

## CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *P. FALCIPARUM* COLETADAS DE PACIENTES RECRUDESCENTES

Virgílio E. do ROSÁRIO (1) (\*), Alvaro A. COUTO (1), Marco A. SANTOS (1) e José Maria de SOUZA (2)

### RESUMO

A caracterização de cepas de *P. falciparum* coletadas de três pacientes internados no Centro de Provas Clínico-Farmacológicas do Hospital Barros Barreto (Belém, PA), através da eletroforese em acetato de celulose para duas enzimas (GPI e ADA), assim como através de testes de sensibilidade para duas drogas, cloroquina e mefloquina, permitiram observações da variação dos tipos enzimáticos em um dos pacientes e modificação no nível de sensibilidade à cloroquina em outro, tanto em amostras obtidas da infecção original, como em cada uma das recrudescências.

### INTRODUÇÃO

A existência de populações de parasitas, diferenciadas através das usuais técnicas de caracterização até hoje utilizadas — testes de resistência à drogas, perfil isoenzimático, diversidade antigênica, maior ou menor capacidade adaptativa às condições de cultivo, entre outras — confirma que, ao se comparar amostras coletadas em regiões diferentes, ou até mesmo numa mesma área, estas populações podem ser distintas (THAITHONG<sup>5</sup>; ROSÁRIO<sup>2</sup>).

O programa de caracterização de cepas estabelecido na Unidade de Estudos da Malária (Instituto Evandro Chagas — FSESP), até agora baseou seus estudos na análise das amostras coletadas de pacientes oriundos de localidades distintas da Região Amazônica. Estas amostras, também denominadas cepas, referem-se a populações de parasitas de *Plasmodium falciparum* obtidas em uma única coleta, de um determinado paciente<sup>2</sup>. Nossos estudos também já comprovaram, utilizando-se a técnica de eletroforese em acetato de celulose, a ocorrência de populações diferentes coexistentes em amostra

de um único paciente<sup>1</sup>. Tal observação, sugeriu que uma nova linha de pesquisa fosse realizada; obtendo amostras para cultivo contínuo e caracterização antes e após tratamento (paciente recrudescente) seria possível observar-se o grau de identidade entre ambas as populações de parasitas, coletados de um mesmo paciente. Usualmente sempre se considerou que o paciente portador de malária, resistente a uma dada medicação, fosse portador de uma população homogênea de parasitas.

Demonstrando-se que, em um paciente que recrudescer, a população de parasitas que sobreviveu a uma determinada medicação é diferente da população original, cremos que maior atenção deverá ser atribuída a estes casos clínicos.

Acreditamos que este estudo possa auxiliar a interpretação clínica de alguns casos de resistência a determinado tratamento, como também oferecer informações relevantes a futuros programas de controle, baseado em medicação profilática.

(1) Unidade de Estudos da Malária, Instituto Evandro Chagas (FSESP) — Belém, PA

(2) Centro de Provas Clínico-Farmacológicas, Hospital Barros Barreto — Projeto Mefloquina, Belém, PA

(\*) Atualmente fixado na Univ. of North Carolina-Parasitology Chapel Hill — USA

## MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras analisadas neste trabalho foram coletadas de três pacientes (FRL; PPS e APJ), internados no Centro de Provas Clínico-Farmacológicas do Hospital Barros Barreto — Projeto Mefloquina (Belém, PA)<sup>4</sup>, os quais apresentaram recrudescência após um ou mais tratamentos. Não foi registrada a ocorrência de vômito nos dois primeiros pacientes (FRL e PPS), o que só sucedeu no terceiro (APJ), que vomitou 25 minutos após o tratamento, voltando a vomitar mais duas vezes dentro da primeira hora (\*). O material coletado foi cultivado pela técnica de TRAGER & JENSEN<sup>6</sup>.

O paciente (FRL), internado a 06.07.83, foi tratado com o esquema sulfato de quinino 0,6 g de 8/8 horas durante 3 dias, associado a pirimetamina-sulfadoxina 3 comprimidos, dose única, 4 horas após a primeira dose de sulfato de quinino. Após negatar, veio recrudescer a 21 do mesmo mês, ainda hospitalizado, e foi medicado com 3 comprimidos de pirimetamina-sulfadoxina, sem sucesso, obrigando-se a um novo tratamento, desta vez com amodiaquina 10 mg/kg no primeiro dia, 7,5 mg/kg no segundo e 7,5 mg/kg no terceiro dia, o que também não produziu efeito curativo. Finalmente, em 16.08.83 foi tratado com sulfametrol 0,8 g + trimetoprim 0,16 g de 12/12 horas durante 5 dias, negatizando em 20.08 e recebendo alta em 25.08.83 ainda negativo, data do último controle. As amostras coletadas receberam os números: 70/83, 84/83, 87/83 e 97/83.

