

ESTUDOS "IN VITRO" DOS NÍVEIS DE RESISTÊNCIA DO PLASMODIUM FALCIPARUM A DROGAS, DE 1983 A 1986

M. A. V. SANTOS (1), A. A. COUTO (1), S. G. OLIVEIRA (1) & V. E. ROSARIO (2)

RESUMO

Foram realizados 171 testes de sensibilidade (microtécnica) com cepas de *Plasmodium falciparum* da Região Amazônica brasileira para cloroquina, mefloquina, amodiaquina e quinino. Os testes tiveram duração de 24 horas com as drogas preparadas na hora da realização de cada teste. Os resultados mostraram elevada resistência a cloroquina (83%) e sensibilidade em quase a totalidade das amostras testadas para mefloquina (97,7%). Para amodiaquina e quinino observou-se sensibilidade em 51,0% e 56,5% das cepas, respectivamente.

Este estudo demonstra a emergência de um possível foco de resistência do *Plasmodium falciparum* a mefloquina, em Tucuruí.

UNITERMOS: Malária; *P. falciparum*; Resistência; Mefloquina.

INTRODUÇÃO

Os problemas de saúde existentes na Amazônia, apresentam a malária como líder de uma lista de doenças infecciosas parasitárias que atinge o homem da região em todo seu potencial produtivo. A epidemiologia desta doença é influenciada pelo grande número de pessoas que circulam na região, decorrentes da implantação de projetos agropecuários, agroindustriais e de mineração^{1,10,13,19}.

O grave problema da expansão da malária, associada ao aumento de casos de resistência dos plasmódios aos quimioterápicos utilizados nos esquemas clássicos de tratamento, tem sido frequentemente referido em vários trabalhos^{9,10,13,16,19,22}.

Diante deste quadro, vários grupos de pesquisadores, com o objetivo de uma avaliação da sensibilidade e resistência do *Plasmodium falciparum*, desenvolveram estudos "in vivo" e "in vitro", comprovando a existência de cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes a

alguns antimaláricos como amodiaquina, quinino, pirimetamina + sulfadoxina ou associação destes, e, principalmente, à cloroquina^{1,3,4,6,18,23,24}.

A existência de cepas resistentes às drogas usuais, em muitas partes do mundo, vem estimulando a pesquisa para a obtenção de novas drogas antimaláricas mais eficazes contra as cepas resistentes^{2,8,12,26}. Por outro lado, estudos são também desenvolvidos no sentido da utilização de combinações de drogas alternativas para a prevenção e tratamento da malária^{14,15}.

O Programa Malária do Instituto Evandro Chagas — FSESP, desenvolvendo estudos de caracterização do *Plasmodium falciparum*, realizou no período de 1983 a 1986, microtestes de sensibilidade a drogas em cepas coletadas em diversas localidades da Região Amazônica brasileira, com base na técnica descrita por

(1) Instituto Evandro Chagas (FSESP) — Programa Malária.
Av. Almirante Barroso, 492. Caixa Postal 621. CEP 66050 Belém, PA., Brasil.
(2) Biomedical Research Institute, Rockville, Maryland, USA.

de difícil acesso e distantes do laboratório em Belém (PA), as mostras após colhidas, foram eriopreservadas em Dimetilsulfóxido (DMSO) a 20%, para posterior processamento (descongelamento e cultivo contínuo) para a realização dos microtestes.

Para a realização do microteste, a parasitemia adequada é de 0,1 a 1,0%. Em presença de parasitemias elevadas, procedeu-se à diluição utilizando-se hemácias lavadas (tipo "0"), enquanto que para parasitemias mais baixas, realizou-se o cultivo contínuo "in vitro", de acordo com a técnica de TRAGER & JENSEN, até obtenção da parasitemia ideal²⁵.

