

SENSIBILIDADE DAS FORMAS ERITROCÍTICAS DO PLASMODIUM
FALCIPARUM A CLOROQUINA, DETECTADA PELO MÉTODO IN VITRO,
EM DIVERSAS LOCALIDADES DA AMAZÔNIA BRASILEIRA (*)

José J. Ferraroni (**)
Heitor V. Dourado (***)

Summary

The prevalence of chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria isolated from 39 individuals living in 16 localities in the Brazilian Amazon was determined. Defibrinated blood samples from each patient were placed in vials containing a 0.5% solution of glucose with or without chloroquine and incubated in a constant temperature chamber at 39-40°C. After a 24 h incubation period, *P. falciparum* trophozoites developed to schizonts in control vials (without chloroquine) and in 100%; 87.1%; 28.2%, 15.3% and 7.6% of culture samples containing 0.5; 1.0; 2.0; 3.0 and 4.0 nanomols of chloroquine/ml of blood, respectively. Resistant *P. falciparum* strains were found in all locations studied indicating a broad distribution of chloroquine resistant falciparum malaria in the Amazon basin.

Resumo

Determinou-se a prevalência de cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina em 39 amostras de indivíduos vivendo em 16 localidades da Amazônia brasileira. A amostra de sangue obtida de cada paciente foi defibrinada, colocada em pequenos vidros contendo uma solução de glicose a 0,5% com ou sem cloroquina e incubada durante 24 horas em estufa a temperatura constante de 39-40°C sem agitação. A sensibilidade do parasita in vitro para cinco diferentes concentrações de cloroquina foi determinada. Após 24 horas de incubação os trofozoítos de *P. falciparum* evoluíram para esquizontes em praticamente todas as culturas controles (sem presença de droga) assim como em

100%; 87,1%; 28,2%; 15,3% e 7,6%, respectivamente, nas culturas contendo 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 nanomoles de cloroquina/ml de sangue. Cepas de *P. falciparum* resistentes foram encontradas em todas as 16 localidades estudadas, indicando que a resistência a cloroquina pelo *P. falciparum* está largamente distribuída na bacia amazônica.

INTRODUÇÃO

Na ausência de uma vacina satisfatória para malária humana, a quimioprevenção e quimioterapia são os únicos meios efetivos no combate à infecção por plasmodios. Conseqüentemente, o desenvolvimento de formas resistentes dos parasitas da malária aos quimioterápicos vem oferecendo um sério obstáculo ao combate e controle desta protozoose.

A resistência do *Plasmodium falciparum* às cloroquinas foi mencionada pela primeira vez em 1960 na Venezuela (Maberti, 1960). Todavia foram Moore & Lanier, no ano seguinte, que descreveram o primeiro insucesso do tratamento de um caso de malária falciparum do Vale da Magdalena na Colômbia (Moore & Lanier, 1961). Posteriormente, cepas resistentes de *P. falciparum* foram descritas em praticamente todas as áreas malarígenas do globo, principalmente na América do Sul (Box et al., 1963; Rieckmann et al., 1971;

(*) Pesquisa patrocinada em parte pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq.

(**) Alguns dos dados aqui apresentados foram incluídos num trabalho mais amplo sobre resistência a cloroquina e esta publicado em Inglês no Am. J. Trop. Med. Hyg., 33: 526-530, 1981.

(***) Universidade do Amazonas/CNPq.

(****) Universidade do Amazonas/Instituto de Medicina Tropical de Manaus.

Ferraroni *et al.*, 1977; Ferraroni & Hayes, 1979a); b) na Ásia (Contacos *et al.*, 1963; Clyde *et al.*, 1971) e recentemente na África (Simpson & Williams, 1978; Wolfe & Hudlerton, 1979; Nguyen-Dinh & Tra-ger, 1980).

Resistência do *P. falciparum* a outras drogas também foi assinalada, e mesmo resistência à combinações de drogas têm sido descritas (Rumans *et al.*, 1979; Darlow *et al.*, 1980; Markwaldes & Meyer 1982). Recentemente, foi descrita uma cepa de *P. falciparum* que não respondeu ao tratamento com cinco drogas antimaláricas simultaneamente (Ferraroni *et al.*, 1983). Mesmo as novas drogas antimaláricas sintetizadas mais recentemente, como a mefloquina (Trenholme *et al.*, 1975), têm evidenciado que o fenômeno da resistência irá ocorrer da mesma maneira que nas drogas anteriormente citadas, mesmo porque, já foi descrita resistência do *Plasmodium berghei* à mefloquina (Richle & Peters, 1980).

