível por microscopia.

Por outro lado pode eventualmente dever-se também à falta de experiencia dos técnicos de diagnóstico, uma vez que todos eles foram submetidos a uma formação previa.

Em relação às amostras positivas por microscopia e negativas no PCR, provavelmente devem-se a dificuldades de leitura principalmente relacionadas com a coloração, nomeadamente modo de preparação do corante e reutilização do mesmo inumeras vezes.

Os nossos resultados são consistentes com os obtidos noutros estudos realizados em outras áreas endémicas, comprovando assim as limitações do diagnóstico por microscopia óptica e a elevada sensibilidade do PCR. Num estudo efectuado por Coleman e colaboradores, comparando PCR e microscopia na detecção de *Plasmodium* na Tailândia, demonstrou existir uma elevada proporção de amostras positivas por microscopia e negativas por PCR, e uma elevada proporção de amostras positivas por PCR e negativas por microscopia.

Noutro estudo realizado por Johnston (2006) foi demonstrada a superior sensibilidade do método de nested PCR relativamente à microscopia, permitindo a detecção de *Plasmodium* em parasitemias baixas, bem como em infecções mistas. Neste trabalho cerca de 2% das amostras foram identificados incorrectamente como *P. vivax* e *P. ovale* por microscopia.

A formação dos técnicos é fundamental para que o diagnóstico das diferentes espécies de malária seja efectuado correctamente, apesar da MO óptica ser menos sensível, que as técnicas de biologia molecular (PCR), dado ser mais económica e mais fácil de efectuar no terreno, a criação de condições entre elas uma boa formação dos técnicos torna-a mais adequada às condições

existentes.

A possibilidade do uso do diagnóstico clínico e do tratamento presuntivo em menores de 5 anos de áreas de alta endemicidade e com taxas de infecção plasmódica elevadas é discutível.

O uso de testes sero-imunológicos poderá ser uma alternativa ou um complemento ao diagnóstico microscópico em função do contexto epidemiológico e de cobertura sanitária. No entanto, a microscopia óptica para além de menos dispendiosa permite a avaliação quantitativa da parasitemia e a identificação da espécie de *Plasmodium* orientando e monitorando a terapêutica de uma forma mais adequada.

Referências bibliográficas

- Alexander N., Schellenberg D., Ngalala B., Petzold M., Drakeley C., Sutherland C., 2010. Assessing agreement between malaria slide density readings. *Malar J*, 9:4.
- Amexo M, Tolhurst R, Barnish G, Bates I., 2004. Malaria misdiagnosis: effects on the poor and vulnerable. *Lancet*, 364: 1896-1898.
- Andrade BB, Reis-Filho A, Barros AM, Souza-Neto SM, Nogueira LL, Fukutani KF, Camargo EP, Camargo LM, Barral A, Duarte A, Barral-Netto, 2010. M. Towards a precise test for malaria diagnosis in the Brazilian Amazon: comparison among field microscopy, a rapid diagnostic test, nested PCR, and a computational expert system based on artificial neural networks. *Malar J.*, 9: 117.
- Bell AS, Ranford-Cartwright LC, 2002. Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol*, 18: 337-42. Review.
- Bojang K.A., Obaro S., Morison L.A., Greenwood B.M., 2000. A prospective evaluation of a clinical algorithm for the diagnosis of malaria in Gambian children. *Trop Med Int Health*, 5: 231-6.
- Bowers KM, Bell D, Chiodini PL, Barnwell J, Incardona S, Yen S, Luchavez J, Watt H, 2009. Inter-rater reliability of malaria parasite counts and comparison of methods. *Malar J.*, 8: 267.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2005. Malaria surveillance— United States. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 54: 25–39.
- Coleman R.E., Maneechai N., Rachaphaew N., Kumpitak C., Miller R.S., Soyseng V, Thimasarn K, Sattabongkot J., 2002: Comparison of field and expert laboratory microscopy for active surveillance for asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in western Thailand. *Am J Trop Med Hyg*, 67: 141-144.
- Fogg C., Twesigye R., Batwala V., Piola P, Nabasumba C., Kiguli J., Mutebi F, Hook C., Guillemin M., Moody A., Guthmann J.P., 2008. Assessment of three new parasite lactate dehydrogenase (pan-pLDH) tests for diagnosis of uncomplicated malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 102: 25-31.
- Hermesen C.C., Telgt D.S., Linders E.H., van de Locht L.A., Eling W.M., Mensink E.J., Sauerwein R.W., 2001. Detection of *Plasmodium falciparum* malaria parasites *in vivo* by real-time quantitative PCR. *Mol Biochem Parasitol*. Dec;118: 247-51.
- Humar A., Ohrt C., Harrington M.A., Pillai D., Kain K.C., 1997. Parasight F test compared with the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travelers. *Am J Trop Med Hyg*, 56: 44-48.
- Inkathone S., Hay Burgess D.C., Kain K.C., 2001. The performance and utility of rapid diagnostic assays for *Plasmodium falciparum* malaria in a field setting in the Lao People's Democratic Republic. *Ann Trop*

- Med Parasitol, 95: 671-677.
- Jonkman A., Chibwe R.A., Khoromana C.O., Liabunya U.L., Chaponda M.E., Kandiero G.E., Molyneux M.E., Taylor T.E., 1995. Cost-saving through microscopy-based versus presumptive diagnosis of malaria in adult outpatients in Malawi. Bull World Health Organ, 73: 223-227.
- Kain K.C., Harrington M.A., Tennyson S., Keystone J.S., 1998: Imported malaria: prospective analysis of problems in diagnosis and management. Clin Infect Dis, 27: 142-149.
- Khairnar K., Martin D., Lau R., Ralevski F., Pillai D.R., 2009. Multiplex real-time quantitative PCR, microscopy and rapid diagnostic immunochromatographic tests for the detection of *Plasmodium* spp: performance, limit of detection analysis and quality assurance. Malar J., 8: 284.
- Luxemburger C, Nosten F, Kyle DE, Kiricharoen L, Chongsuphajaisiddhi T, White NJ., 1998. Clinical features cannot predict a diagnosis of malaria or differentiate the infecting species in children living in an area of low transmission. Trans R Soc Trop Med Hyg., 92: 45-49.
- Mangold, K. A., R. U. Manson, E. S. C. Koay, L. Stephens, M. Regner, R. B. Thomson, L. R. Peterson, and K. L. Kaul, 2005. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. J. Clin. Microbiol., 43: 2435-2440.
- Mayxay M, Pukrittayakamee S, Chotivach K, Looareesuwan S, White N.J., 2001. Persistence of *Plasmodium falciparum* HRP-2 in successfully treated acute *falciparum* malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg., 95: 179-82.
- Mboera L.E., Fanello C.I, Malima R.C., Talbert A., Fogliati P., Bobbio F., Molteni F., 2006. Comparison of the Paracheck-Pf test with microscopy, for the confirmation of *Plasmodium falciparum* malaria in Tanzania. Ann Trop Med Parasitol., 100: 115-22.
- Milne, L. M., M. S. Kyi, P. L. Chiodini, and D. C. Warhurst, 1994. Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom. J. Clin. Pathol., 47: 740-742.
- Moody A.H., Chiodini PL., 2002. Non-microscopic method for malaria diagnosis using OptiMAL IT, a second-generation dipstick for malaria pLDH antigen detection. Br J. Biomed Sci., 59: 228-231.
- Murray C.K., Gasser RA Jr, Magill A.J., Miller R.S., 2008. Update on rapid diagnostic testing for malaria. Clin Microbiol Rev. 21: 97-110. Review.
- Murray C.K., Gasser R.A Jr, Magill A.J., Miller R.S., 2008. Update on rapid diagnostic testing for malaria. Clin Microbiol Rev, 21: 97-110.
- Myjak P, Nahorski W., Pieniazek N.J. and Pietkiewicz H., 2002. Usefulness of PCR for diagnosis of imported Malaria in Poland. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 21: 215-218.
- Ndao M., Bandyayera E., Kokoskin E., Diemert D., Gyorkos T.W., MacLean J.D., St JR, Ward BJ, 2005. Malaria "epidemic" in Quebec: diagnosis and response to imported malaria. CMAJ, 172: 46-50.
- Ndao M., Bandyayera E., E. Kokoskin, Gyorkos T.W., MacLean J.D., and Ward B.J., 2004. Comparison of blood smear, antigen detection, and nested-PCR methods for screening refugees from regions where malaria is endemic after a malaria outbreak in Quebec, Canada. J. Clin. Microbiol., 42: 2694-2700.
- Perandin, Manca F. N., Calderaro A., Piccolo G., L. Galati, L. Ricci, Arcangeletti M. C., Snounou G., Dettori G., and Chezzi C., 2004. Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. J. Clin. Microbiol. 42: 1214-1219.

- PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLO DA MALÁRIA, 2010. Ministério da Saúde de Angola.
- Reyburn H, Mbatia R, Drakeley C, Carneiro I, Mwakasungula E, Mwerinde O, Saganda K, Shao J, Kitua A, Oloomi R, Greenwood BM, Whitty CJ., 2004. Overdiagnosis of malaria *in* patients with severe febrile illness *in* Tanzania: a prospective study. *BMJ.* 20; 329 (7476):1212.
- Rougemont M., M., Van Saanen, Sahli R., Hinrikson H. P., Bille J., and Jaton K., 2004. Detection of four *Plasmodium* species *in* blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* 42: 5636–5643.
- Schneider P, Wolters L, Schoone G, Schallig H, Sillekens P, Hermsen R, Sauerwein R., 2005. Real-time nucleic acid sequence-based amplification is more convenient than real-time PCR for quantification of *Plasmodium falciparum*. *J Clin Microbiol. Jan*, 43: 402-405.
- Shokoples SE, Ndao M, Kowalewska-Grochowska K., Yanow S.K., 2009. Multiplexed real-time PCR assay for discrimination of *Plasmodium* species with improved sensitivity for mixed infections. *J Clin Microbiol*, 47: 975-980.
- Snounou, G., 1996. Detection and identification of the four malaria parasites species infecting humans by PCR amplification. *in* *Methods in Molecular Biology: Species Diagnostics Protocols: PCR and other nucleic acid methods*. Clapp J.P. Editor, Human Press Inc. Totowa, N.J., 50: 263-291.
- Snounou, G.; Viriyakosol, S.; Jarra, W.; Thaithong, S. & Brown, K. N., 1993. Identification of the four human malaria parasite species *in* field samples by the polymerase chain reaction and detection of high prevalence of mixed infections. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 58: 283-292.
- Speers D. J., Ryan S., Harnett G. and Chidlow G., 2003. Diagnosis of malaria aided by polymerase chain reaction *in* two cases with low-level parasitemia. *Intern. Med. J.* 33: 613–615.
- Johnston S. P., Pieniazek N. J., Xayavong M. V., Slemenda S. B., Wilkins P. P. and Da Silva A. J., 2006. PCR as a Confirmatory Technique for Laboratory Diagnosis of Malaria Division of Parasitic Diseases, *Journal of clinical microbiology*, Mar, P. 1087–1089.
- Tjitra E., Suprianto S., Dyer M., Currie B.J., Anstey N.M., 1999. Field evaluation of the ICT malaria P.f/P.v immunochromatographic test for detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* *in* patients with a presumptive clinical diagnosis of malaria *in* eastern Indonesia. *J Clin Microbiol*, 37: 2412-2417.
- Torres KL, Figueiredo DV, Zalis MG, Daniel-Ribeiro CT, Alecrim W, Ferreira-da-Cruz Mde F., 2006. Standardization of a very specific and sensitive single PCR for detection of *Plasmodium vivax* *in* low parasitized individuals and its usefulness for screening blood donors. *Parasitol Res.*, 98: 519-24.
- Warhurst D.C., Williams J.E., 1996: ACP Broadsheet no 148. Laboratory diagnosis of malaria. *J Clin Pathol*, 49: 533-538.
- Wongsrichanalai C., 2001. Rapid diagnostic techniques for malaria control. *Trends Parasitol.* 17: 307-9. Review.

Publique os resultados
da sua investigação na



Revista Científica Multidisciplinar

CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Email : revistacienciatecnologia@gmail.com

Consulte as instruções para autores na edição nº1 da Rev. CT

Correlação entre marcadores moleculares de resistência e falência terapêutica na malária por *Plasmodium falciparum*

Correlation between molecular markers of resistance and treatment failure in *Plasmodium falciparum* malaria

Fátima Nogueira e Virgílio E. do Rosário

Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Rua da Junqueira nº 100, 1349-008 Lisboa, Portugal

Resumo

Uma avaliação da correlação entre os resultados do tratamento com anti-maláricos e marcadores moleculares contribui para melhorar a detecção precoce e monitorização da resistência de *Plasmodium falciparum* aos fármacos em uso. O objectivo desta revisão foi avaliar o risco de falência terapêutica associada com determinado polimorfismo no genoma do parasita. Baseamos a nossa análise em vários estudos clínicos de malária não grave por *P. falciparum* e incidiu sobre os marcadores genéticos: SNPs para pfmdr1, pfcr1, pfdhfr, pfdhps, o número de cópias do gene pfmdr1. Os estudos analisados forneciam informações sobre critérios de inclusão dos pacientes, eficácia terapêutica, dias de acompanhamento médico (follow-up) e genotipagem dos parasitas. Os resultados foram estratificados por gene, codão, fármaco, e dias de follow-up. O risco de falência terapêutica, verificada ao dia 28 após tratamento com cloroquina ou amodiaquina, aumenta com presença de parasitas portadores de mutações K76T no gene pfcr1 e N86Y no gene pfmdr1. Para a sulfadoxina/pirimetamina a ocorrência do mutante simples (S108N) e o mutante triplo (S108N, N51I, C59R) no gene pfdhfr, bem como do quádruplo mutante pfdhfr+pfdhps aumenta o risco de falência terapêutica a esta combinação de fármacos. No que respeita ao número de cópias do gene pfmdr1, o aumento de número de cópias está relacionado com a falência terapêutica do tratamento com mefloquina. É possível pois associar os marcadores moleculares nos genes pfmdr1, pfcr1, pfdhfr and pfdhps ao aumento do risco de falência terapêutica.

Palavras-chave: marcadores moleculares, resistência a fármacos, *Plasmodium falciparum*, falência terapêutica.

Autor correspondente: Dr Fátima Nogueira, E-mail: fnogueira@ihmt.unl.pt

Abstract

An assessment of the correlation between anti-malarial treatment outcome and molecular markers could improve the early detection and monitoring of drug resistance by *Plasmodium falciparum*. The purpose of this review was to analyse the risk of treatment failure associated with specific polymorphisms in the parasite genome or gene copy number. We based our analysis on several clinical studies of non-severe malaria reporting on genetic markers (SNPs for pfmdr1, pfcr1, dhfr, dhps, gene copy number for pfmdr1), with complete information on patients inclusion criteria, outcome, follow up and parasite genotyping. Results were stratified by gene, codon, drug and time points of the follow-up period. The risk of thera-

peutic failure at Day 28 after chloroquine or amodiaquine treatment was increased by the presence of *pfcr* K76T and *pfmdr1* N86Y mutations. For sulphadoxine-pyrimethamine, the presence of the single (S108N) or triple (S108N, N511, C59R) mutant *pfdhfr* gene and *pfdhfr*+*pfdhps* quintuple mutant also correlates with therapeutic failure as parasites were detected on Day 28 after treatment. Increased *pfmdr1* copy number was also correlated with mefloquine treatment failure. Genetic markers on genes *pfmdr1*, *pfcr*, *pfdhfr* and *pfdhps* are positively associated to risk of therapeutic failure.

Keywords: Molecular markers, drug resistance, *Plasmodium falciparum*, treatment failure

Introdução

O diagnóstico precoce e o tratamento da malária não complicada por *P. falciparum* com anti-maláricos, continuam a ser a principal forma de controlo da doença nas áreas endémicas.

A selecção e propagação da resistência de *P. falciparum* à cloroquina (CQ) e sulfadoxina/pirimetamina (SP), tornou estes dois fármacos (de baixo custo e efeitos secundários negligenciáveis) ineficazes para o tratamento da malária na maioria das áreas endémicas, comprometendo os programas de controlo da mesma (Hastings, 2003; White, 2004).

Existem duas formas de avaliar a susceptibilidade de *P. falciparum* aos anti-maláricos: avaliando a resposta terapêutica em pacientes infectados (*in vivo*) ou usando testes *in vitro*. Os testes *in vivo* requerem substancial apoio logístico e sua interpretação é condicionada por factores como a possibilidade de reinfeção, imunidade do paciente ou a farmacocinética (diferente entre populações humanas) (Uhleman *et al.*, 2005).

Quanto aos testes *in vitro*, estes são independentes dos referidos factores

e, além disso, a extrapolação dos resultados para a resposta clínica é difícil (Plowe, 2003). A identificação da base molecular de resistência aos anti-maláricos, e a sua relação com falência terapêutica, representa uma mais valia na capacidade de monitorização da resistência aos mesmos (Woodrow & Krishna, 2006).

Vários estudos têm revelado associação entre a mutação K76T no gene *pfcr* e o fenótipo de resistência *in vitro* à CQ (Carlton *et al.*, 2001). A análise da sequência do gene *pfmdr1* (codificante de uma proteína pertencente a uma sub-família de transportadores associados à multi-resistência a fármacos) revelou uma série de mutações associadas à resistência a diferentes anti-malaricos (Cowman, 1991).

Mais recentemente, o aumento do número de cópias deste gene foi também associado à falência terapêutica do tratamento com mefloquina (MEF), diminuição da susceptibilidade à lumefantrina (LUM) e halofantrina (HAL) (Price *et al.*, 1999).

A resistência à SP é conferida por mutações pontuais nos genes que codificam para as enzimas dehidrofolato redutase (DHFR; *pfdhfr*) e dehidropteroato

sintetasease (DHPS; pfdhps), resultando na diminuição da afinidade das enzimas para o fármaco (Plowe *et al.*, 1997).

A base molecular da susceptibilidade de *P. falciparum* aos derivados da artemisinina não foi ainda estabelecida, embora tenha sido proposta uma associação com o gene *pfatp6* (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003).

Estudos com o modelo experimental de malária em roedor *P. chabaudi*, demonstrou a presença de mutações no gene *pfubp-1* (que codifica uma enzima de desubiquitinação) em clones resistentes à artemisinina e artesunato (Hunt P *et al.*, 2007). No entanto ainda não se conseguiu provar o papel deste na resistência de *P. falciparum* aos mesmos antimaláricos a qual foi já identificada no Sudoeste asiático em 2008 (Rogers W O *et al.*, 2009).

Compreender a relação entre os possíveis marcadores moleculares e a resistência do parasita/falência terapêutica tem sido uma prioridade, por motivos diversos incluindo a tomada de decisão sobre as combinações terapêuticas como é o caso das baseadas em derivados da artemisinina (ACTs) que têm vindo a substituir as monoterapias, como primeira linha de tratamento da malária não grave por *P. falciparum* (Laufer *et al.*, 2007).