Das 171 cepas testadas, 145 foram mantidas em cultivo por períodos que variaram entre 3-15 dias, e as 26 restantes foram testadas logo após a coleta e chegada do sangue dos pacientes ao laboratório, sendo a origem da infecção e história clínica por vezes descritas de acordo com a informação verbal do paciente. O cultivo contínuo não apresentou marcante multiplicidade morfológica das formas eritrocitárias, ou seja, a presença simultânea de anéis, trofozoitos e esquizontes, pelo que os microtestes foram realizados com as amostras contendo predominância de anéis.

Todas as amostras de sangue foram lavadas em meio RPMI-1640 (GIBCO), adicionado de bicarbonato de sódio a 10%. Após 2 lavagens (3.000 r.p.m./5 min), o sangue foi diluído em igual volume de meio de cultivo completo: 88 ml de RPMI-1640 (GIBCO) + 2 ml de bicarbonato de sódio e soro humano "A" a 10%, utilizou-se microplacas de titulação de polietileno (Petécil), de fundo raso, colocando-se 0,01 ml da suspensão de sangue nos orifícios da placa, aos quais adicionou-se 0,1 ml do meio completo RPMI com diversas concentrações da droga, tal como se segue:

- 1) 0 — 1,0 — 2,0 — 4,0 — 6,0 — 8,0 — 16,0 — $32 \times 10^{-8}M$ (Difosfato de Cloroquina)
- 2) 0 — 0,5 — 1,0 — 2,0 — 4,0 — 6,0 — 8,0 — $16,0 \times 10^{-8}M$ (Mefloquina)
- 3) 0 — 0,25 — 0,5 — 1,0 — 2,0 — 4,0 — 8,0 — $16,0 \times 10^{-8}M$ (Amodiaquina)
- 4) 0 — 3,9 — 7,8 — 15,7 — 31,25 — 62,5 — 125 — $250 \times 10^{-8}M$ (Sulfato de Quinino)

As amostras foram preparadas a partir de soluções "stock" (OMS-Geneve) e as dosagens foram preparadas no momento em que se iniciou o teste. Em trabalho anterior²⁷, foram utilizadas cepas controle testadas pelo mesmo método no Instituto Animal Genetics, Edinburgh, Grã-Bretanha. Para os restantes testes foram usadas cepas controles padronizadas pelo Programa Malária do Instituto Evandro Chagas, como IEC-50/83 e IEC-132/83.

Nem todas as amostras foram submetidas a testes com todas as drogas porque, inicialmente, este trabalho consistiu na análise de testes realizados apenas com cloroquina e mefloquina.

RESULTADOS

Na tabela I apresentamos o número total de amostras testadas por localidade e ano da coleta. Nas tabelas II e III os resultados dos microtestes estão distribuídos na forma de MIC (Concentração Mínima Inibidora) por ano e nas diferentes dosagens testadas para cada droga:

T A B E L A I

Número de microtestes realizados por ano e por localidade de origem das cepas

Localidade	1983	1984	1985	1986	Total
Itaituba (PA)	9	16	6	5	36
Macapá (AP)	4	7	6	9	26
Paragominas (PA)	15	2	5	—	22
Tucuruí (PA)	8	6	7	—	21
Acará (PA)	—	11	3	1	15
Ariquemes (RO)	—	5	8	—	13
Marabá (PA)	2	4	2	4	12
Mojú (PA)	2	2	1	—	5
Marajó (PA)	1	—	1	—	2
Imperatriz (MA)	—	—	1	—	1
Pinheiros (MA)	1	—	—	—	1
Humaitá (AM)	—	—	2	—	2
Conc. do Araguaia (PA)	—	—	—	2	2
Santarém (PA)	1	—	—	—	1
Jumas (AM)	1	—	—	—	1
Tailândia (PA)	1	—	—	—	1
Cametá (PA)	—	1	—	—	1
Tomé-Açu (PA)	—	1	—	—	1
Igarapé-Miri (PA)	—	1	—	—	1
Altamira (PA)	—	—	1	—	1
Rio Jacundá (PA)	—	—	1	—	1
*	4	1	—	—	5
Total	49	57	44	21	171

* Cepas cujos pacientes não souberam informar o local de infecção, mas afirmam que não saíram do Estado do Pará.