Em estudos preliminares tivemos a oportunidade de verificar que a prevalência de cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina é relativamente alta no Estado do Amazonas, em torno de 80% (Ferraroni *et al.*, 1977).

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na cidade de Manaus, Amazonas, nos anos de 1977-78. O sangue infectado foi obtido de pacientes portadores de *P. falciparum*, atendidos no ambulatório do Hospital de Moléstias Tropicais de Manaus. As 48 amostras foram escolhidas ao acaso, e somente pacientes com alta parasitemia e que nos informavam não haver ingerido nenhuma medicação nos prévios 15 dias, fizeram parte do estudo.

O método usado para a detecção de sensibilidade do parasita à cloroquina *in vitro*, foi baseado naquele descrito por Rieckmann *et al.* (1968), o qual envolve o seguinte: (1) Uma amostra de sangue

venoso (aproximadamente 12 ml) era obtido por punção venosa do paciente infectado com *P. falciparum*. Um esfregaço de sangue em lâmina era realizado neste momento, para verificar a parasitemia e esta lâmina servia de controle; (2). O sangue era transferido imediatamente para um frasco de Erlenmeyer de 25,0 ml de capacidade contendo no interior esferas de vidro de 4 mm de diâmetro; (3) Procedia-se a defiblinação do sangue executando movimentos de rotação do frasco por um período de 5-10 minutos; (4) Aliquotas de sangue de 1,0 ml eram colocadas em frascos de vidro de 5 ml de capacidade, com tampa de borracha. Estes frascos eram previamente preparados e continham 5 mg de glicose (glicose hipertônica a 50%, laboratório de Braun, R.J.) e dicloridrato de cloroquina, (aralen, Laboratório Winthrop, R.J.), nas seguintes concentrações, 0,5 - 1,0 - 2,0 - 3,0 e 4,0 nanomoles da droga (1,0 nmol = 0,320 µg de cloroquina base); (5) os frascos eram agitados com movimentos brandos para homogeneização da droga com os constituintes sanguíneos e colocados em estufa por um período de 24 horas a 39-40°C.; (6) Após a incubação os frascos eram agitados levemente, para ressuspender as hemáceas no plasma. Esfregaço e gota espessa de sangue eram preparados do controle e de cada diluição da droga, os quais eram corados pelo método de Giemsa, de acordo com os padrões da Organização Mundial de Saúde (1975), e observados a luz de microscópio comum com aumento de 1000 X.

A maturação do parasita *in vitro* é inibida pela ação da cloroquina. A extensão dessa inibição poder ser comparada com o grau de maturação nas amostras controles e nas amostras contendo as diferentes concentrações da droga.

Rieckmann *et al.* (1968) mostraram que a percentagem de trofozoitos que evoluíram para esquizontes contendo mais de dois núcleos fornecem um ponto

básico para verificação da manutenção do parasita, o qual pode ser usado para diferenciar as cepas sensíveis das resistentes. Os resultados são baseados na percentagem de parasitas que passam (evoluem) de trofozoítos para esquizontes, quando verificadas em preparações coradas e observadas ao microscópio comum. O número de esquizontes é contado nas lâminas contendo as diversas diluições da droga, e comparado com o número obtido nos controles, sendo o resultado final expresso em percentagem ou número de parasitas em cada amostra. É usual contar-se o número de esquizontes desenvolvidos em 200 parasitas por lâmina.

As amostras foram obtidas das seguintes localidades segundo a informação dos pacientes: BR-174 (Km 300, 400 e 700), Altamira, Barcelos, Boa Vista, Boca do Acre, Coari, Cruzeiro do Sul, Humaitá, Lábrea, Manacapuru, Marabá, Maués, Porto Velho e Rio Branco (Tabela 2).

RESULTADOS

Com raras exceções, todas os parasitas na forma assexuada, antes da incubação, apresentavam-se na forma de trofozoítos. Durante a incubação das amostras de sangue controles, o número total de parasitas não sofreu diferenças significativas, tendo, as formas assexuadas, após a incubação se desenvolvido em esquizontes, de aparência normal.

A percentagem dos parasitas assexuados que sofreram maturação para esquizontes, contendo mais de dois núcleos, foi baseada como ponto de separação e indicação para a contagem quantitativa e maturidade dos parasitas. Quando trofozoítos jovens apresentavam-se em grande número, antes da incubação, eles geralmente se desenvolviam para trofozoítos maduros nas amostras controles. O aparecimento de esquizontes estava usualmente correlacionado com a presença inicial de trofozoítos maduros.