Surpreendentemente, mecanismos como o de actuação da amodiaquina (AMQ), um dos fármacos mais amplamente usados como parte dos ACTs, não é ainda conhecido (Holmgren *et al.*, 2006). A SP é a combinação terapêutica actualmente usada para o Tratamento Intermitente Preventivo (TIP), administrado em grávidas e crianças, mas não

tem sido avaliada a influência da resistência aos anti-folatos no TIP nem o impacto do TIP na selecção de parasitas resistentes.

Embora não seja habitual mudar as políticas de tratamento com base apenas em estudos moleculares, alguns têm demonstrado que uma alta prevalência de marcadores moleculares de resistência podem ser muito úteis na mudança informada dos regimes de tratamento (Djimde *et al.*, 2001; Mugittu *et al.*, 2004).

Assim, espera-se que a identificação precoce de marcadores de resistência facilite a implantação de políticas de tratamento racional que permitam retardar a selecção e dispersão de parasitas resistentes aos medicamentos anti-maláricos. Um passo fundamental no processo de validação dos resultados experimentais, é verificar a correlação entre os marcadores moleculares do parasita e a resposta clínica do paciente com malária.

Resultados e discussão.

Esta análise refere-se apenas a estudos em que se recorreu à genotipagem dos parasitas, para excluir a possibilidade de reinfeção. Apesar do grande número de estudos publicados sobre falência terapêutica aos anti-maláricos, apenas cerca de 10% abordam especificamente a correlação entre eficácia terapêutica e marcadores moleculares de resistência.

Para os medicamentos aqui abordados, a resistência ocorre fundamentalmente através de dois mecanismos. A resistência às quinolinas (ex: CQ, LUM, MEF ou AMQ) que é multi-génica e, pelo menos para a CQ, afecta a acumulação do fármaco no vacúolo digestivo do para-

sita (Foley & Tilley, 1998; Hyde, 2007). Em contraste, o mecanismo molecular subjacente à resistência aos anti-folatos (SP), envolve a acumulação de mutações no gene que codifica a enzima alvo (Ekland & Fidock, 2007).

Polimorfismos do gene pfmdr1.

Poucos estudos abordam outros poli-

morfismos que não o codão 86 deste gene. Analisando diferentes estudos verifica-se que, o risco de falência terapêutica com CQ ao dia 14 ou dia 28 é maior em pacientes que alberguem parasitas com o polimorfismo N86Y no gene pfmdr1 (ver Tabela).

Tabela. Polimorfismos de *P. falciparum* ligados à resistência/falência terapêutica, fármacos, duração do follow-up e respectivos odds ratio.

Gene	Polimorfismo	Fármaco	Follow-up (genotipagem)	Odds Ratio	Nº de estudos
pfmdr1	N86Y	CQ	14	2,2	11
“	“	CQ	28-42	1,8	11
“	“	CQ	28(gen)	1,9	7
“	“	AMQ	14-21-28	5,4	6
pfmdr1	Nº de cópias	MEF	28	8,6	1
“	“	MEF+ART	42	2,6	1
pfcr1	K76T	CQ	14	2,1	13
“	“	“	28	7,2	12
“	“	“	28(gen)	5,1	8
pfmdr1 + pfcr1	N86Y + K76T	CQ	14-28	3,9	5
pfdhfr	S108N	SP	14-28	2,1	18
“	“	“	28	3,5	10
“	N51I	“	14-28	1,7	6
“	C59R	“	14-28	1,9	13
“	N51I+C59R+S108N	“	14-28	4,3	16
“	N51I+C59R+S108N	“	28(gen)	3,1	8
pfdhps	A437G	“	14-28	1,5	12
“	A437G+K540E	“	14-28	3,9	10
pfdhfr + pfdhps	Quintuplo	“	14-28	5,2	3

Nota: Genotipagem (Gen.) significa que a análise se limitou a estudos que discriminam entre reinfeção e recrudescência.

Esta mutação no pfmdr1 está também associada à falência terapêutica com AMQ em monoterapia (ver Tabela) (Ochong *et al.*, 2003; Duraisingh *et al.*, 1997; Happi *et al.*, 2006; Ursing *et al.*, 2007; Holmgren *et al.*, 2006; Tinto *et al.*, 2006).

Polimorfismos no gene pfcr1.

No que respeita ao polimorfismo K76T do gene pfcr1 é possível encontrar uma associação positiva entre a presença desta mutação e a falência terapêutica

com CQ em pacientes seguidos 14 ou 28 dias (ver Tabela). Analisando a associação dos polimorfismos N86Y em *pfdmr1* e K76T em *pfcrt* em conjunto e no que respeita ao tratamento com CQ, verifica-se em vários estudos de acompanhamento até ao 28º dia, que existe uma forte associação entre estes dois polimorfismos (ver Tabela) e a ocorrência de falência terapêutica (Mockenhaupt *et al.*, 2005; Djimde *et al.*, 2001; Pillai *et al.*, 2001; Happi *et al.*, 2003).

Polimorfismos dos genes pfdhfr e pfdhps.

Vários estudos associam os polimorfismos simples N511, C59R ou S108N e o triplo mutante N511+C59R+S108N no gene *pfdhfr* à falência terapêutica com SP (ver Tabela) (Happi *et al.*, 2005; Ndounga *et al.*, 2007; Tinto *et al.*, 2007; Kublin *et al.*, 2002; Djaman *et al.*, 2007; Checchi *et al.*, 2002; Kyabayinze *et al.*, 2003; Basco *et al.*, 1998).

A possibilidade de falência terapêutica à SP aumenta com acumulação de mutações no gene *pdhfr* (ver Tabela). Poucos estudos abordaram isoladamente a relação entre as mutações A437G ou K540E no gene da dihidropteroato sintase (*pfdhps*) e a resposta à terapêutica com SP.

No entanto, os que o fazem demonstram uma relação positiva entre falência terapêutica à SP e a ocorrência de pelo menos uma destas mutações (ver Tabela), (Basco *et al.*, 2000; Khalil *et al.*, 2005; Hamour *et al.*, 2005; Tinto *et al.*, 2007; A-Elbasit *et al.*, 2008; Checchi *et al.*, 2002; Mockenhaupt *et al.*, 2005; Basco *et al.*, 1998; Tahar *et al.*, 2007), sendo que a associação é mais forte quando ocorre o mutante duplo A437G+K540E (ver Tabela) (Phompida *et al.*, 2007;

Basco *et al.*, 2000; Omar *et al.*, 2001; Happi *et al.*, 2005; Kun *et al.*, 1999;

Alifrangis *et al.*, 2003; Sendagire *et al.*, 2005; Checchi *et al.*, 2002; Alker *et al.*, 2008; Kublin *et al.*, 1998). Quando analisados em conjunto os genes *pfdhfr* e *pfdhps* verifica-se que a presença do quintuplo mutante *pfdhfr* (N511+C59R+S108N)+*pfdhps* (A437G+K540E) implica uma associação muito forte com a falência terapêutica ao tratamento com SP (ver Tabela).

No entanto, em alguns estudos, a probabilidade de ocorrer falência terapêutica com SP e a ocorrência do triplo mutante *pfdhfr* é idêntica à de ocorrer falência com quintuplo mutante *pfdhfr*+*pfdhps* (Aubouy *et al.*, 2003; Alifrangis *et al.*, 2003; Eriksen *et al.*, 2004).

Embora a relação entre as mutações nos genes *pfdhfr* e *pfdhps* e a falência terapêutica com antifolatos esteja bem definida, a contribuição das diferentes mutações em cada um dos genes não é clara mas a presença do denominado quintuplo mutante é indicativo de resistência elevada.

Para países com dificuldades económicas no desenvolvimento de trabalho laboratorial, pode-se definir quais as mutações a estudar pois a presença da mutação R59 no *pfdhfr* E450 no *pfdhps* é indicativo suficiente do quintuplo mutante (*pfdhfr*+*pfdhps*) (Baruch *et al.*, 1999; Bwijo *et al.*, 2003; Mayor *et al.*, 2008; Mbugi *et al.*, 2003; Przyborski *et al.*, 2003).

Número de cópias do gene pfdmr1.

Em estudos realizados no Sudoeste Asiático verifica-se existe correlação da falência terapêutica com MEF (em monoterapia) e o aumento do número de cópias do gene *pfdmr1* (Price *et al.*, 2004). Verifica-se também (na mesma região geográfica), que é mais frequente ocorrer falência terapêutica aos regimes terapêuticos com MEF+artesanato (MEF+AS) ou artemeter-lumefantrina (ART+LUM), nos casos em que os para-

sitas possuem um aumento do número de cópias de *pfmdr1*. A relação entre o número de cópias e a resposta à MEF refere-se apenas ao Sudoeste Asiático, não existindo prova desta relação fora desta região.

A resistência do parasita é um dos factores principais para a falência terapêutica, mas vários estudos clínicos têm evidenciado a importância da imunidade do hospedeiro na eliminação dos parasitas, em apoio à actividade do fármaco.

Esta imunidade é adquirida ao longo do tempo, com várias exposições ao parasita da malária e, portanto, relacionada com a idade do paciente e com a intensidade de transmissão em dada região (Hastings *et al.*, 2005). Outros factores são a adesão do paciente ao tratamento, a dose do fármaco usada (qualidade do fármaco) e sua adequada absorção (Barnes *et al.*, 2007).

Não foi possível (por não existirem estudos publicados suficientes) incorporar nesta análise a idade e outros factores. Um outro factor importante é o facto de a maioria dos estudos terem sido realizados em África ao longo dos últimos 10 anos, limitando a relevância da análise no espaço e no tempo.

Além disso, mais de metade dos estudos publicados apenas seguem os pacientes até ao 14º dia, o que diminui a possibilidade de avaliar as falências terapêuticas mais tardias. A existência de genotipagem, que permita distinguir entre re-infecção e recrudescência é ainda pouco frequente nos estudos de eficácia terapêutica, mas um factor crucial para a determinação de verdadeira falência terapêutica.

Os estudos que permitem associar marcadores moleculares e falência terapêutica, usualmente referem-se a tratamentos em monoterapia. Estes estudos podem auxiliar a interpretação dos estudos para identificar/monitorizar a

eficácia das combinações terapêuticas hoje em uso.

Excepto para a SP e CQ, os dados sobre marcadores moleculares e falência terapêutica são ainda limitados para que se possa prever com segurança a resposta terapêutica aos anti-maláricos. Para a AMQ existem indicação de que o polimorfismo N86Y no gene *pfmdr1* esteja associado à falência terapêutica, mas faltam dados sobre as outras quinolinas (como MEF ou LUM) usadas nos ACTs.

Seja qual for o medicamento a ser testado e o polimorfismo a ser monitorizado, é de suma importância chegar a um “consenso” sobre a metodologia do estudo, principalmente quando se pretende efectuar comparação entre resultados obtidos de áreas geográficas diferentes. O mesmo pode-se dizer em relação ao tempo ou abordagens sazonais.

Iniciativas recentes, como a “reunião de consenso” sobre o uso de genotipagem em ensaios clínicos (WHO, 2007) e da World Wide Antimalarial Resistance Network (Sibley *et al.*, 2008) pretendem contribuir para fornecer orientações sobre como analisar e relatar dados sobre ensaios clínicos, ensaios *in vitro*, determinantes moleculares de resistência e farmacocinética da resistência de *P. falciparum* aos anti-maláricos.

De uma forma geral, concluiu-se que os estudos sobre falências terapêuticas devem ser padronizados e terem uma análise de estudo alargada a várias instituições, bem como comunicados aos decisores políticos.

Referências bibliográficas

A-Elbasit I.E., Khalil I.F., Elbashir M.I., Masuadi E.M., Bygbjerg I.C., Ali-frangis M., Giha H.A, 2008. High frequency of *Plasmodium falciparum* CICNI/ SGEAA and CVIET ha-

- plotypes without association with resistance to sulfadoxine/pyrimethamine and chloroquine combination in the Daraweesh area, in Sudan, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 27: 725-32.
- Alifrangis M., Enosse S., Khalil I.F., Tarimo D.S., Lemnge M.M., Thompson R., Bygbjerg I.C., Ronn A.M., 2003. Prediction of *Plasmodium falciparum* resistance to sulfadoxine/pyrimethamine *in vivo* by mutations in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes: a comparative study between sites of differing endemicity, Am J Trop Med Hyg, 69:601-606.
- Alker A.P., Kazadi W.M., Kutelemani A.K., Bloland P.B., Tshefu A.K., Meshnick S.R., 2008. dhfr and dhps genotype and sulfadoxine-pyrimethamine treatment failure in children with *falciparum* malaria in the Democratic Republic of Congo, Trop Med Int Health, 13: 1384-91.
- Aubouy A., Jafari S., Huat V., Migot-Nabias F., Mayombo J., Durand R., Bakary M., Le Bras J., Deloron P., 2003. DHFR and DHPS genotypes of *Plasmodium falciparum* isolates from Gabon correlate with *in vitro* activity of pyrimethamine and cycloguanil, but not with sulfadoxine-pyrimethamine treatment efficacy, J Antimicrob Chemother, 52: 43-49.
- Barnes K.I., Lindegardh N., Ogundahunsi O., Olliaro P., Plowe C.V., Randrianavelosia M., Gbotosho G.O., Watkins W.M., Sibley C.H., White N.J., 2007. World Antimalarial Resistance Network (WARN) IV: clinical pharmacology. Malar J., 6: 122.
- Baruch D.I., Ma XC, Pasloske B., Howard R.J., Miller L.H., 1999. CD36 peptides that block cytoadherence define the CD36 binding region for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. Blood., 94: 2121-2127.
- Basco L.K., Tahar R., Keundjian A., Ringwald P., 2000. Sequence variations in the genes encoding dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase and clinical response to sulfadoxinepyrimethamine in patients with acute uncomplicated *falciparum* malaria, J Infect Dis, 182:624-628.
- Bwijo B., Kaneko A., Takechi M., Zungu IL, Moriyama Y., Lum J.K., Tsukahara T., Mita T., Takahashi N., Bergqvist Y., Björkman A, Kobayakawa T., 2003. High prevalence of quintuple mutant dhps/dhfr genes in *Plasmodium falciparum* infections seven years after introduction of sulfadoxine and pyrimethamine as first line treatment in Malawi. Acta Trop., 85: 363-373.
- Carlton J.M., Fidock D.A., Djimdé A, Plowe C.V., Wellems T.E., 2001. Conservation of a novel vacuolar transporter in *Plasmodium* species and its central role in chloroquine resistance of *P. falciparum*, Curr Opin Microbiol, 4: 415-420.
- Checchi F., Durand R., Balkan S., Vonhm B.T., Kollie J.Z., Biberson P, Baron E., Le Bras J, Guthmann J.P., 2002. High *Plasmodium falciparum* resistance to chloroquine and sulfadoxine pyrimethamine in Liberia: results *in vivo* and analysis of point mutations, Trans R Soc Trop Med Hyg, 96:664-669.
- Cowman A.F., 1991. The P-glycoprotein homologues of *Plasmodium falciparum*. Are they involved in chloroquine resistance? Parasitol Today , 7: 70-76.
- Djaman J.A., Mazabraud A., Basco L., 2007. Sulfadoxine-pyrimethamine susceptibilities and analysis of the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of *Plasmodium falciparum* isolates from Côte d'Ivoire. Ann Trop Med Parasitol, 101: 103-12.
- Djimde A., Doumbo O.K., Cortese J.F., Kayentao K., Doumbo S., Diourté Y., Dicko A., Xin-Zhuan Su, Nomura T., Fidock D.A., Wellems T.E., Plowe C.V., 2001. A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. N Engl J Med, 344:257-263.

- Duraisingh M.T., Drakeley C.J., Muller O., Bailey R., Snounou G., Targett G.A., Greenwood B.M., Warhurst D.C., 1997. Evidence for selection for the tyrosine-86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* by chloroquine and amodiaquine, *Parasitology*, 114: 205-211.
- Eckstein-Ludwig U., Webb R.J., Van Goe-them I.D., East J.M., Lee A.G., Kimura M, O'Neill P.M., Bray P.G., Ward S.A., Krishna S, 2003. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*, *Nature*, 424: 957-961.
- Ekland E.H., Fidock D.A., 2007. Advances in understanding the genetic basis of antimalarial drug resistance, *Curr Opin Microbiol*, 10: 363-370.
- Eriksen J., Mwankusye S., Mduma S., Kitua A., Sweberg G., Tomson G., Gustafsson L.L., Warsame M., 2004. Patterns of resistance and DHFR/ DHPS genotypes of *Plasmodium falciparum* in rural Tanzania prior to the adoption of sulfadoxine-pyrimethamine as firstline treatment, *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 98: 347-353.
- Foley M., Tilley L., 1998. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents, *Pharmacol Ther*, 79: 55-87.
- Hamour S., Melaku Y., Keus K., Wambugu J., Atkin S, Montgomery J., Ford N., Hook C., Checchi F., 2005. Malaria in the Nuba Mountains of Sudan: baseline genotypic resistance and efficacy of the artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine and artesunate plus amodiaquine combinations, *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 99: 548-554.
- Happi C.T., Gbotosho G.O., Folarin O.A., Akinboye D.O., Yusuf B.O., Ebong O.O., Sowumi A., Kyle D.E., Milhous W., Wirth D.F., Oduola A.M.J., 2005. Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* dhfr and dhps genes and age related *in vivo* sulfadoxine-pyrimethamine resistance in malaria-infected patients from Nigeria, *Acta Trop*, 95: 183-193.
- Hastings I.M., Watkins W.M., 2005. Intensity of malaria transmission and the evolution of drug resistance. *Acta Trop*, 94: 218-229.
- Holmgren G., Gil J.P., Ferreira P.M., Veiga M.I., Obonyo C.O., Bjorkman A., 2006. Amodiaquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria *in vivo* is associated with selection of pfcr1 76T and pfmdr1 86Y, *Infect Genet Evol*, 6: 309-314.
- Hunt P., Afonso A., Creasey A., Culleton R., Sidhu A.B., Logan J., Valderamos S.G., McNae I., Cheesman S., Do Rosario V., Carter R., Fidock D.A., Cravo P., 2007. Gene encoding a deubiquitinating enzyme is mutated in artesunate- and chloroquine-resistant rodent malaria parasites. *Mol Microbiol*. 65: 27-40.
- Hyde J.E., 2007. Drug-resistant malaria – an insight, *FEBS J*, 274: 4688-4698.
- Khalil I.F., Ronn A.M., Alifrangis M., Gabar H.A., Jelinek T., Satti G.M., Bygbjerg I.C., 2005. Response of *Plasmodium falciparum* to cotrimoxazole therapy: relationship with plasma drug concentrations and dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genotypes, *Am J Trop Med Hyg*, 73: 174-177.
- Kublin J.G., Dzinjalama F.K., Kamwendo D.D., Malkin E.M., Cortese J.F., Martino L.M., Mukadam R.A., Rogerson S.J., Lescano A.G., Molyneux M.E., Winstanley P.A., Chipeni P., Taylor T.E., Plowe C.V., 2002. Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*, 185: 380-388.
- Kublin J.G., Witzig R.S., Shankar A.H., Zurita J.Q., Gilman R.H., Guarda J.A., Cortese J.F., Plowe C.V., 1998. Molecular assays for surveillance of antifolate-resistant malaria, *Lancet*, 351: 1629-1630.
- Kun J.F.J., Lehman L.G., Lell B., Schmidt-Ott R., Kremsner P.G., 1999. Low-