T A B E L A II

Caracterização de cepas de *P. falciparum* através de testes de sensibilidade

Distribuição dos resultados de março/83 a junho/86.

Drogas	MIC*	1983	1984	1985	1986	Total de amostras inibidas
Cloroquina	1	0	0	0	0	0
x 10 ⁻⁸ M						
	2	0	0	0	0	0
	4	1	0	1	0	2
	6	11	8	5	3	27
	8	6	12	8	3	29
	16	12	16	15	10	53
	32	19	21	15	5	60
Total de Cepas		49	57	44	21	171
Mefloquina	0,5	30	6	9	2	47
x 10 ⁻⁸ M						
	1	11	26	22	6	65
	2	8	14	4	10	36
	4	0	7	4	3	14
	6	0	1	2	0	3
	8	0	1	3	0	4
	16	0	0	0	0	0
Total de Cepas		49	55**	44	21	169
Amodiaquina	0,25	1	0	3	0	4
x 10 ⁻⁸ M						
	0,5	0	4	5	2	11
	1	3	8	12	4	27
	2	1	14	8	4	27
	4	4	20	6	7	37
	8	7	6	8	3	24
	16	2	5	2	1	10
Total de Cepas		18	57	44	21	140
Quinino	3,9	0	0	0	0	0
x 10 ⁻⁸ M						
	7,8	0	0	2	0	2
	15,6	1	11	9	2	23
	31,25	9	24	16	5	54
	62,5	6	17	10	9	42
	125	2	1	6	5	14
	250	0	4	1	0	5
Total de Cepas		18	57	44	21	140

* Concentração Mínima Inibidora da droga, capaz de inibir o crescimento do parasito.

** Dois testes de Mefloquina foram perdidos por deficiência da coloração das lâminas.

a) **Cloroquina:** Das 171 amostras testadas 142 foram inibidas acima de 8x10⁻⁸M, sendo que apenas 2 foram inibidas a 4x10⁻⁸M (1 de Macapá e 1 de Ariquemes-RO) e 27 foram inibidas a 6x10⁻⁸M (7 de Paragominas-PA, 4 de Itaituba-PA, 3 de Tucuruí-PA, 3 de Ariquemes-RO, 2 de Acará-PA, 2 de Macapá-AP, 1 de Mojú-PA, 1 de Santarém-PA, 1 de Tailândia-PA, 1 de Marabá-PA, 1 de Imperatriz-MA e 1 de Pinheiros-MA.).

Portanto, para cloroquina, detectou-se 83% de resistência "in vitro".

b) **Mefloquina:** Das 169 amostras testadas, e no mesmo período de 1983-1986, 142 foram inibidas a doses até 4x10⁻⁸M. Acima desta dosagem 3 amostras (Tucuruí, Marajó e Acará-PA) foram inibidas a 6x10⁻⁸M e 4 amostras (todas de Tucuruí-PA) foram inibidas a 8x10⁻⁸M, num total de 7 exibindo resistência "in vitro" a esta droga.

c) **Amodiaquina e Quinino:** Grande variação na resposta aos testes foi observada para ambas as drogas. Das 10 amostras inibidas à mais elevada dose (16x10⁻⁸M) de amodiaquina, 4 eram provenientes de Itaituba, 4 de Tucuruí-PA e 2 de Macapá-AP. Para quinino 5 amostras (3 de Tucuruí, 1 de Itaituba-PA e 1 de Ariquemes-RO) foram inibidas apenas na dose mais elevada (250x10⁻⁸M), mas também de Itaituba e Tucuruí-PA encontram-se amostras sensíveis à doses baixas (7,8x10⁻⁸M).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