A figura 1 mostra as localidades de origem das amostras e/ou o local onde

supostamente o paciente foi infectado. A tabela 1 enfoca, em detalhe, o comportamento das 39 amostras resistentes às cloroquinas, com o número total e percentagens de parasitas na forma assexuada e nas diferentes concentrações da droga. A tabela 2 mostra o número e percentagem por sexo dos pacientes portadores de cepas de *P. falciparum* resistentes e as respectivas localidades na amazônia brasileira. O número de parasitas na forma assexuada, antes da incubação variou de 1.900 a 37.100 por ml de sangue. Das 48 amostras de *P. falciparum* examinadas para resistência a cloroquina 39 mostraram-se resistentes e 9 sensíveis a ação da droga, de acordo com a definição estabelecida por Rieckmann (1980).

Verificou-se que uma grande percentagem dos pacientes apresentaram infecções resistentes às concentrações iguais ou superiores a 0,5 nmol (87,1%) e apenas 7,6% foram resistentes as concentrações de 4,0 nmol de cloroquina/ml de sangue. As localidades próximas as estradas BR-319 apresentaram uma maior percentagem de infecções por cepas resistentes (Fig. 1 e Tabela 2). O fato de que o maior número de infecções tenha ocorrido em pacientes do sexo masculino, embora a escolha tenha sido ao acaso, é discutido com detalhe em Ferraroni & Hayes, (1979).

Todas as amostras obtidas da BR-174, Km 300 e 700, Altamira, Boa Vista, Coari, Cruzeiro do Sul, Maués e Porto Velho foram resistentes (Tabela 2).

DISCUSSÃO

A resistência a drogas pelos parasitas da malária pode ser determinada experimentalmente por métodos *in vivo* e *in vitro*. Os testes *in vitro*, provavelmente são mais seguros na detecção de cepas de parasitas resistentes, uma vez que não apresentam certas dificuldades encontradas nos testes *in vivo*.

Estas dificuldades podem ser expressadas por: problemas de absorção da

droga, infecções concomitantes com diferentes espécies ou mesmo cepas de plasmodídeos, variabilidade das respostas imunes do paciente frente ao protozoário, concentração crítica da droga no plasma. Recentemente a macrotécnica foi substituída por uma microtécnica implementada por Rieckmann (1978).

A maioria dos estudos sobre resistência de *P. falciparum* às cloroquinas na

Amazônia tem sido descritos utilizando o teste *in vivo*. Três estudos com pacientes do Estado do Amazonas, Mato Grosso e Território Federal de Roraima (Ferraroni *et al.*, 1977; Rieckmann & Lopez-Antunano, 1971; Lopez-Antunano & Wernsdorfer, 1979) foram realizados com o teste *in vitro*.