O paciente (PPS) foi internado a 29.07.83 tratado com cloridrato de quinino 0,53 g de 8/8 horas durante 3 dias, associado a pirimetamina-sulfadoxina 3 comprimidos, dose única, em 04.08.83. Após negatar, recrudescer em 11.08.83 e foi medicado, após coleta de amostra para cultivo, em 15.08.83 com amodiaquina 10 mg/kg no primeiro dia, 7,5 mg/kg no segundo dia e 7,5 mg/kg no terceiro dia, sem sucesso. Recebeu um terceiro tratamento em 25.08.83 à base de sulfato de quinino 0,6 g de 8/8 horas, associado à cloridrato de tetraciclina 0,25 g de 6/6 horas durante 10 dias, negatizando e recebendo alta em 03.09.83. Fez controle ambulatorial até 22.09 permanecendo negativo. As amostras coletadas foram denominadas 86/83 e 95/83.

O terceiro paciente estudado (APJ), foi internado em 22.02.84 e tratado com a combina-

ção mefloquina (0,75 g) + sulfadoxina (1,5 g) + pirimetamina (0,75 g) em 23.02, tendo vomitado 25 minutos após a ingestão da medicação, repetindo-se o vômito por mais duas vezes antes de completada a primeira hora. Tendo recrudescido em 16.03, foi-lhe aplicado tratamento único de mefloquina (0,5 g). Voltou a recrudescer em 07.04 sendo tratado em 09.04.84 com 1,0 g de mefloquina, curando definitivamente. As amostras coletadas foram denominadas: 19/84 e 29/84.

Durante este período os pacientes permaneceram hospitalizados não havendo, portanto, quaisquer possibilidades de contatos com mosquitos infectados.

As amostras coletadas e cultivadas foram caracterizadas através das seguintes técnicas: testes de sensibilidade *in vitro* para cloroquina e mefloquina<sup>3</sup> e tipificação enzimática para 2 enzimas: GPI — Glucose fosfato isomerase (EC. 5.3.1.9) e ADA — Adenosina deaminase (EC. 3.5.4.4) por eletroforese em acetato de celulose.

Na Tabela I estão sumarizadas as condições da corrida, tampões e reagentes utilizados.

As amostras submetidas à eletroforese foram comparadas sempre com amostras controles (cepa k 1 e cepa T 94) oriundas do Instituto Animal Genetics, Edinburgh, Grã-Bretanha. Os testes de sensibilidade a cloroquina e mefloquina foram realizados em placas de 96 orifícios de fundo chato (Petécil, SP) com duração de 72 horas<sup>3</sup>. As diluições foram preparadas a partir de soluções estoque provenientes de OMS (Genebra, Suíça), tendo sido utilizadas as seguintes concentrações: 0; 1.0; 2.0; 4.0; 6.0; 8.0; 16.0 e 32.0 x 10<sup>-8</sup>M para cloroquina e 0.5; 1.0; 2.0; 4.0; 6.0; 8.0 e 16.0 x 10<sup>-8</sup>M para mefloquina.

Com o objetivo de facilitar a leitura dos resultados observados na análise de cepas coletadas de pacientes recrudescentes, incluímos a Fig. 1 que corresponde a interpretação eletroforética para dois tipos enzimáticos de GPI e ADA.

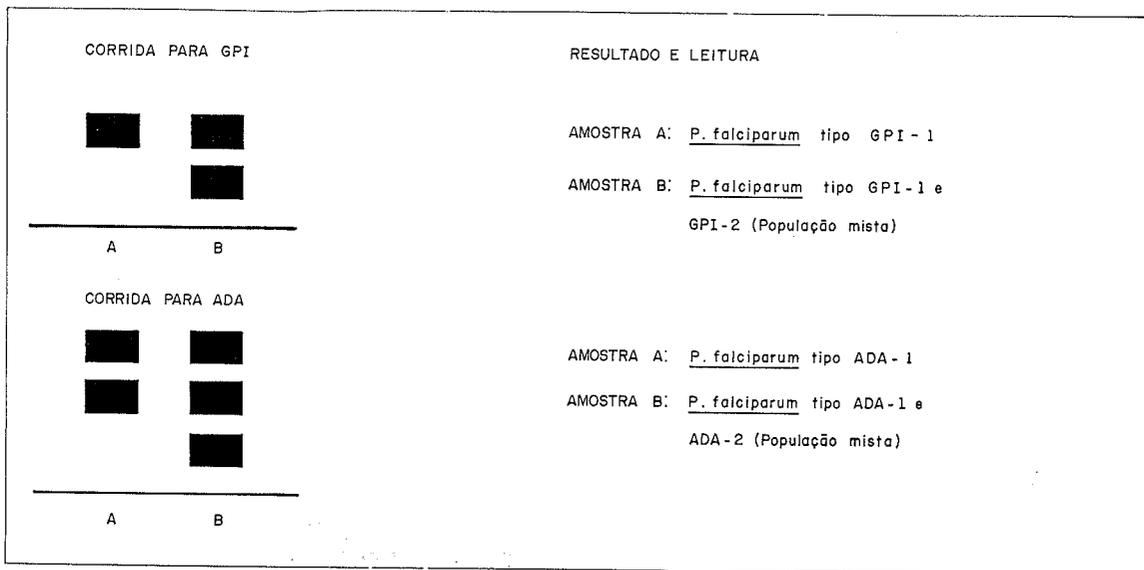
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como se pode observar na Tabela II, o paciente FRL foi o que apresentou resultados mais surpreendentes, uma vez que cada recru-