- dose treatment with sulfadoxine-pyrimethamine combinations selects for drug-resistant *Plasmodium falciparum* strains, *Antimicrobiol Agents Chemother*, 43: 2205-2208.
- Kyabayinze D., Cattamanchi A., Kamya M.R., Rosenthal P.J., Dorsey G., 2003. Validation of a simplified method for using molecular markers to predict sulfadoxine-pyrimethamine treatment failure in African children with *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 69: 247-252.
- Laufer M.K., Djimdé A.A., Plowe C.V., 2007. Monitoring and deterring drug-resistant malaria in the era of combination therapy, *Am J Trop Med Hyg*, 77: 160-169.
- Mayor A., Serra-Casas E., Sanz S., Apon-te J.J., Macete E., Mandomando I., Puyol L., Berzosa P., Dobaño C., Aide P., Sacarlal J., Benito A., Alonso P., Menéndez C., 2008. Molecular markers of resistance to sulfadoxine-pyrimethamine during intermittent preventive treatment for malaria in Mozambican infants. *J Infect Dis*, 197: 1737-1742.
- Mbugi E.V., Mutayoba BM, Malisa A.L., Balthazary S.T., Nyambo T.B., Mshinda H., 2006. Drug resistance to sulphadoxine-pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria in Mlimba, Tanzania. *Malar J.*, 5: 94.
- Mockenhaupt F.P., Ehrhardt S., Eggelte A., Agana-Nsiire P., Stollberg K., Mathieu A., Markert M., Otchwemah R.N., Bienzle U., 2005. Chloroquine treatment failure in northern Ghana: roles of pfcrt T76 and pfmdr1 Y86. *Ann Trop Med Parasitol*, 99: 723-732.
- Mugittu K., Ndejemi M., Malisa A., Lemnge M. Premji Z. Mwita A. Nkya W., Kataraihya J, Abdulla S, Beck HP, Mshinda H., 2004. Therapeutic efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine and prevalence of resistance markers in Tanzania prior to revision of malaria treatment policy: *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase mutations in monitoring in vivo resistance, *Am J Trop Med Hyg*, 71: 696-702.
- Ndouna M., Tahar R., Basco L.K., Casimiro P.N., Malonga D.A., Ntoumi F., 2007. Therapeutic efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine and the prevalence of molecular markers of resistance in under 5-year olds in Brazzaville, Congo. *Trop Med Int Health*, 12: 1164-71.
- Ochong E.O., Broek I.V.F., 2003. Van den, Kees Keus, Nzila A: Association between chloroquine and amodiaquine resistance and allelic variation in the *Plasmodium falciparum* multiple drug resistance 1 gene and the chloroquine resistance transporter gene in isolates from the upper Nile in southern Sudan, *Am J Trop Med Hyg*, 69: 184-187.
- Omar S.A., Adagu I.S., Warhurst D.C., 2001. Can pre-treatment screening for dhps and dhfr point mutations in *Plasmodium falciparum* infections be used to predict sulfadoxine-pyrimethamine treatment failure? *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 95: 315-319.
- Phompida S., Phetsouvanh R., White N.J., Anderson T.J., Newton P.N., 2007: Combined molecular and clinical assessment of *Plasmodium falciparum* antimalarial drug resistance in the Lao People's Democratic Republic (Laos), *Am. J. Trop Med Hyg*, 77: 36-43.
- Picot S., Olliaro P., de Monbrison F., Bienvenu A.L., Price RN, Ringwald P.A., 2009. Systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in *falciparum* malaria, *Malar J.*, May 4;8: 89,
- Pillai D.R., Labbé A.-C., Vanisaveth V., Hongvangthong B., Pomphida S., Inkathone S., Zhong K., Kain K.C., 2001. *Plasmodium falciparum* malaria in Laos: Chloroquine treatment outcome and predictive value of molecular markers. *J Infect Dis*, 183: 789-795.

- Plowe C.V., Cortese J.F., Djimde A., Nwanyanwu O.C., Watkins WM, Winstanley P.A., Estrada-Franco J.G., Mollinedo R.E., Avila J.C., Cespedes JL, Carter D, Doumbo OK, 1997. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance, *J Infect Dis*, 176: 1590-1596.
- Price R.N., Cassar C., Brockman A., Duraisingh M., van Vugt M, White NJ, Nosten F., Krishna S., 1999: The pfmdr1 gene is associated with a multidrug-resistant phenotype in *Plasmodium falciparum* from the western border of Thailand, *Antimicrob Agents Chemother*, 43: 2943-2949.
- Przyborski J.M., Bartels K., Lanzer M., Andrews K.T., 2003. The histone H4 gene of *Plasmodium falciparum* is developmentally transcribed in asexual parasites. *Parasitol Res*. 90: 387–389.
- Rogers W. O., Sem R., Tero T., Chim P, Lim P, Muth S., Socheat D., Ariey F., 2009. Wongsrichanalai C. Failure of artesunate-mefloquine combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in southern Cambodia. *Malar J.*; 8: 10.
- Sendagire H., Kyabayinze D., Swedberg G., Kironde F., 2005. *Plasmodium falciparum* : higher incidence of molecular resistance markers for sulfadoxine than for pyrimethamine in Kasangati, Uganda, *Trop Med Int Health*, 10: 537-543.
- Sibley CH, Barnes KI, Watkins WM, Plowe CV, 2008. A network to monitor antimalarial drug resistance: a plan for moving forward. *Trends Parasitol* 24: 43-48.
- Tahar R., Basco L.K., 2007. Molecular epidemiology of malaria in Cameroon, XXVII, Clinical and parasitological response to sulfadoxine-pyrimethamine treatment and *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase alleles in Cameroonian children, *Acta Trop*, 103: 81-89.
- Tinto H., Guekoun L., Zongo I., Guiguemdé R.T., D'Alessandro U., Ouedraogo J.B., 2006. Chloroquine-resistance molecular markers (Pfprt T76 and Pfmdr-1 Y86) and amodiaquine resistance in Burkina Faso, *Trop Med Int Health* 2008, 13:238-40, *Infect Genet Evol*, 6:309-314.
- Tinto H., Ouedraogo J.B., Zongo I., van Overmeir C., van Marck E., Guiguemde T.R., D'Alessandro U., 2007. Sulfadoxine-pyrimethamine efficacy and selection of *Plasmodium falciparum* DHFR mutations in Burkina Faso before its introduction as intermittent preventive treatment for pregnant women, *Am J Trop Med Hyg*, 76: 608-13.
- Uhlemann A.C., Yuthavong Y., Fidock D.A., 2003. Mechanisms of antimalarial drug action and resistance, in *Molecular Approaches to Malaria* Edited by: Sherman IW, Washington, 2005. ASM Press:429-461, Plowe CV: Monitoring antimalarial drug resistance: making the most of the tools at hand, *J Exp Biol*, 206: 3745-3752.
- Ursing J., Kofoed P.E., Rodrigues A., Rombo L., Gil J.P., 2007. *Plasmodium falciparum* genotypes associated with chloroquine and amodiaquine resistance in Guinea-Bissau, *Am J Trop Med Hyg*, 76: 844-848.
- Woodrow C.J., Krishna S., 2006. Antimalarial drugs: recent advances in molecular determinants of resistance and their clinical significance, *Cell Mol Life Sci* 63: 1586-1596.
- World Health Organization, 2007. Methods and techniques for clinical trials on anti Malarial drug efficacy: genotyping to identify parasite populations. Geneva.

Caracterização da malária placentária por *Plasmodium falciparum* em Luanda (Angola)

Characterization of placental malaria by *Plasmodium falciparum* infection in Luanda (Angola)

Paulo A. Campos¹, Bianor Valente², Virgílio E. do Rosário², Luís Varandas², Henrique Silveira²

¹ Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina da Universidade Agostinho Neto, Av. Hoji Ya Henda, CP 116, Luanda - Angola.

² Centro de Malária e Doenças Tropicais, UEL Malária, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Rua da Junqueira, 96, 1349-008 Lisboa, Portugal.

Resumo

O estudo tem por objectivo determinar a prevalência e os possíveis factores de risco para a malária placentária. Estudo de caso controlo de 567 grávidas, em trabalho de parto nas Maternidades Lucrécia Paím e Hospital Geral Especializado Augusto Ngangula, de Abril 2006 a Abril 2007. A malária foi diagnosticada por microscopia óptica e PCR, usando sangue periférico, sangue do cordão umbilical e sangue de 4 sub-amostras por placenta impregnado em papel de filtro. Das 567 mulheres estudadas, a média de idade foi 24 anos (13 a 42). A paridade variou de 1 a 10 e as parturientes foram divididas em 194 (34,2%) primigestas e 373 (65,8%) multigestas. Entre as mulheres com história de malária durante a gravidez, o maior número de casos (48,1%) ocorreu no segundo trimestre. As primigestas eram significativamente mais jovens do que as multigestas ($p < 0,001$). Do total de casos 115 (20%) tiveram *Plasmodium falciparum* no momento da pesquisa e 14% tinham parasitas detectados em todos os tipos de amostras, sendo 47% apenas na placenta, 9% apenas no sangue periférico e 4% apenas no cordão umbilical. A infecção por *P. falciparum* foi significativamente mais comum em adolescentes (30,4%) do que em jovens (16,4%) e adultas (18,8%). As adolescentes também tiveram um risco aumentado de contrair malária placentária e periférica quando comparadas com mulheres adultas. Em relação à paridade, 24% das primigestas e 18,5% das multigestas tinham malária durante o trabalho de parto, considerando pelo menos uma amostra de sangue positiva para *P. falciparum*. A prevalência de *P. falciparum* na placenta é maior do que no sangue periférico. O local de habitação e a história de malária durante a gravidez foram factores de risco para a malária materna. Nas mulheres ≤ 18 anos e primigestas a quantidade de infecções placentárias por *P. falciparum* foram significativamente maiores do que nos outros grupos. A presença de parasitas no sangue do cordão sugere a malária congénita. Os dados sugerem que a malária durante a gravidez em Luanda tem características particulares.

Palavras-chave: malária, gravidez, África, prevalência, transmissão estável.

Autor Correspondente: paulocampos@snet.co.ao

Abstract

The study aimed at determining the prevalence and the possible risk factors for placental malaria. MWe conducted a case control study of 567 pregnant women, at delivery in Lucrécia Paím and Augusto Ngangula Maternity Hospitals, from April 2006 to April 2007. Malaria was diagnosed by light microscopy and PCR assay. Maternal peripheral blood was collected by finger prick or venipuncture and after delivery cord blood and four sub-samples per placenta were collected onto filter paper. The mean age was 24 years (range 13-42). Parity ranged from 1 to 10, and participants were divided into 194 (34,2%) primigravidae and 373 (65,8%) multigravidae. Among women with a history of malaria during pregnancy, 48.1% occurred at the second trimester. Primigravidae were significantly younger than multigravidae ($p<0,001$). In a total of 567 cases 115 (20%) had *Plasmodium falciparum*, 14% had parasites detected in all sample types, 47% only in placenta, 9% only in peripheral blood and 4% only in umbilical cord. Infection was significantly more common in teenagers (30.4%) than in young women (16,4%) and older women (18,8%). Teenagers were at an increased risk of placental and peripheral *P. falciparum* infection when compared with adult women. Regarding parity, 24% of the primigravidae and 18,5% of the multigravidae were infected at delivery considering at least one positive blood sample. The prevalence of placental malaria infection is higher than peripheral blood infection. Residence and history of malaria during pregnancy were risk factors for maternal malaria. Women younger than 18 and primigravidae showed significantly higher placental infections by *P. falciparum* than other groups. The presence of parasites in the cord blood suggests congenital malaria. All this findings suggest that in Luanda province malaria during pregnancy has particular characteristics.

Keywords: malaria, pregnancy, Africa, prevalence, stable malaria transmission.

Introdução

Após várias décadas de investigação sobre a problemática da malária na gravidez no mundo e na África subsahariana, o conhecimento sobre os seus efeitos na mulher grávida angolana ainda é extremamente diminuto. A malária, devida a *Plasmodium falciparum* durante a gravidez, é um sério problema de saúde pública na África Subsahariana, não obstante o compromisso político expresso de combater a doença no continente (WHO/AFRO 2004).

É, por isso, uma doença que está directamente relacionada com a pobreza e o subdesenvolvimento. Na África Subsahariana, mais de 50 milhões de mu-

lheres, que vivem nas áreas endémicas de malária, ficam grávidas, todos os anos (WHO, 2004; Menendez 1995; ter Kuile et al., 2003), tornando a malária na infecção parasitária mais comum e recorrente que directamente afecta a placenta.

Muitos dos efeitos deletérios da malária na gravidez são devidos à permanência de parasitas na placenta (Brabrin et al., 2004). Contudo, os parasitas a serem sequestrados neste órgão, os esfregaços de sangue periférico muitas vezes não detectam a existência de infecção. A malária tem resultados desfavoráveis durante a gravidez, quer para a mãe quer para a criança (Kayentao et al. 2005; Adegnika et al. 2006; Vallely et al. 2007; Enato et al., 2009).

Nas mulheres grávidas, são comuns os abortos, nados mortos, partos pré-termo e mortes maternas (Feresu *et al.*, 2004; Shulman 1999; Schellenberger *et al.*, 2003; Marchant *et al.*, 2004; Enato *et al.*, 2009). Pensa-se que a hemorragia pós-parto, que é a maior causa de morte materna, nas áreas de transmissão estável, possa ser devida à malária placentária (Uddenfeldt *et al.*, 2007).

Para além da anemia materna, causada pela malária (Shulman e Dorman, 2003) é comum o baixo peso à nascença em recém-nascidos de mulheres que tiveram malária na gravidez e estima-se que 5,68% das mortes perinatais nas áreas de baixos recursos tenham sido causadas por este mecanismo (Guyatt e Snow, 2004). Muitas e provavelmente a maior parte, destas mortes materna e perinatal, são preveníveis (Hinderaker *et al.* 2003).

A prevalência da infecção e a densidade parasitária, atingem o pico na primeira metade da gravidez e depois decrescem progressivamente até ao parto (Brabin, 1983). Estão identificados factores que influenciam a prevalência da malária nas mulheres grávidas, nomeadamente a idade materna, a paridade, uso de profilaxia, nutrição, a genética do hospedeiro, o nível de imunidade anti-parasitária, bem como a genética do parasita (Tako *et al.*, 2005).

Estima-se que todos os anos 75.000-200.000 mortes infantis e por volta de 10.000 mortes maternas estejam associadas com a malária na gravidez e que isso contribuiu para aproximadamente 2-15% da anemia materna; 8-14% de crianças de baixo peso à nascença (um contributo importante de mortalidade infantil) e 3-8% de todas as mortes infantis (Steketee *et al.*, 2001; Desai *et al.*, 2007).

Embora existam vários estudos nos países africanos com alta transmissão de

malária (McGregor, 1984; Brabin, 1991; Menendez, 1995; Sartelet *et al.*, 1997; Oeuvray *et al.* 2000; Rogerson *et al.* 2000; Lander *et al.* 2002; Dafallah *et al.*, 2003; Newman *et al.*, 2003; Dicko *et al.*, 2003; Brabin *et al.*, 2005; Sarr *et al.*, 2006), todavia em Angola, onde a transmissão do *P. falciparum* é considerada alta, são poucos os dados publicados.

Por outro lado, o impacto da malária placentária nas zonas urbanas africanas é pouco documentado (Sarr *et al.* 2006). O presente estudo foi realizado para avaliar a prevalência do *P. falciparum* e os possíveis factores de risco associados em mulheres em trabalho de parto em Luanda.

Material e métodos

Colheita de dados

Estudo de caso controlo de 567 grávidas, em trabalho de parto nas Maternidades Lucrecia Paím e Hospital Geral Especializado Augusto Ngangula, desde Abril 2006 a Abril 2007.

A malária foi diagnosticada por microscopia óptica e PCR, usando sangue periférico, sangue do cordão e impressão de 4 sub-amostras por placenta em papel de filtro. As mulheres grávidas em trabalho de parto nas Maternidades Lucrecia Paim e Hospital Geral Especializado Augusto Ngangula em Luanda foram convidadas a fazer parte do estudo.

Foram excluídas as parturientes, que tinham alguma patologia associada, nomeadamente as portadoras de VIH. Foi feito em seguida um questionário sócio demográfico sobre a idade, paridade, tempo de gestação e morada.

O tempo de gestação foi calculado a partir da data da última menstruação

e por ecografia nos casos incertos. A idade gestacional foi estratificada em trimestres, sendo definido como primeiro (<14 semanas), segundo (14-27 semanas) e terceiro (>27 semanas). O exame físico obstétrico ajudou a completar os dados (tensão arterial, palidez conjuntival, nível do fundo do útero e frequência cardíaca fetal).

O sangue periférico materno foi colhido por punção do dedo indicador e, depois do parto, foram obtidas 4 sub-amostras da placenta e sangue do cordão umbilical. As amostras foram impregnadas em papel de filtro Biohazard Whatman® 903 REF 10531018.

Deteção da Malária

Realizou-se um esfregaço e gota espessa do sangue periférico que foram corados com Giemsa.

O diagnóstico da malária foi executado pelos trabalhadores de saúde locais, usando o protocolo descrito pela OMS (WHO,1991). A extracção do DNA do parasita a partir das amostras de sangue e a identificação do parasita por PCR foram executadas de acordo com o método de fenol/clorofórmio descrito por Snounou *et al.* 1996.

Para a identificação utilizou-se a técnica de Nested PCR (PCR em ninho), que consiste na primeira reacção para identificar o género *Plasmodium*, seguida de 4 reacções de PCR que identificam cada uma das espécies.

Aspectos éticos

Os Comitês de Ética do Ministério da Saúde, Faculdade de Medicina da Universidade Agostinho Neto e as Direcções das Maternidades Lucrécia Paim e Hospital Geral Especializado Augusto Ngangula anuíram para a elaboração da pesquisa e só foram incluídas as parturientes, que deram o seu consentimento informado.

Análise Estatística dos dados

Os dados foram processados usando o Epi Info, versão 3.2.2 para o Windows. O cálculo do tamanho da amostra requerida para um intervalo de confiança foi de 95%, aceitando-se um erro de 5%. Assumiu-se uma prevalência estimada de 50%, tendo-se estabelecido que 567 mulheres constituíam a uma sub-amostra representativa da população estudada.

Para a determinação da prevalência da malária durante a gravidez em mulheres em trabalho de parto, considerou-se positivo quando se encontrava pelo menos uma amostra de sangue positiva (quando o sangue periférico ou do cordão umbilical eram positivos ou quando pelo menos um dos 4 quadrantes da placenta era positivo).

As comparações entre médias e percentagens foram feitas pelos testes t de Student e o teste exacto de Fisher. A malária foi considerada a variável dependente e como variáveis independentes a idade, paridade, tempo de gestação, residência e escolaridade.

As variáveis foram categorizadas e usadas como a seguir: idade <18 anos, 18-24 anos e >24 anos); paridade: primigestas e multigestas (≥ 2 partos); tempo gestacional: primeiro trimestre (<14 semanas), segundo trimestre (14–28 semanas) e terceiro trimestre (>28 semanas).