Os estudos realizados em Mato Grosso (Rieckmann & Lopez-Antunano,

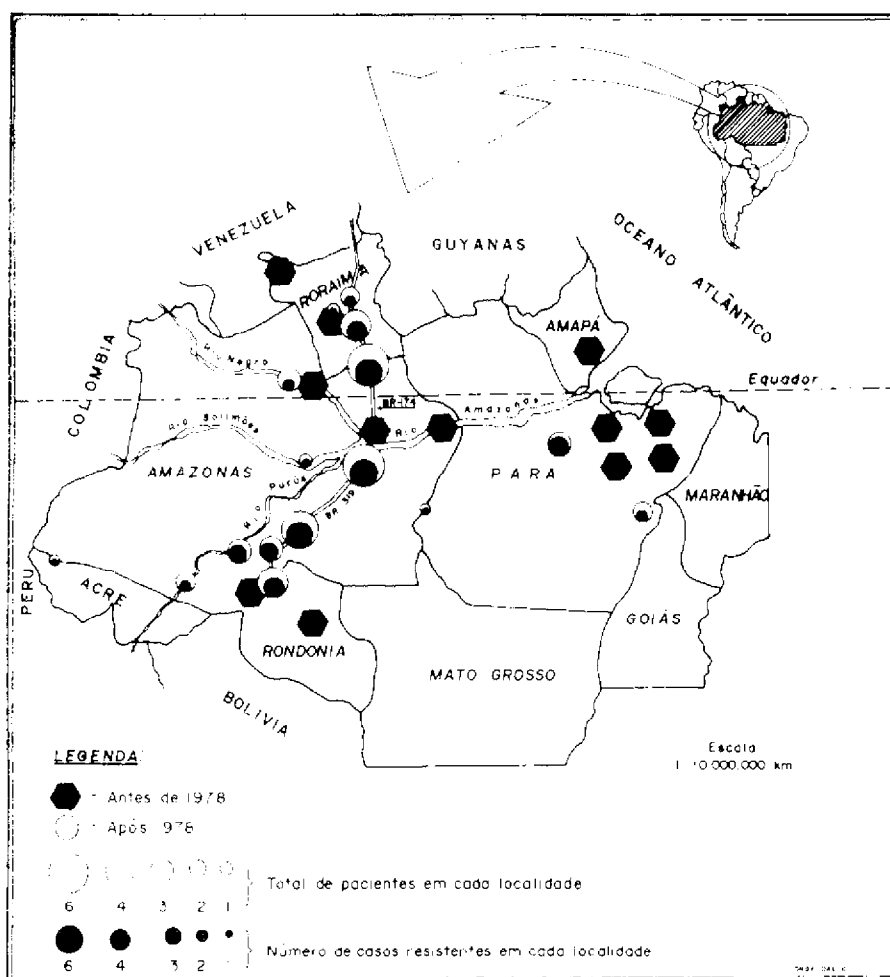


Fig. 1 — Localidades aproximadas onde cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes às cloroquinas, têm sido identificadas na Amazônia, antes e depois de 1978

1971) mostraram que 93% dos pacientes eram portadores de cepas de *P. falciparum* que exibia algum grau de resistência a cloroquina, uma vez que não responderam satisfatoriamente as doses padrão de cloroquina administradas oralmente (25 mg/Kg peso). Com relação ao teste *in vitro* estes autores encontraram 23% de cepas de *P. falciparum* resistentes a concentração de 2,5 nanomoles de cloroquina/ml de sangue. Nossos resultados foram similares aos dos autores acima mencionados.

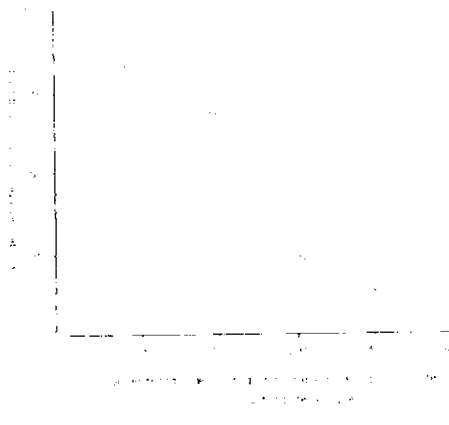


Fig. 2 -- Sensibilidade *in vitro* às várias concentrações de cloroquina nas 48 amostras estudadas

Segundo Rieckmann, a presença de esquizontes na concentração de 1,0 nanomol de cloroquina por ml de sangue é a melhor indicação da resistência da cepa de *P. falciparum*, pois aproxima-se das doses padrões usadas normalmente nos esquemas de tratamento (Rieckmann, 1980).

Neste estudo, apesar da diversidade de origem dos pacientes, a porcentagem das amostras resistentes a droga permaneceram similar a anteriormente obtida 81,8% (Ferraroni *et al.*, 1977). Com esses dados pode-se afirmar com certa segurança, que a porcentagem de cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina na Ama-

zônia é relativamente alta. Este fato deve ser levado em sério, por todo profissional de saúde, atuando na área, frente a um paciente portador de infecção malárica por *P. falciparum*, sobretudo naqueles casos de alta parasitemia, onde o fator tempo será crítico havendo necessidade da utilização de uma medicação alternativa.

Os autores gostariam de chamar atenção das autoridades em Saúde Pública, para a cautela no uso indiscriminado dos derivados das 4-aminoquinoleínas e a necessidade urgente da criação de um laboratório para testar *in vitro*, as cepas de *P. falciparum*, antes de iniciar a terapêutica, dado que o fenômeno da resistência pode ocorrer também com as outras drogas antimaláricas.

O futuro desenvolvimento econômico da amazônia brasileira está na dependência de um controle efetivo da infecção malárica humana. Uma vez que a resistência à cloroquina pelos plasmódios parece resultar de seleção de mutante resistente de uma cepa sob pressão da droga (Peters, 1969); a administração de anti-maláricos em grandes quantidades sem uma cuidadosa supervisão não deve ser considerado um método efetivo para o controle da malária humana.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos funcionários do ambulatório do Hospital de Moléstias Tropicais de Manaus pela colaboração prestada durante a realização da pesquisa e a senhora Osmarina Melo dos Santos pelo apoio datilográfico do manuscrito.