(\*) De Souza, J. M. — Comunicação pessoal

T A B E L A I

CONDIÇÕES DE ELETROFORESE		ELETROFORESE EM ACETATO DE CELULOSE		
Componentes da reação de revelação		CONDIÇÕES DA CORRIDA		
<b>ENZ: GPI — Glucose-fosfato-isomerase</b>				
Frutose-6-Phosphate (F-3627)	25 mg			
Mg C 12 (M-0250)	20 mg	Tempo:	Voltagem:	Miliamperagem:
N A D P (N-0505)	5 mg			
Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase (G-6378)	0,01 ml	20 min	160 V	2 a 3 mA
M T T (M-2128)	5 mg			
P M S (P-9625)	2 mg			
Tampão "TRIS HCL pH 8.0"	2 ml			
<b>ENZ: ADA — Adenosina deaminase</b>				
Adenosine (A-9251)	10 mg	Enzima:	Tanque	Revelação
Xanthine Oxidase (X-1875)	0,01 ml			
Nucleoside Phosphorilase (N-3003)	0,01 ml	G P I	SUPRE HEME	TRIS HCL pH 8.0
M T T (M-2128)	5 mg			
P M S (P-9625)	2 mg	A D A	SUPRE HEME	FOSFATO pH 7.5
Tampão "Phosphate pH 7.5"	2 ml			
( ) — Referências SIGMA				
Obs: As condições descritas neste quadro são para placas de acetato de celulose de 76 x 60 mm.				



CONCLUSÃO: A amostra A é constituída por parasitas idênticos quanto aos enzimas GPI e ADA, ou seja, todos sendo do tipo GPI-1, ADA-1. A amostra B é constituída por uma mistura de parasitas, podendo ser misturas de 2 ou mais tipos, como: GPI-1, ADA-1; GPI-1, ADA-2; GPI-2, ADA-1 e possivelmente também GPI-2, ADA-2.

Fig. 1 — Interpretação de resultados obtidos pela técnica de eletroforese

descência exibiu um tipo enzimático distinto ou seja, uma nova população de *P. falciparum*. Dado que o paciente esteve sempre internado, não houve qualquer possibilidade de reinfeção e, portanto, podemos supor que a população de *P. falciparum* do tipo GPI-2/ADA-2 apenas revelada na 3ª recrudescência (cepa 97/83) estava presente desde o início da infecção, inclusive na cepa original 70/83. Lamentavelmente a detecção

de uma determinada enzima pela técnica de eletroforese, quer em acetato de celulose, quer em gel de amido, requer parasitemias elevadas mesmo em cultivo; por esse motivo cremos não ter sido possível detectar estes tipos enzimáticos nas recrudescências anteriores.

O paciente (PPS) correspondente às cepas 86 e 95/83 não apresentou diferenças nos tipos

TABELA II  
Tipo enzimático e nível de sensibilidade a drogas em 3 pacientes analisados

Pacientes	Data	Cepa	Trat.	GPI	ADA	Cloroq.	Mefloq.
F.R.L.	06.07.83	10/83 Orig.	SQ/PS	NR	NR		
	21.07.83	84/83	PS	2	1	32	0,5
	02.08.83	87/83	Amod.	1	2	32	0,5
	16.08.83	97/83	ST	2	2	32	0,5
P.P.S.	29.07.83	86/83 Orig.	SQ/PS	2	2	8	0,5
	15.08.83	95/83	Amod.	2	2	32	0,5
	25.08.83	**	SQ/CT	NR	NR	NR	NR
A.P.J.	22.02.84	19/84 Orig.	CM/PS	1	2	32	2,0
	16.03.84	**	CM	NR	NR	NR	NR
	07.04.84	29/84	CM	1	2	32	2,0

\* Concentração mínima inibidora ( $\times 10^{-8}M$ )