Resultados e discussão

Malária e gravidez

De Abril 2006 a Abril 2007, nas Maternidades Lucrécia Paim e Hospital Geral Especializado Augusto Ngangula, 567 mulheres em trabalho de parto e que deram o seu consentimento informado foram incluídas neste estudo. As características das pacientes estão sumariadas na tabela 1. A média de idade foi

de 24 anos (13-42), com 50% de mulheres com mais do que 24 anos.

Trabalhos realizados nos países da África Subsaariana, tal como na República Democrática do Congo apontam médias etárias semelhantes (Antelman *et al.* 2000). A paridade variou de 1 a 10, e as participantes foram divididas em 194 (34,2%) primigestas (13-30 anos) e em 373 (65,8%) multigestas (16-42 anos).

Dentre as grávidas, 81,5% tinham rea-

lizado pelo menos 3 consultas pré-natal, 33,9% tiveram malária durante a gravidez e 77,1% tomaram drogas anti-maláricas. Entre as mulheres com a história de malária durante a gravidez, 24,3%, 48,1% e 27,6% tiveram a malária durante o primeiro, o segundo e terceiro trimestres, respectivamente. As primigestas eram significativamente mais jovens do que as multigestas ($p < 0,001$) mas todos os outros factores foram distribuídos similarmente entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Características das mulheres grávidas incluídas neste estudo

Características	Total N = 567	Primigestas N = 194	Multigestas N = 373	P ^a
Média de idade em anos (SD) ^b	24,29(6,3)	19,4(3,7)	26,9(5,8)	<0,001
Educação				
Sem Educação (%)	58(10,3)	25(13,1)	33(8,9)	0,286
Básica (%)	367(65,0)	119(62,3)	247(66,4)	
Secundária e mais (%)	140(24,7)	47(24,6)	92(24,7)	
Residência				0,757
Urbano (%)	143(25,3)	47(24,6)	96(25,8)	
Sub ou Peri-urbano (%)	422(74,7)	144(75,4)	276(74,2)	
Número médio de consultas pré-natal (SD)	4.5(1,9)	4.5(2,1)	4.4(1,9)	0,106
Tomou drogas Antimaláricas durante a gravidez (%)	437(77,1)	148(77,1)	288(77,2)	0,973
Drogas Antimaláricas				0,850
Só SP (%)	188(33,2)	65(33,9)	123(33,0)	
Só Cloroquina (%)	122(21,5)	36(18,8)	85(22,8)	
Outras (%)	44(7,8)	18(9,4)	26(7,0)	
Combinação com SP (%)	65(11,5)	23(12,0)	42(11,3)	
Outras combinações (%)	18(3,2)	6(3,1)	12(3,2)	
Não (%)	130(22,9)	44(22,9)	85(22,8)	
Malária durante a gravidez (%)	192(33,9)	68(35,4)	124(33,3)	0,621
a valor de p b desvio padrão				

Deteccção e prevalência das infecções por P. falciparum

A prevalência da malária por *P. falciparum*, durante o parto variou por meses, com a mais alta prevalência placentária em Abril 2007, o que corresponde

ao período de maior pluviosidade em Luanda (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Luanda>, 2009).

Considerando, pelo menos uma amostra de sangue positiva (periférica, placentária ou do cordão), 20,3% (115/567) de todas as grávidas tinham

P. falciparum na altura do trabalho de parto detectado por método de PCR (Figura 1). *P. falciparum* foi detectado no sangue periférico, na placenta e no cordão umbilical de 49, 99 e 29 grávidas respectivamente.

Independentemente da paridade, a malária foi claramente mais prevalente na

placenta do que no sangue periférico ($p < 0,001$). Foram encontradas outras espécies de *Plasmodium* em 8 mulheres. Quatro foram positivas para *Plasmodium vivax* (2 somente na placenta, uma só no sangue periférico e uma na periferia da placenta e sangue), uma foi positiva para *Plasmodium ovale* e três para *Plasmodium malariae*.

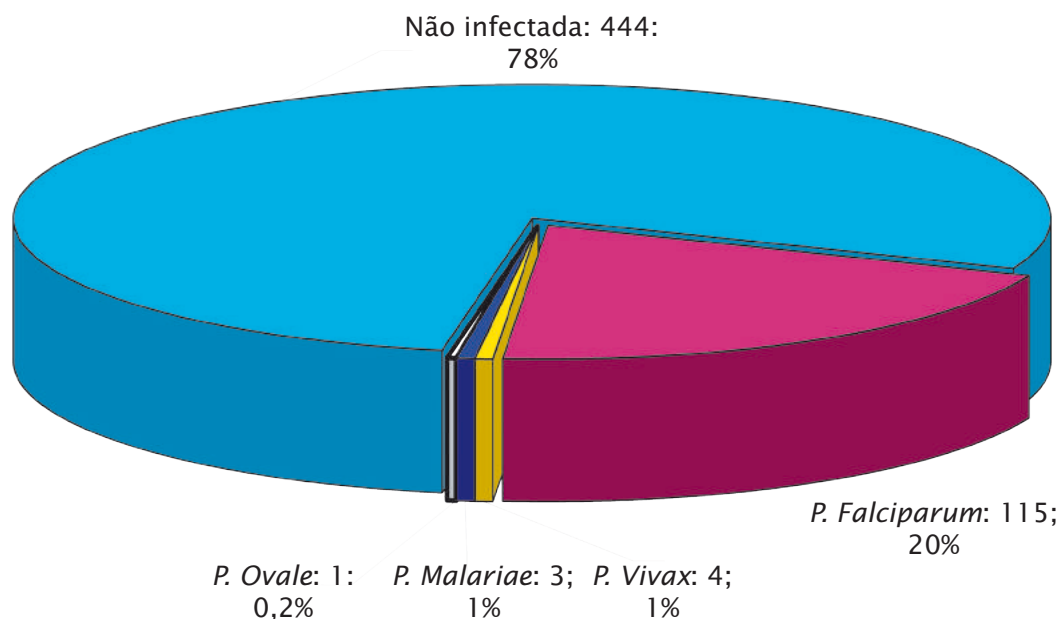


Figura 1. Prevalência da infecção por *Plasmodium* spp.

De todas as grávidas com malária, 14% tinham parasitas em todos os tipos de amostras, 47% só na placenta, 9% só no sangue periférico, 4% só no cordão

umbilical, 19% no sangue periférico e placenta, 6% no cordão umbilical e placenta e 1% no sangue periférico e cordão umbilical (Figura 2).

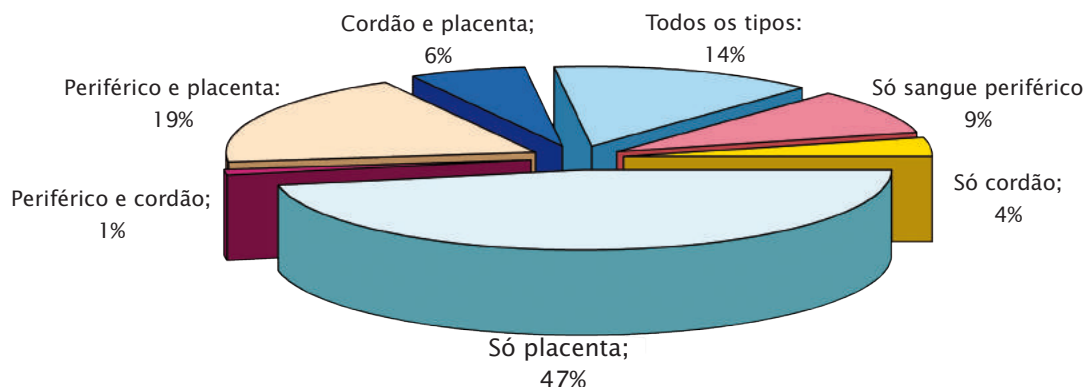


Figura 2. Distribuição da infecção por *Plasmodium falciparum* em função do tipo de amostra

O uso do método de PCR para a detecção de malária, incluindo a placentária, nas amostras de sangue periférico atingiu uma sensibilidade de 38,4% (95% IC, 29,4-42,2); especificidade de 97,7%, (95% IC 95,8-98,7), tendo como referência a malária placentária PCR-positiva (baseada nas quatro sub-amostras por placenta).

Contudo, quando seleccionado ao acaso, a sensibilidade de uma das sub-

-amostras da placenta/mulher foi de 58,2% (95% IC 45,1-70,3); especificidade de 96,7% (95% IC 94,8-97,9). Em contrapartida, a sensibilidade da microscopia óptica do sangue periférico para detectar a infecção por *Plasmodium* nos diferentes compartimentos (sangue periférico, placenta e cordão) foi de 6,1% (95% IC 2,1-16,5), especificidade de 96,5% (95% IC 94,6-97,8), tomando como referência os resultados do PCR do sangue periférico (Tabela 2).

Tabela 2. Sensibilidade e especificidade do diagnóstico usando sangue periférico para detectar infecção por *Plasmodium falciparum*.

Teste de PCR e resultado	N, %	Sensibilidade e especificidade dos testes de sangue periférico								
		Microscopia			PCR					
		Nº de Amostras Positivas	Sensibilidade (%[95% CI])	Especificidade (%[95% CI])	Nº de Amostras positivas	Sensibilidade (%[95% CI])	Especificidade (%[95% CI])			
Cordão umbilical										
Negativo	538 94,9									
Positivo	29 5,1									
Sangue periférico										
Negativo	518 91,4							18	6,1 (2,1-16,5)	96,5 (94,5-97,8)
Positivo	49 8,6							3		
Placenta ^a										
Negativo	468 82,5	17	4,1 (1,6-10,0)	96,3 (94,2-97,7)	11	38,4 (29,4-48,2)	97,7 (95,8-98,7)			
Positivo	99 17,5	4			38					
Placenta ^b										
Negativo	512 90,3	17			17					
Positivo	55 9,7	4	7,3 (2,9-17,3)	96,7 (94,7-97,9)	32	58,2 (45,1-70,3)	96,7 (94,8-97,9)			

a — baseado nas 4 sub-amostras da placenta

b — baseado na selecção aleatória de uma das 4 sub-amostras da placenta por mulheres como referência para o diagnóstico da malária

a — baseado nas 4 sub-amostras da placenta

b — baseado na selecção aleatória de uma das 4 sub-amostras da placenta por mulheres como referência para o diagnóstico da malária

Factores de Risco para a malária durante a gravidez

A prevalência da malária materna (definida como a presença de *P. falciparum* por PCR em pelo menos uma das amostras de sangue colectadas – periférico, 4 quadrantes da placenta e cordão)

entre mulheres adolescentes, jovens e adultas foi comparada.

A malária materna foi significativamente mais comum em adolescentes (30,4%) do que em jovens (16,4%) e adultas (18,8%). As adolescentes tiveram um risco aumentado de malária

placentária (presença de *P. falciparum* por PCR em pelo menos um quadrante da placenta) e periférica (presença de *P. falciparum* por PCR no sangue periférico) quando comparadas com mulheres adultas.

Em relação à paridade, 24% das primigestas e 18,5% das multigestas tiveram malária durante o trabalho de parto, considerando pelo menos uma amostra de sangue positiva. A mais alta prevalência de malária em termos de placenta ou de sangue periférico também ocorreu em primigestas. Contudo, essas diferenças entre grupos de paridade não foram significativas.

A história de malária durante a gravidez estava significativamente correlacionada com a malária materna, a malária do sangue periférico e a malária placentária durante o trabalho de parto. Além disso, a malária materna e placentária foram significativamente mais comuns

nas mulheres que vivem nas áreas sub ou peri-urbanas.

Este trabalho também permitiu observar que a presença de *P. falciparum* no sangue periférico estava associada com o baixo nível de escolaridade das grávidas. Uma análise estratificada com vista a explorar melhor a relação entre idade e paridade foi efectuada. Entre as primigestas, as que tinham a idade <18 anos estavam mais propensas a ter malária placentária, considerando-se um factor de risco importante de malária placentária ($p < 0,02$).

Todavia, tal relação não foi observada em multigestas ($p > 0,36$). (Tabela 3 e 4). Outros estudos efectuados nos Camarões também indicam que a idade é um factor de risco para a malária placentária, estando as mulheres mais jovens e primigestas mais propensas de ter malária placentária (Tako *et al.*, 2005).

Tabela 3. OR ajustado entre variáveis de risco potencial e os diferentes tipos de malária

	Malária materna			Sangue Periférico			Placenta		
	%	OR (95%CI)	Ajustado OR ^a (95%CI)	%	OR (95%CI)	Ajustado OR ^a (95%CI)	%	OR (95%CI)	Ajustado OR ^a (95%CI)
Idade anos									
≤18	30,4	1,9 (1,1-3,2)	1,9 (0,9-3,7)	14,8	2,7 (1,3-5,5)	2,1 (0,8-5,7)	27,0	1,8 (1,1-3,1)	2,2 (1,1-4,5)
19-24	16,4	0,9 (0,5-1,4)	0,8 (0,5-1,4)	8,2	1,4 (0,7-2,8)	1,3 (0,6-2,7)	13,0	0,7 (0,4-1,3)	0,8 (0,5-1,4)
≥25	18,8	Ref.	Ref.	6,1	Ref.	Ref.	16,7	Ref.	Ref.
Paridade									
Primigestas (1)	24,0	1,4 (0,9-2,1)	0,9 (0,5-1,6)	11,5	1,7 (0,9-3,0)	0,9 (0,4-1,8)	19,8	0,8 (0,5-1,2)	1,1 (0,6-2,1)
Multigestas (>1)	18,5	Ref.	Ref.	7,2	Ref.	Ref.	16,4	Ref.	Ref.
Malária na gravidez									
Não	18,2	Ref.	Ref.	7,0	Ref.	Ref.	15,0	Ref.	Ref.
Sim	24,5	1,5 (1,0-2,2)	1,6 (1,0-2,5)	12,0	1,8 (1,0-3,3)	2,0 (1,0-3,9)	22,4	1,6 (1,1-2,6)	1,7 (1,1-2,8)

Continuação

	Malária materna			Sangue Periférico			Placenta		
	%	OR (95%CI)	Ajustado OR ^a (95%CI)	%	OR (95%CI)	Ajustado OR ^a (95%CI)	%	OR (95%CI)	Ajustado OR ^a (95%CI)
Residência									
Urbana	14,0	Ref.	Ref.	4,9	Ref.	Ref.	12,6	Ref.	Ref.
Sub e peri- -urbana	22,5	1,8 (1,1-3,0)	1,8 (1,1-3,1)	10,0	2,2 (0,9-4,9)	2,1 (0,9-4,7)	19,2	1,7 (1,0-2,9)	1,7 (1,0-3,0)
Educação									
Sem Educação	17,2	1,0 (0,5-2,3)	0,7 (0,3-1,8)	8,6	2,5 (0,7-9,2)	1,8 (0,5-6,8)	15,5	0,9 (0,4-2,2)	0,7 (0,3-1,6)
Básica	20,8	1,4 (0,8-2,3)	1,2 (0,7-2,0)	8,8	3,2 (1,2-8,3)	2,7 (1,0-7,3)	17,8	1,1 (0,7-1,9)	0,9 (0,5-2,1)
Secundária e mais	17,6	Ref.		5,9	Ref.	Ref.	17,6	Ref.	Ref.
OR= odds ratio; 95% CI= intervalo de confiança; a Estimado pela regressão logística multivariado									

Tabela 4. Relação da prevalência de malária placentária entre a paridade e idade

Malária	Primigestas							Multigestas						
	≤18		19-24		≥25		p	≤18		19-24		≥25		p
	N	% ^a	N	%	N	%		N	%	N	%	N	%	
Placenta	26	27,7	9	12,2	3	12,5	0,02	5	25,0	18	13,5	38	17,3	0,36
Sangue periférico	13	13,8	9	12,2	0	0	0,16	4	20,0	8	6,0	15	6,8	0,07
Cordão umbilical	8	8,5	6	8,1	1	4,2	0,77	1	5,0	3	2,3	10	4,5	0,52
a — %mulheres com malária positiva														

Observou-se, que na província de Luanda, uma em cada cinco mulheres, em trabalho de parto tinham malária por *P. falciparum*. A prevalência da infecção placentária é maior do que no sangue periférico e a presença de parasitas no sangue do cordão sugere a malária congênita.

O local de habitação e a história da malária durante a gravidez estavam significativamente associados com a malária materna. As infecções por *P. falciparum* na placenta foram signifi-

cativamente maiores em mulheres ≤ 18 anos e primigestas. Todos os dados recolhidos sugerem que a malária durante a gravidez em Luanda tem características particulares, que se devem ter em conta no redesenho das estratégias para o combate da malária na gravidez.

Agradecimentos

Agradecemos às pacientes anónimas que possibilitaram o estudo, bem co-

mo à equipa das Salas de Parto das Maternidade Lucrécia Paim e Hospital Geral Especializado Augusto Ngangula, à Faculdade de Medicina da UAN, que financiou parcialmente a pesquisa, ao Ministério da Saúde e à Direcção Nacional de Saúde Pública, ao Programa Nacional de Controlo da Malária, particularmente ao Prof. Dr. Filomeno Fortes, pelo suporte bibliográfico.