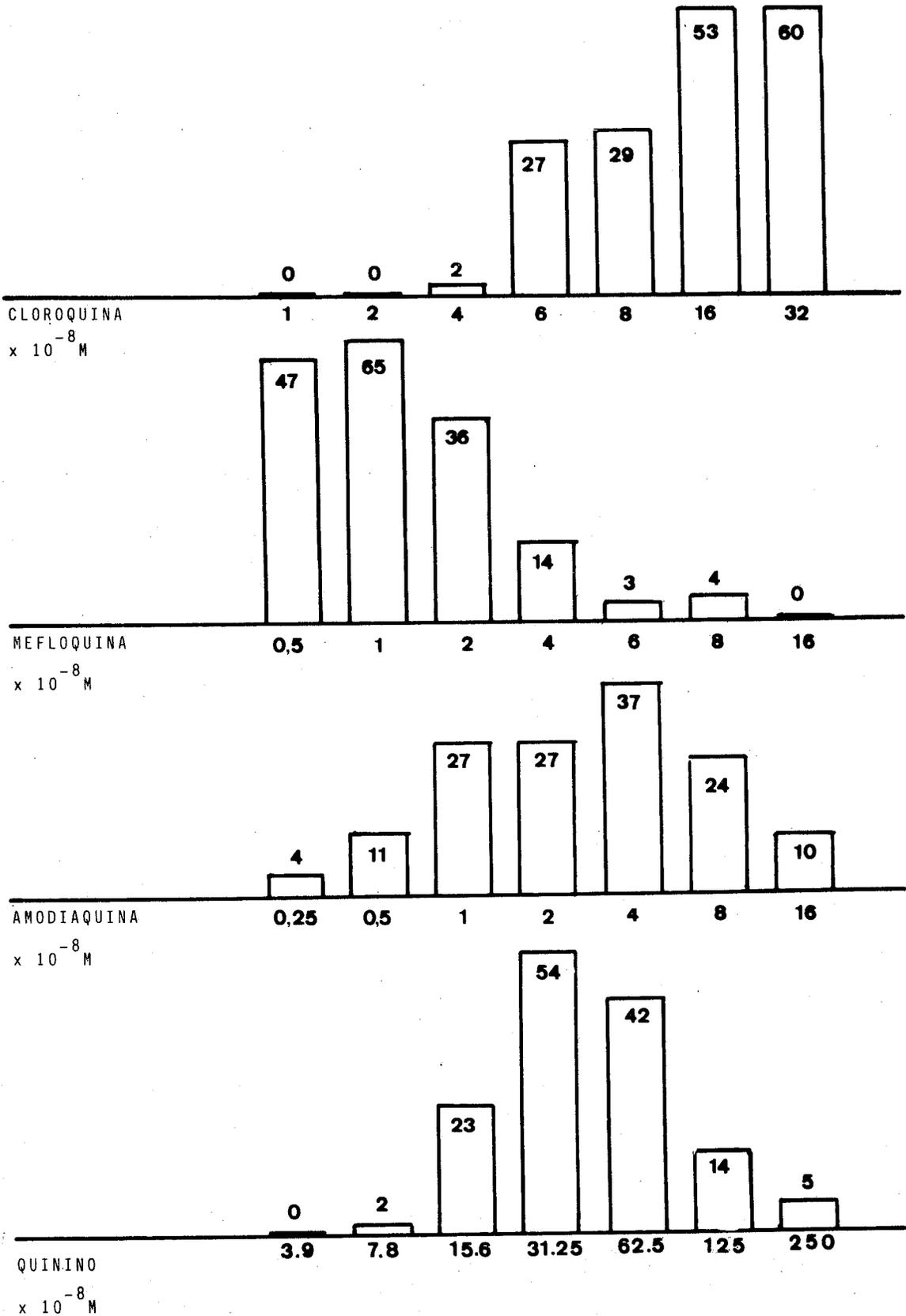
Estes estudos efetuados no período de 1983-1986 cobriram 20 localidades, sendo a maioria no Estado do Pará e as restantes em Macapá (Território Federal do Amapá), Humaitá (Estado do Amazonas) e Ariquemes (Estado de Rondônia). O número de amostras coletadas foi variado e irregular. Por exemplo: de apenas 3 localidades, Itaituba, Macapá e Marabá foi coletado material continuamente, num total, respectivamente, de 36, 26 e 12 amostras.