\*\* Amostra não coletada para análise

NR Teste não realizado

\* M I C

SQ — Sulfato de quinino  
PS — Pirimetamina + Sulfadoxina  
CM — Cloridrato de mefloquina  
CT — Cloridrato de tetraciclina  
ST — Sulfametrol 0,8 g + Trimetropim 0,16 g  
Amod — Amodiaquina

enzimáticos analisados entre as cepas original e recrudescente. Entretanto, verificou-se uma alteração no nível de sensibilidade para cloroquina, onde na cepa original a concentração mínima inibidora (MIC) foi  $8 \times 10^{-8}M$ , e na amostra correspondente à 2.<sup>a</sup> recrudescente foi  $32 \times 10^{-8}M$ , apesar do paciente não ter sido tratado em nenhuma ocasião com a mencionada droga. Portanto, a medicação com sulfato de quinino/pirimetamina-sulfadoxina selecionou uma população resistente à cloroquina. Isto sugere que na população original já se encontravam parasitos com maior resistência, porém, em menor proporção. Com a ação da associação sulfato de quinino/pirimetamina-sulfadoxina, houve a eliminação de grande parte dos parasitos, havendo, entretanto, o crescimento dos mais resistentes, inclusive à cloroquina.

O terceiro paciente recrudescente estudado neste trabalho (APJ) correspondente às cepas 19/84 e 29/84, também não apresentou alterações em seus tipos enzimáticos, assim como não apresentou modificação no nível de sensibilidade para os testes realizados.

Isto é um exemplo interessante de uma recrudescente tardia motivada talvez pela subdosagem de mefloquina (devido a vômito) dado que a dose global única curou este paciente. Daí se pode presumir que combinações terapêuticas serão efetivas se ambos os medicamentos tiverem ação sobre a população de parasitas.

Apesar deste estudo ter sido feito tomando como ponto de referência o perfil enzimático e a sensibilidade à drogas, deve-se salientar que não há qualquer relação comprovada entre tipo enzimático e sensibilidade a drogas, dado que os genes que regulam a resistência e os responsáveis pelas formas enzimáticas não demonstraram até o momento prova de ligação gênica<sup>5</sup>. Entretanto, estes métodos são eficazes na caracterização precisa dos vários tipos de cepas de *P. falciparum* ocorrentes em um único paciente.

Acreditamos que o estudo de um maior número de cepas de pacientes recrudescentes seja necessário para proporcionar melhores conclusões sobre esta matéria e que se deva acentuar a importância da pesquisa em casos clínicos de pacientes recrudescentes, que darão uma melhor compreensão ao problema de resistência e dinâmica de subpopulações em um mesmo paciente.

#### SUMMARY

Characterization of *P. falciparum* strains obtained from recrudescence patients

Characterization of *Plasmodium falciparum* strains obtained from three patients interned in the Clinico-Pharmacological Testing Centre of the Barros Barreto Hospital, Belém, Pará, Brazil, was carried out using cellulose acetate electrophoresis for the two enzymes glucose phosphate isomerase EC.5.3.1.9 (GPI) and adenosine diaminase EC.3.5.4.4 (ADA) and sensibility

tests for the two antimalarial drugs, chloroquin and mefloquine. This characterization showed an enzyme variant in one of the patients, and a modification in the chloroquine sensibility level in another; not only in the strains from the original infections, but also in those from each of the relapses.

#### AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio da Fundação SESP/M.S., CNPq, FINEP, HBB/SUCAM e com o auxílio da UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Agradecemos, também, à Dra. Salma Oliveira pelo apoio técnico prestado; à Dra. Fátima Assis pela revisão do manuscrito e a Sra. Margarete Garcia pela elaboração das tabelas.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. COUTO, A. A.; ROSÁRIO, V. E. & WALLIKER, D. — Análise enzimática de 56 amostras de *P. falciparum* da Bacia Amazônica. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.* 35: 11-19, 1983.
2. ROSÁRIO, V. E. — Caracterização de cepas de *P. falciparum* do Brasil. *Rev. FSESP* 28: 115-136, 1983.
3. SANTOS, M. V. & ROSÁRIO, V. E. — Testes de sensibilidade *in vitro* de amostras de *P. falciparum* da Bacia Amazônica. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.* 35: 18-21, 1983.
4. SOUZA, J. M. — A phase II clinical trial of Mefloquine in Brazilian male subjects. *Bull. WHO* 61: 815-820, 1983.
5. THAITHONG, S. — Biological characterization of malaria parasites by means of enzyme identification on pattern analysis. *WHO/MAL* 935: 1-6, 1981.
6. TRAGER, W. & JENSEN, J. B. — Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193: 674-675, 1976.

Recebido para publicação em 30/11/1984.