Referências bibliográficas

- Adegnika A.A., Verweij J.J., Agnandji S.T., Chai S.K., Breitling L.Ph., Ramharther M., 2006. Microscopic and sub-microscopic *Plasmodium falciparum* infection, but not inflammation caused by infection, is associated with low birth weight. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75: 798-803.
- Antelman G., Msamanga G.I., Spiegelman D., 2000. Nutritional factors and infectious disease contribute to anemia among pregnant women with human immunodeficiency virus in Tanzania. *J Nutr.*;130: 1950–1957.
- Brabin B.J., Johnson P.M., 2005. Placental malaria and pre-eclampsia through the looking glass backwards? *J Reproductive Immunol.*;65:1–15.
- Brabin B.J., Romagosa C., Abdelgalil S., Menéndez C., Verhoeff FH, McGready R, Fletcher K.A., Owens S., D'Alessandro U., Nosten F., Fischer P.R., Ordi J., 2004. The sick placenta-the role of malaria. *Placenta*, 25: 359-78.
- Brabin B.J., 1983. An analysis of malaria in pregnancy in Africa. *Bull World Health Organ*, 61:1005-1016.
- Brabin, B.J., 1991. The risks and severity of malaria in pregnant women. Geneva: WHO;
- Dafallah S.E., EL-Agib F.H., Bushra G.O., 2003. Maternal mortality in a teaching hospital in Sudan. *Saudi Med J.*, 24: 369-373.
- Desai M., ter Kuile F.O., Nosten F., McGready R, Asamo K, Brabin B, Newman RD., 2007. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis*; 7: 93-104.
- Dicko A., Mantel C., Aly Thera M., Doumbia S., Diallo M., Diakete M., Sagara I., Doumbo O., 2003. Risk factors for malaria infection and anemia for pregnant women in the Sahel area of Bandiagara, Mali. *Acta Trop*, 89:17-23.
- Enato E.F.O., Mens P.F., Okhamafe A.O., Okpere E.E., Pogson E., Schallig H.D.F.E., 2009. *Plasmodium falciparum* malaria in pregnancy: Prevalence of peripheral parasitaemia, anaemia and malaria care-seeking behaviour among pregnant women attending two antenatal clinics in Edo State, Nigeria. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 29: 301-306.
- Feresu S.A., Harlow S.D., Woelk G.B., 2004. Risk factors for prematurity at Harare Maternity Hospital, Zimbabwe. *Int J Epidemiol*; 33: 1194-1201.
- Guyatt H.L., Snow R.W., 2004. Impact of malaria during pregnancy on low birth weight in sub-Saharan Africa. *Clin Microbiol Rev*;17: 760-769.
- Hinderaker S.G., Olsen B.E., Bergajo P.B. 2003. Avoidable stillbirths and neonatal deaths in rural Tanzania. *BJOG*,110: 616-623.
- Kayentao K., Kodio M., Newman R.D., Maiga H., Doumtabe D., Ongoiba A., 2005. Comparison of intermittent preventive treatment with chemoprophylaxis for the prevention of malaria during pregnancy in Mali. *Journal of Infectious Diseases* 191: 109-116.
- Lander J., Leroy V., Simonon A., Karita E., Bogaerats J., Clercq A.D., Van de Perre P., Dabis F., 2002. HIV infection, malaria, and pregnancy: a prospective cohort study in Kigali, Rwanda. *Am J Trop Med Hyg*, 66:56-60.
- Marchant T., Schellenberg J.A., Nathan

- R., 2004. Anaemia *in* pregnancy and infant mortality *in* Tanzania. *Trop Med Int Health*, 9: 262-266.
- McGregor I.A., 1984. Epidemiology, malaria and pregnancy. *Am J Trop Med Hyg*, 33: 517-525.
- Menendez C., 1995. Malaria during pregnancy: A priority area of malaria research and control. *Parasitol Today*, 11: 178-183.
- Newman R.D., 2003. Hailmariam A, Jimma D, Degefie A, Kebede D, Rietveld AC, Nahlen BL, Barnwell JW, Steketee RW, Parise ME. Burden of malaria during pregnancy *in* areas of stable and unstable transmission *in* Ethiopia during a non epidemic year. *J Infect Dis*, 187: 1765-1772.
- Oeuvray C., Theisen M., Rogier C., Trape J.F., Jepsen S., Druilhe P., 2000. Cytophilic immunoglobulin responses to *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria *in* Dielmo, Senegal. *Infect Immun.*;68: 2617-2620.
- Rogerson S.J., Van den Broek N.R., Chaluluka E., Qongwane C., Mhango C.G., 2000. Molyneux ME. Malaria and anaemia *in* antenatal women *in* Blantyre, Malawi: a twelve- months survey. *Am J Trop Med Hyg*, 62: 335-340.
- Sarr D., Marrama L., Gaye A., Dangou J.M., Niang M., 2006. Mercereau-Puijalon O, Lehesran J.Y., Jambou R. High prevalence of placental malaria and low birth weight *in* Sahelian periurban area. *Am J. Trop Med Hyg.*, 75: 171-177.
- Sartelet H., Milko-Sartelet I., Garraud O., 1997. Picot S. *Plasmodium falciparum* persists *in* the placenta after three days' treatment with quinine. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*; 91: 431.
- Schellenberg D., Amstrong-Schellenberg J.R.M., Mushi A., Savigny D., Mbuya C., Victora C.G., 2003. The silent burden of anaemia *in* Tanzanian children: a community based study. *Bulletin of the World Health Organization* 81: 581-590.
- Shulman C.E., Dorman E.K., 2003. Importance and prevention of malaria *in* pregnancy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 97:30-35.
- Shulman C.E., 1999 Malaria *in* pregnancy: its relevance to safe motherhood programmes. *Ann Trop Med Parasitol.*; 93: 59-66.
- Snounou G., 1996. Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification *in* *Methods in Molecular Biology*, vol. 50: Species diagnostics protocols: PCR and other nucleic acid methods. Clapp J.P. (Ed.), Humana Press Inc., Totowa, NJ: 263-291.
- Steketee R.W., Nahlen B.L., Parise M.E., Menendez C., 2001. The burden of malaria *in* pregnancy *in* malaria-endemic areas. *Am J Trop Med Hyg.*, 64: 28-35.
- Tako E.A., Zhou A., Lohoue J., Leke R., Taylor D.W., Leke R.F., 2005. Risk factors for placental malaria and its effect on pregnancy outcome *in* Yaoundé, Cameroon. *Am J Trop Med Hyg*, 72: 236-242.
- ter Kuile F.O., Terlouw D.J., Phillips-Howard P.A., 2003. Reduction of malaria during pregnancy by permethrin-treated bed nets *in* an area of intense perennial malaria transmission *in* western Kenya. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68, 50-60.
- Uddenfeldt Wort U., Hastings I., Bergström S., Massawe S., Lipingu C., Brabin B.J., 2007. Increased postpartum blood loss *in* pregnancies associated with placental malaria. *Int J Gyn & Obst*, 96:171-175.
- Vallely A, Vallely L, Chagalucha J, Greenwood B, Chandranohan D., 2007. Intermittent preventive treatment for malaria *in* pregnancy *in* Africa: What's new, what's needed? *Malaria Journal*, 6:16.

WHO, 1991. Basic laboratory methods *in* medical parasitology. WHO Geneva, 114 pp.

WHO/AFRO, 2004. A strategic framework for malaria prevention and control during pregnancy *in* the African region. Brazzaville: World Health Organization Regional Office for Africa. AFR/MAL/04.01.

AS FERRAMENTAS DA BIOTECNOLOGIA NO MELHORAMENTO DE PLANTAS: *o exemplo do arroz*

Review

THE TOOLS OF BIOTECHNOLOGY IN PLANT BREEDING: *the example of rice*

M. Margarida Oliveira^{1*}, Nelson Saibo¹, Sónia Negrão¹, Rita Batista², Ana Paula Santos¹, Isabel Abreu³, Tiago Lourenço¹, Duarte Figueiredo¹, Tânia Serra¹, Subhash Chander¹, Cecília Pina¹, Diego Almeida¹, Liliana Ferreira¹, Pedro Barros¹, Inês Pires¹, Mafalda Rodrigues¹.

¹ Instituto de Tecnologia Química e Biológica/Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (ITQB/IBET), Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras, Portugal

² Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa, Portugal

³ Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC), Rua do Campo Alegre 823, 4150-180 Porto, Portugal

Resumo

A biotecnologia vegetal, assente na análise genómica, na cultura in vitro e na engenharia genética, tem fornecido um conjunto de preciosas ferramentas de estudo e melhoramento de plantas. O arroz, uma cultura importante em Portugal, tornou-se uma planta modelo em biotecnologia vegetal, tendo sido a primeira planta cultivada a ter o genoma completamente sequenciado. Neste artigo são referidos trabalhos em curso em arroz, desenvolvidos pela nossa equipa. Uma das principais vertentes de trabalho, a vertente aplicada, incide no melhoramento e desenvolvimento de ferramentas para o melhoramento, do arroz. Após um trabalho inicial de caracterização fenotípica e molecular de parte da colecção de germoplasma nacional, foram seleccionadas diversas variedades para melhoramento, num programa que se iniciou em 2004 e em que a nossa equipa participa activamente. Em paralelo e em escala mais reduzida iniciámos melhoramento assistido por marcadores moleculares dirigido a duas variedades tradicionais. O melhoramento dirigido visou a introgressão de dois genes de resistência ao fungo *Magnaporthe oryzae* (causador da piriculariose) e de um gene de semi-nanismo (*sd1*) para melhorar a arquitectura das plantas. Numa vertente mais de investigação fundamental, tem sido explorada a técnica de EcoTILLING para procurar, em germoplasma muito diversificado, genes envolvidos na tolerância à salinidade. Por outro lado, por Yeast One-Hybrid tem sido possível identificar novos genes reguladores envolvidos na resposta a stress abiótico (frio, salinidade e seca), que estão actualmente em fase de caracterização. Por análise citogenética e transcricional, tem-se também procurado detectar mecanismos de controlo epigenético da expressão génica e da memória do stress aplicado.

Palavras-chave: arroz, biotecnologia, melhoramento, selecção assistida por marcadores, engenharia genética, genómica funcional, citogenética.

* Autor correspondente: Prof. Dr. Margarida Oliveira, E-mail: mmolive@itqb.unl.pt

Abstract

Plant biotechnology, supported by genomic analyses, in vitro culture and genetic engineering, has provided a number of precious tools to study and improve plants. Rice, an important culture in Portugal, has become a model in plant biotechnology, being the first crop to have the fully sequenced genome. In this paper we refer to ongoing work developed by our team. One of the main approaches of our work, the applied one, focuses in breeding and development of breeding tools for rice. After an initial work conducted to characterise, at phenotypic and molecular levels, a part of the Portuguese germplasm collection, a number of varieties was selected for breeding in a national program that started in 2004 and in which our team is actively involved. In parallel and in a more limited scale, we have started a marker-assisted breeding program targeting two Portuguese traditional varieties. This targeted approach aimed to introgress two genes of resistance to *Magnaporthe oryzae* (responsible for blast disease) and a semi-dwarfing gene (*sd1*) to improve plant architecture. In an approach targeting more fundamental research, we are exploring the EcoTILLING technique to search, in a diversified germplasm collection, genes involved in salinity tolerance. In another research line, through Yeast One-Hybrid, it has been possible to identify new regulatory genes involved in the response to abiotic stress (cold, salinity, drought), which are currently under characterisation. Through cytogenetics and transcriptomic analyses, we have also attempted to elucidate mechanisms of epigenetic control of gene expression and of the memory of the stress applied.

Keywords: rice, biotechnology, breeding, marker-assisted selection, genetic engineering, functional genomics, cytogenetics.

O melhoramento de plantas e a biotecnologia

Ao longo dos tempos o Homem tem procurado melhorar as plantas para de algum modo obter mais benefícios, seja directa ou indirectamente. O aumento da produtividade, da qualidade nutricional ou da resistência a doenças e pragas são alguns exemplos dos objectivos de melhoramento.

Há dados de que há cerca de 10.000 anos atrás o Homem já seleccionava trigo, arroz e outros cereais, e de que no tempo dos Romanos (cerca de 100 A.C.) já recorria à enxertia como forma de clonagem. Contudo, demorou muito tempo até se descobrir que as plantas têm reprodução sexuada (só no final do séc. XVII se descobriu), pelo que só a partir dessa data se começaram a efectuar cruzamentos controlados. O

primeiro cruzamento intergenérico que se tornou um caso de sucesso a nível mundial foi efectuado entre trigo e centeio, originando o Triticale (em 1876). Duas décadas depois, começou a produção de milho híbrido nos Estados Unidos.

Foi ao longo do séc. XX que a humanidade assistiu a um forte progresso no desenvolvimento de ferramentas para o melhoramento vegetal, destacando-se a mutagénese (na década de 20) e a cultura de tecidos (década de 60). Nos últimos 30 anos do séc. XX surgiu e aperfeiçoou-se a engenharia genética, com a tecnologia do DNA recombinante (em 1970), a primeira dicotiledónea (tabaco) transformada geneticamente (em 1983), e a primeira aprovação de um produto alimentar (o tomate Flavour Savour, de amadurecimento retardado, em 1994).

Para responder ao crescente aumento populacional, Norman Borlaug (falecido em 2009, com 95 anos de idade) desenvolveu um enorme trabalho de melhoramento de plantas que lhe mereceu o prémio Nobel da Paz, em 1970. Com o seu trabalho, Borlaug conseguiu obter plantas mais pequenas e muito mais produtivas (acumulando a energia da fotossíntese no grão em vez de produzir demasiada palha) que fez chegar, inicialmente, às populações mais necessitadas da Índia. Contudo estas plantas também necessitavam de numerosos fertilizantes e pesticidas, agravando assim os problemas de poluição ambiental.

Vários indicadores apontam para que actualmente 1/5 da população mundial produza 97% do seu alimento a nível local. Por outro lado, uma efectiva segurança alimentar tem obrigatoriamente de assentar na auto-suficiência das populações. Assim, procura-se hoje atender às necessidades agrícolas e de melhoramento vegetal com uma crescente preocupação de sustentabilidade. A agricultura sustentável está intimamente associada ao uso da informação, da agricultura de precisão (ou de conservação) e da biotecnologia (tecnologia aplicada a seres vivos para obtenção de produtos ou processos).

Muitas das ferramentas de melhoramento desenvolvidas desde o início do séc. XX enquadram-se na disciplina da biotecnologia. Pode-se dizer que a biotecnologia assenta em três pilares fundamentais: (1) a cultura de plantas *in vitro* (cultura em sistema artificial e ambiente confinado); (2) a engenharia genética (a manipulação de um ou poucos genes isolados); e (3) a análise genómica (o conhecimento da estrutura e conteúdo da informação genética do indivíduo).

No nosso laboratório temos vindo a aplicar estas ferramentas para melho-

rar o arroz e obter mais conhecimento sobre o funcionamento desta planta.

O arroz como caso de estudo

O arroz é uma cultura tradicional em Portugal, país em que o consumo per capita de arroz é de longe o mais elevado da comunidade europeia (cerca de 18kg/capita/ano enquanto o segundo maior consumidor, Espanha, tem apenas 7 kg/capita/ano).

O arroz não só é o alimento base de 2/3 da população mundial, como também se tornou uma planta modelo em diversos estudos de biologia e biotecnologia. Com um dos genomas mais pequenos, o arroz foi a primeira planta cultivada a ter o seu genoma completamente sequenciado.

Existem mapas genéticos e físicos de elevada densidade, microarrays para todos os genes (cerca de 57.000 transcritos), bibliotecas de mutantes de inserção e protocolos eficazes de engenharia genética. O conhecimento que é possível obter pela exploração destas e outras ferramentas, aliado ao facto de existir um elevado grau de sintonia entre os genomas dos cereais, tornou o arroz numa planta central na investigação em biotecnologia vegetal.

O trabalho em arroz que temos no grupo foi iniciado no ano 2000, em colaboração com Moçambique e com o Instituto Internacional de Investigação em Arroz (International Rice Research Institute, IRRI, em Manila, Filipinas), visando melhorar a qualidade nutricional. O projecto incidiu sobretudo na caracterização da qualidade nutricional de variedades Moçambicanas, ou adequadas a Moçambique, e no enriquecimento em ferro por transferência do gene da ferritina de soja, sob o controlo de um promotor específico do endosperma. A ferritina é uma molécula capaz de acu-

mular até 4.500 átomos de ferro, podendo por isso proporcionar um local de acumulação de ferro no grão.

A anemia férrica afecta 30% da população mundial, sobretudo feminina, e o enriquecimento em ferro do arroz é particularmente importante para zonas onde a deficiência é maior e a alimentação menos variada. O arroz com acumulação de ferro no grão, mesmo após polimento e branqueamento, foi conseguido (Vasconcelos *et al.*, 2003) e facultado para estudos subsequentes de análise da disponibilidade em ferro.

Embora Portugal consuma muito arroz e produza cerca de 60% daquilo que consome (com mais de 6 ton/ha e uma produção de cerca de 164.000 ton anualmente), a realidade é que não há variedades Portuguesas a ser exploradas actualmente.

Tal deve-se à baixa produtividade e elevada sensibilidade às doenças (sobretudo a piriculariose, causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae*) das variedades tradicionais, que contudo têm elevada qualidade organoléptica. Adicionalmente, o arroz em Portugal é afectado pelo frio (que impede a cultura a norte do Mondego), e pela salinidade (que afecta em particular os rios Tejo, Sorraia e Sado), o que nos levou a iniciar estudos para abordar estes problemas.

Melhoramento de arroz assistido por ferramentas da biotecnologia

Um dos projectos que iniciámos em arroz visa o melhoramento convencional de duas variedades seleccionadas ('Al-lorio' e 'Strella') apoiado por ferramentas da biotecnologia (Negrão, 2008). Neste processo de melhoramento diri-

gido, foram utilizados marcadores moleculares para monitorizar a introgressão da resistência ao fungo (genes *Pib* e *Pita*, específicos para as estirpes de *M. grisea* que surgem em Portugal) e redução da altura da palha (gene *sd1*).

É de se salientar que o gene *sd1* é o responsável pela "revolução verde" no arroz devido aos ganhos em produtividade a ele associados. Em paralelo foram controlados os teores prováveis de amilose por análise das variantes alélicas do gene *Waxy* por microsatélites e SNPs (single nucleotide polymorphisms, polimorfismos de um único nucleótido).

Os teores relativos de amilose/amilopectina determinam a característica de, após cozedura, o arroz se apresentar mais solto (razão amilose/amilopectina elevada) ou mais agregado (razão baixa). O gene *Sd1* selvagem codifica para uma oxidase do ácido giberélico (GA20-oxidase), e o gene mutante (*sd1*) tem uma deleção de 383pb que origina uma enzima deficiente, afectando assim o crescimento da planta em altura.

A par da análise com marcadores para genes específicos, foi feita uma análise com marcadores para diferentes regiões dos 12 cromossomas de arroz, para avaliar a introgressão do genoma dador (proveniente das variedades dadoras dos genes de interesse). Numa primeira fase foram testados 165 microsatélites (SSRs – Simple Sequence Repeats), tendo-se seleccionado 45 (mais facilmente amplificáveis e mais polimórficos).

Com esta análise foi possível numa fase adiantada do melhoramento estimar em diversas linhas a percentagem

de genoma oriundo das variedadesadoras (desejavelmente o mais reduzido possível) verificando-se numa BC2F2 (a F2 de um segundo retrocruzamento) ser inferior a 30% (Negrão *et al.*, 2010). Assim, esta análise permitiu seleccionar as linhas que mais se aproximavam das variedades tradicionais (embora tendo adquirido os novos genes), para que a qualidade do arroz fosse o mais possível equivalente à qualidade original das variedades tradicionais.

Naturalmente, depois das análises moleculares, foi necessário proceder a outras avaliações, para estimar parâmetros agronómicos, assim como o grau de resistência à piriculária. A resistência ao fungo foi avaliada em ensaios laboratoriais de infecção controlada com duas estirpes muito virulentas, e as plantas infectadas foram depois transferidas para o campo, para a região de maior incidência da doença (zona do Mondego, Bico da Barca), num ensaio em que foram igualmente transplantadas variedades de grande susceptibilidade ao fungo (para garantir um inóculo de elevada densidade).

Deste estudo de melhoramento (Negrão, 2008, Negrão *et al.*, 2010) verificou-se que foi possível introduzir os genes de semi-nanismo e resistência à piriculária em variedades tradicionais, e com isso melhorar a arquitectura da planta e ganhar a resistência desejada. Igualmente, verificou-se que em termos de conteúdo em amilose e outros parâmetros de qualidade, as linhas de melhoramento apresentaram qualidade semelhante à 'Allorio' e à 'Strella' (Negrão *et al.*, em preparação), apresentando-se contudo a 'Allorio' como melhor progenitor.