Em grande número de localidades apenas um reduzido número de amostras foi analisado, mas nenhuma apresentou elevada resistência a qualquer das drogas testadas. Apesar do número de amostras ter sido reduzido, seria sempre de interesse a observação de uma única amostra, com elevada resistência, que pudesse indicar ser aquela localidade possível foco de parasitas não susceptíveis a dada droga.

Sobre todas as cepas testadas, observamos que sempre que uma cepa apresentou resistência ao quinino ou apresentou resistência a amodiaquina, esta mesma cepa apresentou também resistência a cloroquina. Porém, nem

TABELA III

Distribuição gráfica de 171 microtestes realizados nos anos de 1983, 1984, 1985 e 1986, para quatro drogas



sempre para ambos os casos o inverso foi verdadeiro.

Em Itaituba e Tucuruí-PA, encontrou-se o maior número de amostras mais resistentes às drogas testadas, isto é, apenas inibidas por doses mais elevadas utilizadas nos testes. A existência de focos de resistência à mefloquina em Tucuruí-PA, numa região de elevado movimento migratório, e onde existe apenas um vetor de transmissão (ARRUDA et al 1986), é causa de preocupação, sobretudo porque esta droga não é ainda de uso generalizado no país; neste caso atuaria como agente seletivo de disseminação de resistência, com dramáticas consequências.

Em relação a mefloquina, outros autores indicaram respostas distintas "in vivo", como SOUZA (1983), cujos pacientes responderam com sucesso ao tratamento, BOULOS et al. (1985) e DI SANTI et al. (1986) que mencionam fracasso no uso desta droga. O intervalo de tempo na obtenção de uns e outros resultados, bem como a distinta origem dos pacientes pode justificar esta variação. Grande parte dos pacientes envolvidos no Projeto Mefloquina (SOUZA, 1983), eram provenientes de Paragominas-PA, enquanto que os trabalhos realizados por BOULOS et al. e DI SANTI et al., eram de Rondônia e Amazonas, respectivamente 7,8,21.

Em testes "in vitro" com a mefloquina e outras drogas, elevados níveis de resistência têm sido observados (ALECRIM et al., 1986) 1,2,3,4.

Os microtestes devem ser utilizados para estudos longitudinais que permitam, para uma maior amostragem, detectar se nos períodos de menor transmissão existe, por exemplo, relação com presença de parasitas de maior ou menor resistência a alguma droga, ou se, no caso de Capanema, onde *Plasmodium falciparum* pode ser transmitido por *A. oswaldoi*, (ARRUDA et al., 1986), existe um padrão de resistência e mesmo caracterização dos parasitas, sendo estes, diferentes do resto da Região Amazônica. A longo prazo, e caso a cloroquina deixe de ser utilizada na região, estes microtestes permitirão avaliar uma diminuição do nível de resistência a esta droga como foi descrito para o Sudoeste Asiático 11,20.

O elevado movimento migratório identificado nas áreas de desenvolvimento do país, sobretudo na região acima citada, apenas favorece a expansão da resistência às drogas na presença do vetor.

Torna-se importante estudos mais regulares e periódicos em um número mais reduzido de localidades distintas para se compreender melhor o problema de instalação e expansão de resistência na região amazônica.

SUMMARY

"In vitro" studies on the levels of *Plasmodium falciparum* drug resistance from 1983 to 1986.