Verificou-se ainda ser necessário efec-

tuar mais retro-cruzamentos para aumentar a qualidade do arroz a níveis equiparados aos das variedades tradicionais de que derivam. A integração das ferramentas moleculares para o melhoramento de variedades da sub-espécie japonica não tem sido muito explorada, mas é particularmente importante por exemplo para a região europeia (Negrão *et al.*, 2008)

Ainda na vertente do melhoramento e da caracterização de variedades tradicionais foram efectuados estudos de caracterização agronómica e molecular (Jayamani *et al.*, 2007a,b) para avaliação da diversidade genética existente na colecção mais antiga mantida pela Estação Agronómica Nacional em Oeiras. Foi igualmente avaliada a diversidade de uma colecção de germoplasma Europeu, em termos de tolerância/sensibilidade à salinidade (em terrenos disponibilizados pela Companhia das Lezírias).

Pesquisa de genes de tolerância à salinidade pela técnica de EcoTILLING

Sabendo que muitas plantas têm genes de tolerância à salinidade, embora por vezes não funcionais ou não activados por genes reguladores, iniciou-se um outro estudo de pesquisa de variantes alélicas de genes de resposta a stress salino, eventualmente correlacionáveis com fenótipos de tolerância/sensibilidade aumentada. Para este fim optou-se por utilizar a técnica de EcoTILLING (TILLING -Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) (Comai *et al.*, 2004).

Na técnica de TILLING usa-se uma população quimicamente mutagenizada (por EMS – etil-metanosulfonato) e amplificação por PCR de um gene específi-

co, procurando-se mutantes entre uma vasta população, a fim de encontrar os alelos mais relevantes. No caso da variante EcoTILLING, em vez dos mutantes, recorre-se à análise da diversidade naturalmente existente, sendo para o efeito necessário dispôr de uma população tão diversa quanto possível.

Neste estudo, recorrendo-se à análise *in silico* (pesquisas em bases de dados) procurou-se identificar um conjunto de genes descritos como potencialmente envolvidos nos mecanismos de tolerância ao sal (por exemplo OsHKT8 e SALT). Identificados os genes candidatos, procedeu-se à divisão do gene alvo em diversas regiões parcialmente sobreponíveis, para as quais se desenharam primers específicos.

Nesta técnica, o DNA de cada variedade a analisar é misturado em partes iguais com o DNA de uma variedade de referência (tendo-se usado para o efeito a 'Nipponbare' e a 'IR64') e a mistura é sujeita a PCR para um gene candidato. A técnica de EcoTILLING foi efectuada numa população de 400 variedades que incluía indivíduos das sub-espécies japonesa e indica, tendo em vista encontrar novas variantes alélicas em 5 genes candidatos de tolerância à salinidade.

Após a amplificação por PCR, o DNA é desnaturado e depois rapidamente renaturado, o que leva à formação de duplas cadeias potencialmente híbridas e com nucleótidos não emparelhados. As regiões de desencontro (não emparelhamento das hemi-cadeias), correspondem a SNPs, que são depois reconhecidos por uma enzima de restrição (CEL1) que corta especificamente DNA em cadeia simples, gerando assim fragmentos de diferentes dimensões.

Estes fragmentos podem ser detecta-

dos por electroforese em gel de agarose, embora a técnica mais fina recorra a equipamento especializado de análise de DNA e a primers marcados com corantes/fluorocromos.

A normalização da concentração dos DNAs que se misturam (de referência e de teste), o desenho dos primers e a qualidade da enzima de restrição, foram os factores mais críticos nas etapas de optimização da técnica. Para reduzir os elevados custos inerentes a esta técnica, optou-se não só pela detecção em gel de agarose, mas também pela produção laboratorial da enzima CEL1.

Para o efeito, utilizou-se um protocolo optimizado de purificação da enzima a partir de aipo (celery), tendo-se verificado ser importante que o aipo apresentasse sinais de stress (infecção por fungo) para maximizar o rendimento em enzima.

Após a detecção das variantes alélicas, os haplótipos são sequenciados para determinação exacta da variante, as plantas são testadas para avaliação do grau de tolerância à salinidade e são feitos os respectivos testes de associação. O objectivo final é identificar possíveis marcadores SNPs para usar em selecção assistida por marcadores moleculares e assim contribuir para a obtenção de variedades mais tolerantes à salinidade.

Análise dos mecanismos moleculares de tolerância a stress abiótico

Há numerosos factores ambientais causadores de stress nas plantas, é o caso da poluição química, do frio, da secura, do calor ou da salinidade, de entre ou-

tros. Estes factores por sua vez causam stress secundário que é sentido, percebido e traduzido pela planta.

Neste processo, em que intervêm os-mossensores, mensageiros secundários, MAP cinases, sensores de cálcio, cinases dependentes de ciclinas, etc., é activado o controlo transcricional (por diversos factores de transcrição), levando à expressão de diversos conjuntos de genes. Estes genes a jusante são os responsáveis pela osmoprotecção, movimento de água e iões, desintoxicação e funções protectoras de chaperona.

Estas alterações potenciam o restabelecimento da homeostasia celular e a protecção funcional e estrutural de proteínas e membranas, desejavelmente culminando na tolerância ao stress (Wang *et al.*, 2003).

O que já se conhece dos mecanismos de resposta a stress abiótico permite assinalar diversos intervenientes das complexas redes transcricionais em que numerosos factores (como a fosforilação, ubiquitinação ou a SUMOilação) modulam a actividade de factores de transcrição que induzem ou reprimem genes a jusante, regulando assim várias funções metabólicas (como a fotossíntese) (Catala *et al.*, 2007, Saibo *et al.*, 2009).

Na resposta à deficiência de água ou elevada salinidade conhecem-se duas vias, uma dependente e outra independente de ácido abscísico (ABA), que contudo já se sabe estarem interligadas com a vias de resposta ao frio e inclusivamente de resposta a stress biótico e ferimento (Nakashima e Yamaguchi-Shinozaki, 2006).

Em estudos conduzidos inicialmente

(Lourenço, 2008), verificámos que um gene de cevada, codificando para um factor de transcrição da família dos CBFs (HvCBF4), era capaz de aumentar significativamente a taxa de sobrevivência de plantas de arroz na recuperação pós-secura. Numa fase seguinte fomos à procura de genes de arroz com função reguladora, potencialmente responsáveis por fenótipos de adaptação a stress abiótico (frio, secura, salinidade).

Para tal dirigimos a atenção para genes localizados a montante de genes já conhecidos (de arroz ou outras plantas). A estratégia seguida para este fim consistiu inicialmente num estudo *in silico* para identificar potenciais genes de interesse no genoma de arroz, e na aplicação da técnica de Y1H (Yeast One-hybrid – permite pesquisar interacções entre proteínas e DNA).

Para utilizar o sistema Y1H prepararam-se bibliotecas de expressão de cDNA a partir de mRNA isolado de tecidos sujeitos a stress, e portanto enriquecidas em transcritos potencialmente relevantes. Deste estudo foram já identificados mais de 20 novos genes reguladores, alguns ainda desconhecidos da comunidade científica, que naturalmente têm de ser caracterizados molecular e funcionalmente. Parte do processo de caracterização destes genes passa pela análise do efeito da sua sobre-expressão (constitutiva ou indutível) ou silenciamento, recorrendo a mutantes de inserção e a transgénicos (de arroz ou de uma planta modelo, a *Arabidopsis*).

Estas plantas são então avaliadas a nível fenotípico, fisiológico, transcricional, proteómico, de organização tridimensional da cromatina e, futuramente, também a nível metabolómico.

Na abordagem transgénica usamos a tecnologia GATEWAY que facilita grandemente a clonagem dos genes de interesse, a substituição de promotores ou inserção de tags.

Um dos genes alvo neste estudo foi o gene *OsHOS1*, para o qual se pretendia encontrar reguladores a montante. Assim, isolou-se uma região do respectivo promotor (cerca de 1500pb a montante da região codificante) e desenharam-se primers para amplificar três regiões (parcialmente sobreponíveis) do promotor (cada uma com cerca de 540pb).

Estas regiões foram clonadas num vector integrativo, a montante de um gene de selecção em levedura (Histidina 3), que contudo só é expresso quando o promotor é devidamente activado. A activação ocorre quando há proteínas que interajam com o promotor. Essas proteínas resultam da expressão de genes clonados num outro vector (pACTII) e disponíveis na biblioteca de expressão de cDNA, que está construída por forma a que cada cDNA clonado esteja em fusão com o domínio activador do GAL4 (Ouwkerk e Meijer, 2001).

Assim, uma interacção da proteína da biblioteca com o fragmento clonado do promotor em estudo é revelada pela activação da expressão do Histidina 3, o que permite, por cultura das leveduras em meio desprovido de histidina, identificar facilmente as colónias em que ocorreu interacção. Para os estudos que conduzimos, foram preparadas duas bibliotecas de expressão, uma de resposta ao frio e outra à salinidade. Por exemplo, para um outro gene em estudo, o *OsCBF1*, já foram identificados 8 factores de transcrição (TFs) interagindo com diferentes regiões do promotor. A fusão dos novos possíveis TFs com o gene da GFP (green fluorescent protein) confirmou o seu transporte e

acumulação no núcleo celular.

Por outro lado, estudos semi-quantitativos de expressão génica (realizados por transcrição inversa do mRNA e amplificação em PCR com redução do número de ciclos) efectuados ao nível da raiz e da parte aérea da planta de arroz, revelaram interessantes padrões de expressão em função do frio aplicado (5 ou 10 °C), secura, ou outros stresses, ao longo de um período de 24h. Um dos novos TFs que interage com o promotor de *OsCBF1* é codificado pelo gene *OsSTZ*, o qual é activado pelo frio, salinidade e secura (e também pelo ABA, mas apenas ao nível da parte aérea).

Um outro TF particularmente interessante é o *OsPIF* (Phytochrome Interacting Factor), o qual pertence à família dos basic Helix-Loop-Helix e liga-se ao promotor de *OsCBF1*. *OsPIF* interage com vários fitocromos, mas particularmente com a forma activa do fitocromo B, actuando assim como mediador do sinal luminoso (que se sabe induzir os genes *CBF*). Curiosamente verificou-se que o controlo da expressão de *OsPIF* induzida pelo frio envolve splicing alternativo (que gera diferentes sequências do transcrito), o que não parece suceder na resposta ao ABA, ao sal ou à secura.

O efeito do stress na organização tridimensional da cromatina e na memória epigenética

Na tentativa de compreender o processo de adaptação ao stress abiótico procurámos também avaliar a influência do grau de estruturação e organização da cromatina no núcleo interfásico (abordagem citogenómica). De facto, o núcleo interfásico apresenta uma organização que está longe de ser aleatória.

Neste estudo temos usado métodos de hibridação *in situ* (FISH, fluorescence *in situ* hybridization) associados a microscopia confocal, para detectar variações na organização da cromatina e disposição espacial de genes.

Como as marcas epigenéticas são particularmente evidentes ao nível do DNA ribossomal, direccionámos o estudo numa primeira fase para o 45SrDNA e 5SrDNA, avaliando o efeito da temperatura e da salinidade na sua organização tridimensional.

Nestes estudos usam-se ápices radiculares de plantas jovens de arroz, sujeitas a stress durante a fase de germinação, que se seccionam em fresco num vibrótomo (micrótomo vibratório) e se analisam após coloração geral (com DAPI) ou imunodeteção específica para a região em análise (Santos *et al.*, 2002). Após uma observação geral em microscopia de fluorescência, as amostras são observadas em microscopia confocal.

No núcleo interfásico de amostras controlo, o 45SrDNA surge organizado em dois blocos de heterocromatina perinucleolares, correspondentes à fracção de genes não transcritos. No entanto, por germinação das sementes de arroz em solução salina (150mM NaCl) ou por sujeição a choque de calor (42°C/3h) verificaram-se alterações dramáticas no padrão de organização da cromatina ribossomal.

Por exemplo, o volume dos blocos heterocromáticos reduziu significativamente, sugerindo o aumento da fracção de genes ribossomais em transcrição no nucleolo. Igualmente a disposição espacial de genes no núcleo interfásico foi alterada. No caso do 5SrDNA, a distância entre os dois loci homólogos

foi significativamente aumentada após aplicação de stress salino ou choque de calor.

Já por exemplo os centrómeros (visíveis ao nível dos cromocentros – associações de centrómeros), que em condições controlo apresentam disposição circular (Santos *et al.*, 2006), não revelaram alteração da distribuição em resultado da aplicação destes stresses. Globalmente, estes resultados mostraram que o choque térmico e a salinidade promovem a transição de hetero- para eucromatina tal como ocorre quando o genoma é hipometilado por exposição a um agente desmetilante (a 5-azacitidina, uma droga indutora da remodelação da cromatina).

Em células animais, sabe-se que a relocalização de genes para compartimentos heterocromáticos está associada ao silenciamento de genes (revisto por Lanctôt *et al.*, 2007). No entanto, em plantas este mecanismo não está ainda confirmado. Assim, fomos analisar a distribuição relativa entre os genes 5SrDNA e os centrómeros, tendo verificado que a frequência de colocalização varia com o grau e tipo de stress aplicado, sendo mais elevada após choque de calor ou ensaio de salinidade.

Com os ensaios em curso pretendemos avaliar se existe em arroz uma espécie de “fábrica de transcrição” para genes de resposta a stress (que se sabe estarem distribuídos por vários cromossomas), à semelhança do que já foi descrito em sistemas animais em que os genes de resposta que são activados, são transcritos num determinado domínio nuclear (Fraser e Bickmore, 2007).

Estes estudos complementados com o mapeamento de marcas epigenéticas

da cromatina (modificação de histonas e metilação do DNA) visam elucidar aspectos da plasticidade da cromatina em resposta ao stress e testar a existência de uma memória epigenética transgeracional de stress.

Num outro estudo conduzido com o objectivo de comparar o efeito ao nível da transcrição, de dois métodos de melhoramento, a engenharia genética versus a mutagenese, encontramos também indícios interessantes que apontam para uma regulação epigenética da resposta ao evento de melhoramento (Batista *et al.*, 2008).

Quer a mutagenese, quer a engenharia genética estão associadas a situações de stress para a planta, num caso pela radiação (100 Gy de radiação gama aplicada às sementes), e no outro pela exposição a bactérias patogénicas (*Agrobacterium*) e por todo o processo de cultura *in vitro* (em condições artificiais) e selecção de transformantes, inerente à técnica de transformação mediada por *Agrobacterium*.

Neste estudo, verificámos que a mutagenese causou maior perturbação no transcrito do que a transformação genética, e que as plantas melhoradas revelaram a sobre- ou sub-expressão de genes não alvo, muitos dos quais descritos como genes de resposta a stress.

Os genes alterados foram encontrados em número particularmente elevado em plantas com poucas gerações pós-evento (ainda instáveis), enquanto que naquelas que já haviam passado por várias gerações (mais estáveis), se verificou que o número de genes alterados era muito inferior, havendo assim como que o gradual “esquecimento” do

evento perturbador.

A importância do arroz em Portugal e no mundo, não só do ponto de vista alimentar e socio-económico, mas também por todo o conhecimento acumulado a nível científico, é particularmente relevante e justifica todo o investimento que se tem vindo a fazer para o seu melhoramento e estudo detalhado.

É importante realçar que as aplicações biotecnológicas mais modernas não fazem sentido se não assentarem em trabalhos de fundo de melhoramento convencional e em estudos agronómicos e de gestão do campo (nivelamento do terreno, controlo de infestantes, gestão da água, etc.) que permitam maximizar a produção e rentabilidade da cultura. Estes trabalhos sim, podem potenciar a aplicação da biotecnologia, constituindo os alicerces sobre os quais esta assenta.

Referências bibliográficas

- Batista R., Saibo N., Lourenço T., Oliveira M.M., 2008. Mutagenesis vs. transgenesis: a transcriptomic approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 3640-3645.
- Catala R., Ouyang J., Abreu I.A., Hu Y., Seo H., Zhang X., Chua N.H., 2007. The Arabidopsis E3 SUMO ligase SIZ1 regulates plant growth and drought responses. *Plant Cell*. 19: 2952-2966.
- Comai L., Young K., Till B.J., Reynolds S.H., Greene E.A., Codomo C.A., Enns L.C., Johnson J.E., Burtner C., Odden A.R., Henikoff S., 2004. Efficient discovery of DNA polymorphism in natural populations by EcoTILLING. *The Plant Journal*. 37:778-786.
- Fraser P., Bickmore W., 2007. Nuclear

- organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature*, 447: 413-417.
- Jayamani P., Negrão S., Brites C., Oliveira M.M., 2007b. Potential of Waxy gene microsatellite and single nucleotide polymorphisms to develop japonica varieties with desired amylose levels in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Cereal Science*, 46: 178-186.
- Jayamani P., Negrão S., Martins M., Maças B., Oliveira M.M., 2007a. Genetic relatedness of rice accessions from diverse origins as assessed by microsatellite markers. *Crop Science*, 47: 879-886.
- Lancôt C., Cheutin T., Cremer M., Cavalli G., Cremer T., 2007. Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nature Reviews Genetics*, 8:104-15.
- Lourenço T., 2008. Addressing abiotic stress tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) through a transgenic approach". Tese de Doutoramento, ITQB-UNL. ITQB, Oeiras, Portugal.
- Lourenço T., Saibo N., Batista R., Ricardo C.P., Oliveira M.M., 2010 Inducible and constitutive expression of HvCBF4 in rice leads to differential gene expression and drought tolerance. (submetido).
- Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K., 2006. Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants. *Physiologia Plantarum*, 126: 62-71.
- Negrão S., 2008. "Breeding for high yield and blast resistance of traditional Portuguese rice varieties by Marker-assisted backcrossing". Tese de Doutoramento, ITQB-UNL. ITQB, Oeiras, Portugal.
- Negrão S., Oliveira M.M., Jena KK, Mackill D., 2008. Integration of genomics tools to assist breeding in the japonica subspecies of rice. *Molecular Breeding*, 22: 159-168.
- Negrão S., Jayamani P., Maroco J., Lourenço T., Mackill D., Oliveira M.M., 2010. Bridging sd1 molecular knowledge with recent breeding strategies for the improvement of traditional rice varieties : a japonica case-study. *African Journal of Biotechnology* (em impressão).
- Negrão S., Fitzgerald, M., Jayamani, P., Mackill, D. and Oliveira, M.M. "Evaluation of grain quality in a breeding work by marker-assisted backcrossing in rice" (em preparação).
- Ouwkerk P.B.F., Meijer A.H., 2001. Yeast One hybrid screening for DNA protein interactions. *Current Protocols in Molecular Biology*. eds. Ausubel, F. M. New York: John Wiley & Sons, Inc., pp: 12.12.11–12.12.22.
- Saibo J.M.M., Lourenço T., Oliveira M.M., 2009. Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of Botany*, 103: 609-623.
- Santos A.P., Abranches R., Alison E., Stoger E., Viegas W., Shaw P.J., 2002. The architecture of interphase chromosomes and gene positioning are altered by changes in DNA methylation and histone acetylation. *Journal of Cell Science*, 115: 4597-4606.
- Santos A.P., Wegel E., Shaw P., Stoger E., Thompson B., Allen G., Abranches R., 2006. In situ methods to localize transgenes and transcripts in interphase nuclei: a tool for transgenic plant research. *Plant Methods*, 2:18 (13 pages).
- Vasconcelos M., Datta K., Oliva N., Khaleduzzaman M., Torrizo L., Krishnan S., Oliveira MM, Goto F, Datta S.K., 2003. Enhanced iron and zinc accumulation and absorption in transgenic rice. *Plant Science*, 164: 371-378.
- Wang W., Vinocur B., Altman A., 2003. Plant responses to drought, salinity

nity and extreme temperatures:
towards genetic engineering for
stress tolerance. *Planta*, 218: 1-14.