Drug resistance tests were performed with 171 strains of *P. falciparum* obtained from the Amazon Region, using chloroquine, mefloquine, amodiaquine and quinine. Tests lasted about 24 hours and the drug solutions were prepared just before use. Results show high percentage of resistance to chloroquine (83%) whereas nearly all strains were shown to be sensitive to mefloquine (97.7%). For both amodiaquine and quinine sensitivities were of 51.0% and 56.5% respectively.

The present study demonstrates that resistance to mefloquine may be starting in Tucuruí, Pará.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com o apoio do CNPq, FINEP, SUCAM e OMS-TDR. Agradecemos também ao Dr. José Maria de Souza — Projeto Mefloquina — Hospital Barros Barreto — Belém (PA), pelo envio de cepas de algumas localidades do Estado do Pará.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALECRIM, M. G. — Estudo da resistência do *P. falciparum* às drogas antimaláricas "in vitro" e "in vivo" na Amazônia. Brasília, 1981. (Dissertação de mestrado — Universidade de Brasília).
2. ALECRIM, M. G.; ALECRIM, W. D.; ALBUQUERQUE, B. C. & SILVA, E. B. — Fracasso no tratamento da malária (*P. falciparum*) com novas drogas antimaláricas. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 22., Belo Horizonte, 1986. Programa e resumos. Belo Horizonte, Associação Médica de Minas Gerais, 1986. p. 91.