Biotecnologia da terra pela Terra

Biotechnology of the earth for the Earth

Cristina Cruz*, Teresa Dias, Maria Amélia Martins-Loução

Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Centro de Biologia Ambiental (CBA), Campo Grande, C-2, Piso 5, 1749-016 Lisboa. Portugal

Resumo

Quando se abordam as relações entre biologia e ambiente a actividade agrícola pressionada pela necessidade de garantir a segurança alimentar da população humana com os menores impactos possíveis é uma área de inquestionável interesse científico, tecnológico, económico e social. No nosso laboratório estudamos possíveis formas de utilização da relação entre as plantas e os microrganismos para aumentar a eficiência do uso dos nutrientes, aumentar a qualidade alimentar dos produtos, diminuir o uso de insecticidas e pesticidas e mitigar os efeitos do uso excessivo de fertilizantes. Os resultados obtidos até agora mostram-nos caminhos promissores mas também uma ainda longa caminhada de investigação básica e aplicada para as muitas potencialidades do uso da biodiversidade do solo como “ferramenta biotecnológica” para uma maior produção integrada, ou seja, uma produção agrícola com mais qualidade e menos impactos ambientais.

Palavras-chave: rizosfera, azoto, microrganismos do solo, bactérias fixadoras de azoto, micorrizas

* Autor correspondente: Dr Cristina Cruz, E-mail: ccruz@fc.ul.pt

Abstract

When studying the relations between biology and environment agriculture is one of the most attractive subjects since it is under the pressure of assuring food security for humanity while decreasing the environmental impacts of such an intensive production. It is a field of scientific, technical, economical and social interest. In our laboratory we study the use of rhizospheric microorganisms and plants and their interactions, in order to improve nutrient use efficiency and product quality, decrease the use of insecticides, mitigate the effects of nitrogen in excess in the ecosystems. The results obtained so far showed several potential ways of interfering in productivity through the use of microorganisms as biotechnological tools, and highlight the need for more research in this area.

Keywords: rhizosphere, nitrogen, soil microorganisms, nitrogen fixing bacteria, mycorrhiza

Introdução

Uma das áreas de investigação, que tem merecido uma particular atenção nos últimos tempos relaciona-se com o funcionamento e processos nos ecossistemas, ciclo de nutrientes (Cruz *et al.*, 2008; Baron *et al.*, 2010) e simbioses no domínio das interações solo-planta-atmosfera (Cruz *et al.*, 2009). A tecnologia usada é muito diversa e engloba: análise da vegetação, trocas gasosas (entre o solo e atmosfera e as plantas e atmosfera), análises do metabolismo (enzimologia e metabolómica), mecanismos determinantes do desenvolvimento radicular e da rizosfera incluindo: fixação de azoto, formação de micorrizas, estrutura e funcionamento das comunidades microbianas (Cruz *et al.*, 2003, 2006, 2007; Neto *et al.*, 2006). A originalidade dessas abordagens está na forma multidisciplinar e integradora de tratar os problemas.

Como exemplo de um caso de estudo podemos dar o trabalho desenvolvido sobre os impactos do aumento da bio-disponibilidade do azoto ao nível dos ecossistemas e da sociedade (Martins-Loução *et al.*, 2010, Dias *et al.*, 2010 a,b).

Os actuais sistemas agrícolas usados na Europa e nos Estados Unidos da América têm tido grande sucesso no aumento das colheitas e na diminuição da proporção dos rendimentos individuais gastos na alimentação. No início do século XX a produção anual de trigo proveniente de um ha era suficiente para sustentar 2 pessoas e actualmente o mesmo ha pode sustentar 4 pessoas sem que o consumo individual tenha diminuído (Figura 1).

Este aumento da produtividade agrícola é, em grande parte, devido ao melhoramento genético das variedades utilizadas e ao uso de fertilizantes sintéticos. Apesar deste sucesso a agricultura in-

tensiva tem tido graves impactos no ambiente (Pinho *et al.*, 2009).

Historicamente, os impactos ambientais da indústria agrícola nunca foram contabilizados. Sendo mesmo a actividade agrícola encarada como uma actividade benevolente e saudável. As primeiras preocupações ambientais com a actividade agrícola surgiram na segunda metade do século XX e relacionaram-se com o impacto do uso dos pesticidas na saúde humana e no ambiente.

No final do século XX a poluição causada pelo uso de fertilizantes e pesticidas na agricultura não era mais tolerada do que a poluição causada por outras actividades industriais (Warren *et al.*, 2008). De momento a actividade agrícola é encarada como uma indústria multifuncional. A agricultura multifuncional produz não só fibra e alimento, mas também muitos outros produtos e serviços, tais como os impactos da actividade agrícola na qualidade ambiental: paisagem, biodiversidade, qualidade da água, bem-estar animal, segurança alimentar, qualidade do solo (Lethonen *et al.*, 2005). Estes bens e serviços, embora não tendo valor de mercado, são na sua maior parte serviço público e por isso reconhecido por todos.

Agricultura e qualidade ambiental

Por forma a garantir o equilíbrio entre os prós e os contras da actividade agrícola foram definidas prioridades e estabelecido o código de boas práticas agrícolas, que embora não sendo de uso obrigatório constitui uma forte recomendação no sentido de manter as preocupações mínimas com a qualidade ambiental. O código de boas práticas agrícolas cobre uma vasta gama de assuntos: gestão da qualidade do solo e da água, uso de fertilizantes e pesticidas, biodiversidade da paisagem, gestão da pastorícia e dos resíduos (Soveral Dias, 1997).



N...It was clear that the demand for fixed N which at the beginning of last century (XIX) could be satisfied with a few hundred thousand tons a year, most increase to millions of tons.,

Fritz Haber at the Nobel Prize lecture, 1908

Figura 1. Um hectare de trigo que no princípio do século XX era suficiente para alimentar 2 pessoas pode hoje alimentar 4. O aumento da produtividade é devido principalmente ao melhoramento genético das cultivares e ao uso de fertilizantes de síntese química.

Os impactos ambientais da actividade agrícola manifestam-se ao nível da qualidade do ar, da água e do solo. Um dos impactos mais divulgados relaciona-se com a contribuição da actividade agrícola para o aumento das emissões de gases com efeito de estufa. Em termos da sua contribuição para o aquecimento global os três gases com efeito de estufa mais importantes são o dióxido de carbono, o metano e o óxido nitroso e a agricultura é responsável pela emissão de quantidades significantes de todos eles (Shvaleva *et al.*, 2010).

O aumento das emissões de dióxido de carbono associadas à agricultura está essencialmente relacionado com alterações do uso do solo (Cruz *et al.*, 2008). A desflorestação e a perda de carbono superficial dos solos contribui em muito para o aumento das emissões de dióxido de carbono. No entanto uma fracção substancial das emissões de

metano e óxido nitroso resultam directamente da actividade agrícola.

A descoberta do processo de síntese química de amónio pelo processo Haber-Bosch no início de século XIX e a sua aplicação industrial permitiu a revolução verde. Sem a utilização dos fertilizantes azotados a população humana seria apenas metade da actual. O processo da síntese química do amónio consiste na conversão de azoto molecular (química e biologicamente inerte) em azoto reactivo (que pode ser utilizado pela maioria dos seres vivos).

Actualmente a quantidade de azoto fixado pelo processo de Haber-Bosh é superior à quantidade de azoto fixado pela fixação biológica de azoto. Como não houve, ainda, o correspondente aumento da desnitrificação (conversão de azoto reactivo em azoto inerte) o uso de fertilizantes traduz-se no aumento

da disponibilidade de azoto para todo o ecossistema.

Como a maior parte dos ecossistemas são regulados pela disponibilidade de azoto, o resultado mais imediato é o aumento da produtividade com diminuição da biodiversidade, aumento da emissão de óxido nítrico para a atmosfera e lixiviação de nitrato para os sistemas aquáticos. Sendo o azoto um dos elementos essenciais à vida e um elemento regulador nos processos e funcionalidade dos ecossistemas é fácil perceber que o aumento da sua bio-disponibilidade interfere com outros processos nomeadamente alterações climáticas e biodiversidade (Gruber e Galloway, 2008).

Foram definidos limites de segurança para alterações antropogénicas nos vários sectores reguladores das alterações globais: concentração atmosférica de dióxido de carbono, alterações no ciclo biogeoquímico do azoto e do fósforo, acidificação dos oceanos, concentração de ozono na estratosfera,

uso global de água doce, alterações do uso do solo, perda de biodiversidade, poluição química e concentração de aerossóis. Verifica-se que em três destes sectores: alterações climáticas, ciclo do azoto e perda de biodiversidade as barreiras de segurança já foram largamente ultrapassadas e por isso a irreversibilidade do processo está praticamente garantida (Rockström *et al.*, 2009).

O excesso de azoto no ecossistema pode ser detectado pelo desequilíbrio entre os inputs e os outputs. A diferença é normalmente perdida para o ambiente. Normalmente os desequilíbrios são mais acentuados em zonas de produção animal intensa (aviários, vacarias, suiniculturas) onde a quantidade de azoto perdido para o ambiente pode atingir os 170 kg N/ha/ano. A deposição de azoto observada em muitos habitats excede os níveis máximos de deposição que não têm efeito na funcionalidade do ecossistema – “Critical Loads” ou níveis máximos (Bobbink *et al.*, 1998).

Tabela 1. Níveis máximos de deposição de azoto que não têm efeito na funcionalidade do ecossistema (“critical loads”) para vários tipos de ecossistema.

Tipo de ecossistema	Níveis Máximos (kg/ha/ano)
Bogs	15
Turfeiras	17
Pradarias calcárias	50
Pradarias (ácidas ou neutras)	25
Florestas decíduas	17

O aumento das preocupações ambientais e a mudança do foco da produção em quantidade para a produção em qualidade causou também uma mudança da política agrícola comum tendo como objectivo a redução dos subsídios à produção em 50% a partir do

ano de 2013.

Estas alterações no seu conjunto vão motivar os agricultores para a utilização de novas técnicas e meios, que embora já disponíveis há algum tempo, só com a redução dos subsídios e o au-

mento do preço dos fertilizantes (devido sobretudo aos custos energéticos) se tornam atractivas. Numa agricultura sustentável o aumento do rendimento dos agricultores tem que se basear na redução dos custos ou no aumento da qualidade dos produtos.

É neste contexto, que a utilização do solo como uma estrutura viva e a exploração das actividades e capacidades da infinidade de micro-organismos do solo pode fazer parte de uma reforma radical da agricultura Europeia. Por outro lado a utilização dos micro-organismos do solo baseada no conhecimento das suas funções pode permitir o aumento da produtividade de sistemas agrícolas tradicionais, por forma a garantir a segurança alimentar das populações, sem a necessidade de transitar para sistemas de agricultura intensiva desenquadrados dos ecossistemas que os suportam (Cruz *et al.*, 2009).

O grande desafio actual é portanto aumentar a disponibilidade de nutrientes fazendo uso de processos biológicos para aumentar a acessibilidade e a eficiência do uso dos nutrientes. Dependendo do enquadramento local o uso dos processos biológicos pode ser feito em conjunto com a aplicação de fertilizantes, pode consistir na aplicação de inóculos micorrízicos ou bacterianos que podem aumentar a produtividade, a qualidade da produção, a eficiência do uso dos nutrientes e a resistência a stress biótico e abiótico.

A aplicação conjunta de fertilizantes de síntese e inóculos biológicos.

A comparação de sistemas agrícolas intensivos, em que o solo é considerado apenas como um suporte para a planta e toda a nutrição é contabilizada do ponto de vista químico, com sistemas agrícolas tradicionais onde o hipotético balanço entre “inputs” e “outputs”

se encontra em equilíbrio, conduziu à ideia de que a actividade biológica do solo é incompatível com o uso de fertilizantes. Para tal contribuiu também o escasso conhecimento sobre a imensa biodiversidade e funcionalidade dos solos.

Trabalhos desenvolvidos em campos de cultura intensiva de milho mostram que a taxa de micorrização das raízes pode atingir os 40%, mesmo quando a concentração de fósforo no solo é de 1000 ppm. Porém, a composição específica dessa população é distinta da que ocorre em concentrações de fósforo mais baixas e no seu conjunto menos eficiente na aquisição e fósforo para a planta. Estes resultados mostram que a microbiologia do solo e da rizosfera se adapta e reflecte as condições do meio em que se desenvolve (Correia, comunicação pessoal).

Existem conjunturas onde os fertilizantes podem ser aplicados com vantagens em conjunto com inóculos de microrganismos (bactérias fixadoras de azoto, solubilizadoras de fósforo, promotoras do crescimento vegetal, etc.). É evidente que as vantagens dependem do tipo de solo e das culturas a instalar.

Dos estudos que temos feito sobre a aplicação de fertilizantes revestidos com microrganismos podemos salientar:

- 1)** a redução do uso de fertilizantes, dado que a produtividade pode ser mantida usando até 80% das doses recomendadas do mesmo fertilizante sem o revestimento biológico;
- 2)** aumento da eficiência de aquisição do fertilizante aplicado, reduzindo assim as perdas para o meio ambiente;
- 3)** aumento da incorporação de azoto atmosférico nas culturas devido ao desenvolvimento de bactérias fixadoras de azoto;
- 4)** manutenção da qualidade biológica do solo (estimada com base na es-

trutura e função da comunidade microbiana do solo);

5) aumento da eficiência do uso da água em 5 a 10% relativamente aos fertilizantes não revestidos com microrganismos.

O desenvolvimento de fertilizantes revestidos com microrganismos com funções específicas e funcionais nas condições do solo de destino (textura e pH do solo, regime hídrico) e a cultura em causa parece ser um caminho promissor para aumentar a eficiência do uso dos fertilizantes aplicados ao solo. Actualmente, só 50% do fertilizante aplicado é utilizado pelas plantas e somente 14% são utilizados pelo consumidor final (o Homem). A gestão adequada da população microbiana do solo pode fazer com que mais de 50% do azoto aplicado seja utilizado pelas plantas diminuindo assim as perdas de azoto para a atmosfera (volatilização de amónio e produção de óxido nítrico) e para os cursos de água por lixiviação.

Os processos em estudo relacionam-se com a influência da aplicação destes fertilizantes na qualidade biológica do solo: composição da comunidade microbiana e da abundância relativa das várias espécies, avaliação da sua funcionalidade através de actividades de carácter geral como a respiração, potencial de decomposição ou de actividades específicas como o potencial de nitrificação, fixação de azoto, solubilização de fósforo, oxidação de enxofre, etc.

Em termos de qualidade ambiental a grande preocupação, para além do aumento da eficiência do uso dos nutrientes, relaciona-se com a manutenção da biodiversidade do solo e a não introdução de espécies de microrganismos agressivos.

Os microrganismos da rizosfera e a resistência a stress

As simbioses mutualistas entre os mi-

croorganismos da rizosfera ocorrem frequentemente na natureza. Os benefícios para a planta envolvem normalmente melhores condições nutritivas e maior resistência ao stress. No caso das associações com fungos endomicorrízicos (AM), a simbiose altera a fisiologia da planta aumenta o nível nutricional e a resistência ao stress (Cruz *et al.*, 2007, Cruz *et al.*, 2009, Meira *et al.*, 2010).

Este efeito depende das espécies fúngicas e vegetais envolvidas e pode ainda ser modulado pelas condições ambientais e edáficas. Um aumento generalizado da resistência localizada ou sistémica a patogénicos é a tendência observada nos vários estudos desenvolvidos (Whipps, 2004).

A protecção conferida à planta pela micorriza resulta da combinação de vários factores que actuam a níveis distintos. Os mecanismos mais óbvios relacionam-se com a protecção conferida pelo melhor estado nutricional das plantas e a compensação, pelo fungo, dos danos causados pelo patogénico. A micorriza arbuscular também diminui o espaço disponível na raiz para ser colonizado pelos fungos patogénicos e ele próprio condiciona o desenvolvimento dos microrganismos da rizosfera podendo inibir o desenvolvimento de alguns patogénicos radiculares. Por último a simbiose micorrízica também activa as defesas da planta.

Durante a sua interacção com os microrganismos, as plantas são capazes de reconhecer compostos químicos derivados dos microrganismos e desenvolver defesas específicas para o agente produtor dos mesmos. O diálogo químico estabelecido entre os parceiros determina o resultado final da relação que pode variar entre parasitismo e mutualismo. Um controlo apertado dos mecanismos de defesa da planta parece ser o aspecto chave da colonização

endomicorrizica e da compatibilidade com o hospedeiro.

A acumulação de espécies reactivas de oxigénio, a activação do metabolismo dos fenilpropanoides e a acumulação de isoformas específicas de enzimas hidrolíticas tais como as quitinases e glucanases têm sido descritas em raízes micorrizadas. No entanto, estas reacções são geralmente localizadas sugerindo uma função no controlo da micorrização.

A resistência das plantas à patogénicos induzida pela micorriza parece estar ligada essencialmente a um efeito de antecipação de activação dos mecanismos de defesa devido à presença do fungo micorrízico. O espectro de eficiência da resistência induzida pela micorriza correlaciona-se com o aumento das defesas da planta relacionadas com a produção de ácido jasmónico.

Este tipo de defesa, com baixos custos energéticos, pode justificar a estabilidade da simbiose micorrízica ao longo da evolução da vida na Terra e a sua ubiquidade. Progressos no conhecimento científico das interacções entre plantas e fungos micorrízicos, com a identificação de indicadores das características funcionais da associação e a elaboração de modelos preditivos das características específicas de determinadas associações simbióticas, podem ter importantes implicações práticas para o uso da inoculação prévia das plantas com fungos micorrízicos arbusculares com vista ao controlo biológico de pestes.

O efeito da micorrização no aumento da resistência de plantas de tomateiro a *Fusarium* e de bananeira a *Meloidogyne* incognita foi mostrada mesmo em associação com outros factores de stress, temperatura ou falta de água (Meira 2004, Li *et al.*, 2006). Por exemplo as galhas de *M. incognita* formadas

nas plantas de bananeira colonizadas com *Glomus intraradices* (um fungo formador de micorrizas arbusculares) foram cerca de metade das formadas nas plantas não micorrizadas cultivadas em condições idênticas.

O interessante é que o efeito da micorriza não se limita a alterações morfológicas e fisiológicas ao nível do sistema radicular. Também se manifesta ao nível da parte aérea através do aumento do metabolismo relacionado com o stress oxidativo, nomeadamente as actividades da superóxido dismutase e da glutatona reductase.

De uma forma geral o efeito positivo da micorrização no desenvolvimento das plantas e na sua resistência ao stress não é questionado. Já se percebeu que muitos dos resultados negativos obtidos estão relacionados com a utilização inadequada dos inóculos.

A obtenção de inóculos de qualidade é realmente um dos problemas associados ao uso generalizado de inoculações com fungos micorrízicos arbusculares.

Neste contexto, reveste-se de grande interesse o estudo de outros componentes da rizosfera, os fungos endófitos.

Os fungos endófitos e os seus efeitos no desenvolvimento vegetal estão ainda muito mal conhecidos. No entanto eles aparecem como colonizadores na maioria das raízes, mesmo em presença de fungos endomicorrízicos.

Este facto levanta algumas dúvidas sobre as funções dos fungos endofíticos. Alguns dos trabalhos feitos mostram que podem ter papel importante no desenvolvimento vegetal e que poderão estabelecer com a planta simbioses funcionalmente semelhantes às dos fungos arbusculares.

Uma das vantagens de trabalhar com

fungos endofíticos relativamente aos fungos endomicorrizicos é que os primeiros completam o seu ciclo de vida independentemente de estarem associados à planta e os fungos endomicorrizicos não. Isto significa que o fungo endofítico pode ser cultivado sem a planta, o que é muito importante quando se pensa na produção de inóculos em larga escala.

De momento estamos a trabalhar com o fungo endofítico *Piriformospora indica*, que mostrou ter, quando em associação com a planta, uma capacidade de transporte de azoto do meio extra para o intra-radicular superior em 50% à do *Glomus intraradices* (fungo endomicorrizico).

A co-cultura de plantas de tomateiro com *Piriformospora indica* caracterizou-se pelo aumento da produção de fruto em condições de stress (salino e nutricional), mas não em boas condições de crescimento. Este tipo de resposta aparece muito ligada às culturas inoculadas com fungos endofíticos: não se observam benefícios em condições boas para o crescimento, mas quando as condições são menos favoráveis ao desenvolvimento vegetal há um nítido benefício da inoculação.

No caso da simbiose com *Piriformospora indica* os benefícios parecem estar associados com o aumento da actividade das enzimas envolvidas no metabolismo antioxidativo. O resultado da co-cultura do tomateiro com *Piriformospora indica* foi o aumento da concentração do fruto em licopeno, o que foi particularmente evidente no cultivo de tomate para indústria de extracção de licopeno.

Este resultado chama também a atenção para a importância da utilização dos microrganismos do solo para incrementar a qualidade alimentar dos. A importância dos microrganismos do solo na aquisição pela planta de micro-

-nutrientes é uma das áreas de grande importância para a produção de alimentos em zonas onde se verificam carências alimentares ao nível Fe, Zn, Mn, etc. A recente valorização de produtos alimentares com maiores conteúdos em compostos anti-oxidantes constitui mais uma forma de aumentar o rendimento do agricultor devido à utilização de microrganismos.

A manipulação da actividade microbiana através do uso de plantas.

Se a actividade das plantas pode ser condicionada pela actividade dos microrganismos, a dos microrganismos também pode ser manipulada pela presença de plantas.

Neste contexto, temos seguido o balanço de azoto numa exploração agropecuária correspondente à presença permanente de 200 cabeças de gado vacum para acabamento. A presença dos animais na área corresponde à adição ao solo de 25kg de azoto por dia na área de exploração envolvente.

Este valor é em muito superior ao azoto disponível no ecossistema e isso faz-se notar: na vegetação envolvente, na biodiversidade e funcionalidade do solo na área de exploração (num raio de 250 m do estábulo) e nas trocas de gases com efeito de estufa entre o solo e a atmosfera. De uma forma geral as florestas funcionam como sugadores de metano da atmosfera, situação que é completamente invertida na zona de exploração alargada (1 km de raio do estábulo).

Por outro lado o aumento de azoto no solo aumenta de forma drástica o potencial de nitrificação e a produção de óxido nitroso. Nestas condições a escolha de cultivos apropriados para a vizinhança da vacaria pode constituir uma importante medida de mitigação do excesso de azoto no sistema (Figura 2).

A cultura de plantas com capacidade de

produção de inibidores de nitrificação como o sorgo é eficaz na diminuição da emissão de óxido nítrico. A utilização destas culturas nas zonas circundantes

das explorações agropecuárias pode constituir uma medida importante para minimizar os efeitos do excesso de azoto no ambiente.

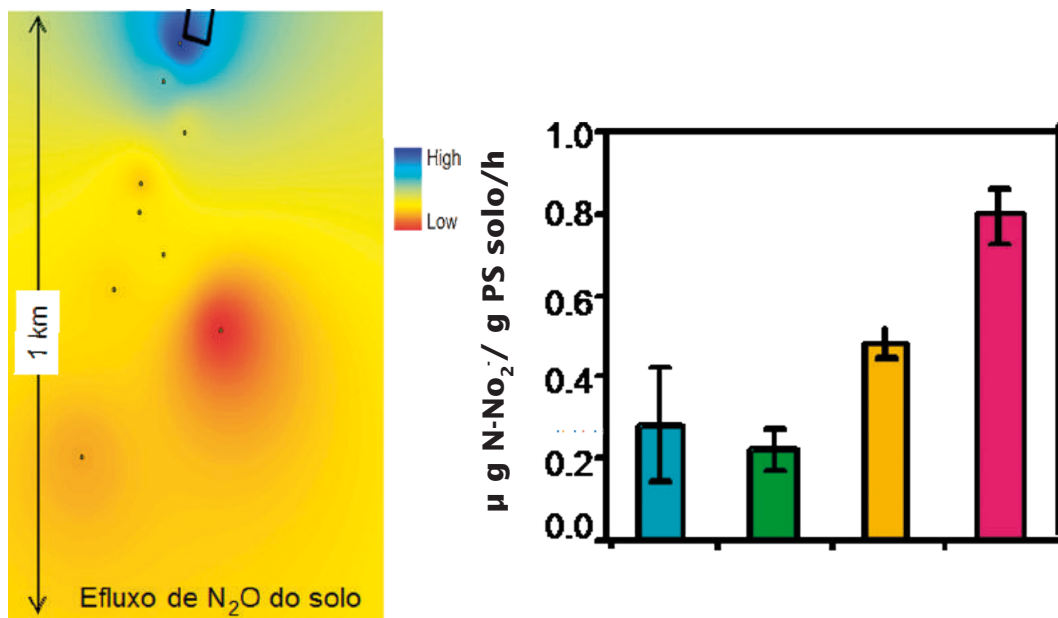


Figura 2. Esquerda: Mapa das emissões de óxido nítrico em função da distância a uma vacaria com 200 unidades de gado vacum permanentes. As emissões de óxido nítrico estão muito relacionadas com o potencial de nitrificação. Direita: Potencial de nitrificação dos solos de acordo com a cultura sorgo (S) ou trigo (T) e a adição de fertilizante (40 kg/ha de ureia (U). Quando a disponibilidade de ureia é baixa as duas culturas apresentam potenciais de nitrificação semelhantes, mas quando a disponibilidade de azoto é maior o potencial de nitrificação do trigo é muito maior do que o do sorgo.

O solo é o maior reservatório de biodiversidade do nosso planeta. No solo as plantas não vivem isoladas, estabelecem antes uma teia de relações com os microrganismos do solo que lhes confere vantagens e características próprias.

Um sistema produtivo que se baseie no conhecimento dos benefícios e perigos destas relações pode estar na base de um compromisso entre a necessidade de produzir os alimentos necessários para garantir a segurança alimentar da população humana, mas também de

manter no nosso planeta as condições necessárias ao desenvolvimento da vida de forma favorável para a humanidade.

Sendo o azoto um dos factores mais limitantes da actividade biológica e um dos elementos em cujo ciclo biogeoquímico há maior participação de elementos vivos, alterações dramáticas no ciclo do azoto, como a produção de fertilizantes químicos, têm consequências ao nível dos sistemas de regulação das alterações globais e interfere com outros sectores como os ciclos do car-

bono e do fósforo, as alterações climáticas e a perda de biodiversidade.

O nosso foco reside no estudo da estrutura e função dos microrganismos da rizosfera como potenciais reguladores de vários passos das bio-transformações do azoto e outros nutrientes por forma a: aumentar a eficiência do uso dos nutrientes, melhorar a qualidade alimentar da produção e diminuir os impactos ambientais da produção intensiva.

Neste contexto, a nossa abordagem é criar um enquadramento geral para a função dos microrganismos do solo onde haja lugar para as peculiaridades dos sistemas, com respeito pelos usos e tradições locais.

Referências bibliográficas

- Baron J.S., Barber M., Feest A., Gilliam F., Lu X., Stevens C.J., Woodin S., Bobbink R., Adams M., Agboola J., Allen E., Bealy B., Bobrovsky M., Bowman W.D., Branquinho C., Bustamente M., Clark C.M., Cocking E., Cruz C., Davidson E., Denmead T., Dias T., Dise N., Harrison I., Galloway J.N., Géiser N., Khanina L., Manrique E., Ochoa-Hueso R., Ometto J.P., Payne R., Scheuschner T., Sheppard L., Simpson G., Singh Y.V., Strachan I., Sverdrup H., Tokuchi N., van Dobben H., 2010. The effects of atmospheric N deposition on terrestrial and freshwater biodiversity. Edinburgh workshop on Biodiversity. Novembre. In press.
- Cruz C., Bio A.M.F., Dominguez-Valdia M.D., Aparicio-Tejo P.M., Lamsfus C. e Martins-Loução M.A., 2006. How does GS determine plant tolerance to ammonium? *Planta* 223: 1068-1080.
- Cruz C., Bio A.M.F., Jullioti A., Tavares A., Dias T. e Martins-Loução M.A., 2008. Heterogeneity of soil surface ammonium concentration and other characteristics, related to plant specific variability in a Mediterranean-type ecosystem. *Environmental Pollution*. Doi: 10.1016/j.envpol.2007.12.07. 1-10.
- Cruz C., Egsgaard H., Trujillo C., Ambus P., Requena N., Martins-Loução M.A. e Jakobsen I. 2007. Enzymatic evidence for the key role of arginine in nitrogen translocation by arbuscular mycorrhiza fungi. *Plant Physiol.* 144: 782-792.
- Cruz C., Lips H. e Martins-Loução M.A., 2003. Nitrogen use efficiency by a slow-growing species as affected by CO₂ levels, root temperature, N source and availability. *Journal of Plant Physiology* 160: 1421-1428.
- Cruz C., Martins-Loução M.A. e Varma A. 2009. The Influence of Plant co-culture of Tomato Plants with *Piriformospora indica* on Biomass Accumulation and Stress Tolerance. *Acta Horticulturae*. In Press.
- Cruz C., Ramos A., Façanha A., Feijó J. e Martins-Loução M.A. 2009. Enzyme activity modulated by AMF colonization: the urea cycle and membrane-bound phosphatase activities. In "A Text Book of Molecular Biotechnology", Ajit Varma (eds), Springer Publishers. 563-572.
- Dias T., Martins-Loução MA, Sheppard L. e Cruz C. 2010. Effects of increased N availability in Mediterranean-type ecosystems: a case study in a Natura 2000 site in Portugal. Edinburgh workshop on Biodiversity. Novembre. In press.
- Dias T., Stürmer S.L., Correia P., Carvalho L., Martins-Loução M.A., Sheppard L. e Cruz C. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungal spores, an indicator of increased N availability in Mediterranean-type ecosystems. Edinburgh workshop on Biodiversity. Novembre. In press.
- Gruber N., Galloway J.N., 2008. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* 451:

- 17 -23.
- Li H.Y., Yang G.D., Shu H.R., Yang Y.T., Ye B.X., Nishida I, Zheng C.C., 2006. Colonization by arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* induces a defense response against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in the grapevine (*Vitis amurensis* Rupr) which includes transcriptional activation of the classe III chitinase gene VCH3. *Plant Cell Physiology* 47: 154-163.
- Martins-Loução M.A., Cruz C., Pinho P., Dias T., Branquinho C., 2010. Science & Practice for assessing the impact of N deposition on biodiversity: the use of integrative ecological indicators. Workshop natura 2000 Brussels. In Press.
- Meira L., 2004. Mecanismos de Resistência de Bananeira Micropropagada (*Musa* sp.) Associadas aos Fungos Micorrízicos Arbusculares ao Nematóide das Galhas (*Meloidogyne incognita*). Tese de Doutorado. Universidade de Viçosa. Minas Gerais. Brasil.
- Neto D., Carvalho L., Cruz C. e Martins-Loução M.A., 2006. How do mycorrhiza affect C and N relationships in flooded *Aster tripolium* plants? *Plant & Soil* 279: 51-63.
- Pinho P., Branquinho C., Cruz C., Tang S., Dias T., Rosa, A.P., Máguas C., Martins-Loução M.A. e Sutton M., 2009. Assessment of critical levels of atmospherically ammonia for lichen diversity in cork-oak woodland, Portugal. In "Atmospheric Ammonia - Detecting emission changes and environmental impacts" (Eds M Sutton, S Reis and SMH Baker). Springer Publishers. Pp 109-119.
- Rockström e outros, 2009. Planetary Boundaries: Exploring the safe operating space for humanity. *Ecology and Society*, In Press 14th September 2009.
- Soveral D., 1997. Código de boas práticas agrícolas. Ministério da agricultura, desenvolvimento rural e pescas.
- Warren J., Lawson C, Belcher K., 2008. The agri-environment. Cambridge University Press.
- Whipps JM 2004. Prospects and limitations for mycorrhiza in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany* 82: 1198-1227.

Publish the results of
your investigation in



Multidisciplinary Scientific Journal

CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Email : revistacienciatecnologia@gmail.com

Apresentação de livro

“História da educação e cultura de Angola” de autoria de Teresa José Adelina da Silva Neto

Luanda, aos 24 de Maio de 2011

Cabe-me a subida honra de fazer a apresentação técnica da obra intitulada “HISTÓRIA DA EDUCAÇÃO E CULTURA DE ANGOLA”.

Esta obra trata-se de um livro de autoria da **Prof. Dr. Teresa José Adelina da Silva Neto**, baseada na sua tese de doutoramento e editada em 2010 no Brasil pela Editora “ZAINEDITORES”, na variante de Língua Portuguesa então vigente naquele país, antes da implementação do Acordo Ortográfico.

Para além do Prefácio, assinado pelo prestigiado Professor Titular de História da Educação José Luís Sanfelice, contém quatro capítulos, considerações finais e uma lista da bibliografia consultada, perfazendo um total 215 páginas.

No seu todo, o livro apresenta um alto padrão gráfico, tem como azul-marinho a cor de capa desta edição (a 1ª), e está apresentado num formato cómodo, fácil de transportar.

É coisa para dizer que o livro em si está bastante sugestivo e com certeza vai realçar-se entre todos outros que com ele perfilarem as prateleiras das bibliotecas das nossas instituições do ensino superior, investigação científica e desenvolvimento tecnológico, sem nos esquecermos de outras bibliotecas públicas e privadas.

Para além de ser um produto angolano, é importante enfatizar que vem de uma angolana, uma mulher, mãe, esposa, que por sinal é a Magnífica Reitora da Universidade Metodista de Angola, o que a mim, e estou convicta que a todas outras mulheres angolanas honra-nos e não tenho a menor dúvida de acreditar que a todos homens angolanos também enche de enorme orgulho.

O CAPÍTULO I da obra que tenho o prazer de apresentar é dedicado a HISTÓRIA E HISTORIOGRAFIA DE ANGOLA, onde entre vários aspectos são abordados os grupos etnolinguísticos, a organização dos Reinos do Congo e Ndongo, as primeiras resistências ao colonizador, o comércio de escravos e a divisão da África em países.

O CAPÍTULO II, trás a luz resultados de estudos inéditos sobre a HISTÓRIA DA EDUCAÇÃO ANGOLANA PRÉ-COLONIAL, onde aspectos como a iniciação para os meninos e as meninas, a poligamia e o papel da religiões africanas na resistência cultural merecem uma atenção especial da autora.

O CAPÍTULO III, desta obra, situa-nos entre os séculos XV (quinze) e XX (vinte) e traz-nos factos sobre como era implementada a EDUCAÇÃO PARA FINS “COLO-



NIAIS” e sub-temas convidativos como, por exemplo, o “Papel da Igreja Católica” e referências sobre as “igrejas africanas modernas”, como chama a autora, neste caso refiro-me as “Igrejas Kimbanguísta e Tocoísta”.

Estes aspectos são, por si só, mais que um estimulador de apetite suficiente para historiadores, antropólogos, outros estudiosos de outras áreas como ciências sociais, jurídicas, políticas, ou simplesmente os “caçadores” de uma boa leitura.

Decidiu a autora que os estudos realizados e consequentemente esta obra não teriam fim se não abordasse no seu CAPÍTULO IV, a “EDUCAÇÃO PÓS-INDEPENDÊNCIA”, que permitam-me denomina-la de “nossa era” ou da “era da nova Angola”.

Aqui faz-se um enquadramento interessante, tendo em conta a nossa história política, do conflito que assolou o país e dos caminhos que nos levaram a paz alcançada em 2002, ganho este que é associado ao sacrifício de muitos bons filhos e boas filhas da nossa Angola, tendo como destaque a figura do seu principal arquitecto ENG. JOSÉ EDUARDO DOS SANTOS, PRESIDENTE DA REPÚBLICA DE ANGOLA E DO MPLA.

Tal como refere o prefaciador desta obra, Professor José sanfelice, a Professora Doutora Teresa Silva Neto “alicerçada em historiografia especializada, busca sintetizar como se deram as tensas relações estabelecidas entre os colonizadores e os nativos. Destaca os artifícios e as lutas de resistência dos nativos, em especial no reinado da Rainha Nzinga Mbandi, considerada, pela autora, a precursora do movimento de libertação de Angola em pleno século XVII.”, imaginem (!).

Mas adiante a autora refere que “a dominação colonial portuguesa, imposta pela violência da guerra, fez com que Angola se convertesse na principal fonte fornecedora de escravos” para o Brasil, que naquela altura era também uma colónia de Portugal.

Sobre a escravatura, há esclarecimentos de suma importância nesta obra e a autora teve a louvável ousadia e arte suficiente para abordar o papel das igrejas versus colonização, ou melhor durante a colonização.

Salto exactamente para a parte final desta obra, deixando ao belo prazer do leitor a desafiadora oportunidade de fazer achados no vasto leque de informações que a obra congrega, ou seja a autora faz, como eu dizia atrás, na parte final da sua obra, “uma espécie de balanço” sobre a educação pública em Angola após o 11 de Novembro de 1975, data da independência do nosso querido e belo país.

Eu não trago e não tentei trazer o conteúdo desta importante obra nesta caracterização que tive a honra de fazer perante este auditório, perante esta moldura humana bem composta.

Ainda assim, é relevante referir, que nesta sua primeira obra, a autora não fecha o livro e não tenta esgotar o tema, apontando inclusive caminhos para que outros pesquisadores e pesquisadoras ou estudiosos e estudiosas pudessem desbravar os mesmos e novos caminhos, o que constitui por si só um mérito de elevado significado para ela como cientista.

A todos “bom apetite” para uma leitura aturada da HISTÓRIA DE EDUCAÇÃO E

CULTURA DE ANGOLA e quiça será este o ponto de partida para novos voos e descobertas científicas.

BOA LEITURA E BONS ESTUDOS!

Maria Cândida Pereira Teixeira

Ministra do Ensino Superior e da Ciência e Tecnologia



Ministry of Higher Education,
Science and Technology

1st National Conference on Higher Education

to be held in Luanda in 2012





Publicação de Distribuição Gratuita
Venda proibida

ISSN: 2223-9189

© DNACIC/MESCT – 2011