3. ALECRIM, W. D.; ROBLES, C. R. Q.; REYS, S. & NASCIMENTO, A. P. — Testes "in vivo" de resistência do *P. falciparum* à cloroquina, amodiaquina e sulfadoxina + pirimetamina na Amazônia. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 22., Belo Horizonte, 1986. Programa e resumos. Belo Horizonte, Associação Médica de Minas Gerais, 1986. p. 90.
4. ALECRIM, W. D.; ALECRIM, M. G.; ALEQUERQUE, B. C. & SAMPAIO, G. — Testes "in vivo" da resistência do *P. falciparum* ao quinino, sulfadoxina + pirimetamina e sulfadoxina + pirimetamina + amodiaquina. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 22., Belo Horizonte, 1986. Programa e resumos. Belo Horizonte, Associação Médica de Minas Gerais, 1986. p. 89.
5. ARRUDA, M. E.; CARVALHO, M.; NUSSENZWEIG, R.; MARACIC, M.; FERREIRA, A. W. & COCHRANE, A. H. — Potencial vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in Northern Brazil identified by immunoassay. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 35: 873-881, 1986.
6. BOULOS, M.; DI SANTI, S. M.; NEVES, V. L. F. C.; BARATA, L. C. B. & DUTRA, A. P. — Correlação "in vivo" — "in vitro" da resposta do *P. falciparum* ao quinino. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 22., Belo Horizonte, 1986. Programa e resumos. Belo Horizonte, Associação Médica de Minas Gerais, 1986. p. 89.
7. BOULOS, M.; SEGURADO, A. A. C.; DUTRA, A. P.; SHIROMA, M. & FERREIRA, I. — Resistência do *P. falciparum* à associação mefloquina + sulfadoxina + pirimetamina. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 22., Belo Horizonte, 1986. Programa e resumos. Belo Horizonte, Associação Médica de Minas Gerais, 1986. p. 88.
8. DI SANTI, S. M.; BOULOS, M.; NEVES, V. L. F. C.; DUTRA, A. P. & BARATA, L. C. B. — Aparecimento e proliferação de resistência do *P. falciparum* à mefloquina. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 22., Belo Horizonte, 1986. Programa e resumos. Belo Horizonte, Associação Médica de Minas Gerais, 1986. p. 89.
9. DI SANTI, S. M.; NEVES, V. L. F. C.; BOULOS, M.; DUTRA, A. P. & BARATA, L. C. B. — Avaliação da resistência do *P. falciparum* à cloroquina na Amazônia brasileira. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 22., Belo Horizonte, 1986. Programa e resumos. Belo Horizonte, Associação Médica de Minas Gerais, 1986. p. 88.
10. FERRARONI, J. J.; SPEER, C. A.; HAYES, J. & SUZUKI, M. — Prevalence of chloroquine resistant *falciparum* malaria in Brazilian Amazon. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 30: 526-530, 1980.
11. JACQUIER, P.; DRUILHE, P.; FELIX, H.; DIQUET, B. D. & TIBO, L. — Is *Plasmodium falciparum* resistance to chloroquine reversible in absence of drug pressure? *Lancet*, 2: 270-271, 1985.
12. LOPEZ-ANTUÑANO, F. J. & WERNSDORFER, W. H. — In vitro response of chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* to mefloquine. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 57: 663-665, 1979..
13. MARQUES, A. C. — Situação atual da malária no Brasil. In: SEMINÁRIO AMAZÔNICO DE MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, 13., Belém (PA), 1986. Programa e resumos. (In press).
14. REYES, S. — Infecções maláricas por *Plasmodium falciparum* resistentes ao tratamento com cloroquina. Situação no Brasil (1960-1981). *Rev. bras. Malac.*, 33: 109-130, 1981.
15. PETERS, W. — Prevention of drug resistance in rodent malaria by the use of drug mixtures. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 51: 379-383, 1974.
16. PETERS, W. — Drug combinations. In: PETERS, W. & RICHARDS, W. H. G., ed. — *Antimalarial drug II. Current antimalarials and new drug developments*. Berlin, Springer-Verlag, 1984. p. 225-236.
17. RIECKMANN, K. H.; SAX, L. J.; CAMPBELL, G. H. & UREMA, J. E. — Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An "in vitro" microtechnique. *Lancet*, 1: 22-23, 1978.
18. RODRIGUES, D. P. — Casos de malária por *Plasmodium falciparum* resistentes ao tratamento pela cloroquina. *Arq. Hig. Saúde públ.*, 26: 231-235, 1961.
19. ROSÁRIO, V. E. — Caracterização de cepas de *Plasmodium falciparum* do Brasil. *Rev. Fundação SESP*, 28: 115-136, 1983.
20. SILVA, J. R.; LOPES, P. F. A.; FERREIRA, L. F. F.; MORTEO, R. & NAVEIRA, J. B. — Resistência do *Plasmodium falciparum* à ação da cloroquina. *Hospital*, (Rio de J.), 60: 581-594, 1961.
21. SOUZA, J. M. — A phase II clinical trial of mefloquine in Brazilian male subjects. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 61: 815-829, 1983.
22. THAITHONG, S. — In: *International Congress of Infection and Parasitology Diseases*, 9., Munich, 1986. Abstract 957.
23. THAITHONG, S. — Clones of different sensitivities in drug-resistant isolates of *Plasmodium falciparum*. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 61: 709-716, 1984.
24. THAITHONG, S.; BEALE, G. H. & CHUMTMONGKONKUL, M. — Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to five drugs: a "in vitro" study of isolates mainly from Thailand. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.* 77: 228-231, 1982.

SANTOS, M. A. V.; COUTO, A. A.; OLIVEIRA, S. G. & ROSÁRIO, V. E. — Estudos "in vitro" dos níveis de resistência do *Plasmodium falciparum* a drogas, de 1983 a 1986. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 29:346-353, 1986.

25. TRAGER, W. & JENSEN, J. B. — Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193: 673-675, 1976.
26. WERNSDORFER, W. H. & KOUZNESOV, R. L. — Drug resistant malaria occurrence control and surveillance. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 58: 341-352, 1980.
27. VASCONCELOS, M. A. & ROSÁRIO, V. E. — Testes de sensibilidade "in vitro" de amostras de *Plasmodium falciparum* da bacia amazônica (Brasil). *Rev. bras. Maler.*, 35: 21-28, 1983.

Recebido para publicação em 20/6/1987.