Referências bibliográficas

- Box, E.D.; Box, O.T.; Young, M.D. — 1963. Chloroquine-Resistant *Plasmodium falciparum* from Porto Velho, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 12: 300-304.

TABELA 1. Efeitos das diferentes concentrações de Cloroquina na maturação das formas assexuadas do *Plasmodium falciparum* in vitro em todas amostras que continham cepas resistentes

N.º da Amostra	Idade e Sexo	Parasitas por mm ³ de sangue, antes da incubação	Número de esquizontes após a incubação (Controles)	Número de esquizontes nas diferentes concentrações da droga, nmols/s/ml de sangue *				
				0,5	1,0	2,0	3,0	4,0
01	33 M	3.400	60	49	11	7	—	—
02	26 M	5.200	63	35	18	—	—	—
03	27 M	8.100	66	45	30	19	8	3
04	29 M	1.900	48	24	6	—	—	—
05	03 F	8.700	83	64	17	—	—	—
06	17 F	3.800	23	10	—	—	—	—
07	22 M	2.100	47	31	18	9	6	—
08	19 M	3.700	53	37	20	15	13	9
09	10 M	4.200	52	38	13	—	—	—
10	23 M	2.400	24	13	1	—	—	—
11	29 M	15.400	59	26	15	3	—	—
12	20 M	5.000	21	7	1	—	—	—
13	21 M	7.200	46	31	20	4	—	—
14	22 F	4.100	74	51	33	10	—	—
15	23 M	4.000	47	23	9	—	—	—
16	14 F	37.100	41	28	—	—	—	—
17	26 M	7.600	79	37	13	—	—	—
18	35 M	2.300	27	23	10	—	—	—
19	28 F	9.100	67	44	18	—	—	—
20	21 M	7.100	28	19	12	—	—	—
21	18 F	11.400	13	15	5	—	—	—
22	17 M	31.000	28	20	—	—	—	—
23	18 F	7.200	23	20	17	9	—	—
24	25 M	5.000	81	44	—	—	—	—
25	20 M	18.000	19	18	4	—	—	—
26	21 M	1.900	51	39	6	—	—	—
27	17 M	10.500	60	38	7	—	—	—
28	19 M	4.000	41	25	2	—	—	—
29	22 F	6.000	13	14	5	—	—	—
30	13 F	32.200	28	25	18	13	5	11
31	23 F	7.500	75	47	16	—	—	—
32	17 M	2.700	39	16	7	—	—	—
33	52 M	6.300	18	15	1	—	—	—
34	30 M	5.100	30	23	18	12	10	—
35	31 M	4.400	46	40	22	11	8	—
36	43 M	8.300	35	17	—	—	—	—
37	56 M	13.200	37	22	3	—	—	—
38	53 M	8.800	13	10	4	—	—	—
39	29 M	6.700	24	12	10	—	—	—

(*) — 1,0 nmol = 0,320 µg de Cloroquina base
 (—) — zero

TABELA 2. Total e percentagem por sexo, dos pacientes infectados com cepas de *Plasmodium falciparum* nas diversas localidades da Amazônia brasileira

Nº de ordem	Localidades	Mascullinos		Femininos		Total Exami-nados	Total Positivos	% +
		Exami-nados	Resis-tentes	Exami-nados	Resis-tentes			
01	BR-174 - KM 300	4	4	2	2	6	6	100
02	BR-174 - KM 700	1	1	0	0	1	1	100
03	BR-319 - KM 400	5	4	1	1	6	4	67
04	Altamira	2	1	1	1	3	3	100
05	Barcelos	2	2	0	0	2	2	100
06	Boa Vista	2	1	1	1	2	2	100
07	Boca do Acre	2	2	0	0	2	2	100
08	Coari	1	0	1	1	2	2	100
09	Cruzeiro do Sul	1	1	0	0	1	1	100
10	Humaitá	0	0	1	1	1	1	50
11	Lábrea	2	1	1	1	3	2	67
12	Manacapuru	3	1	1	1	3	2	67
13	Marabá	4	2	0	0	4	2	50
14	Maués	0	0	2	2	2	2	100
15	Porto Velho	1	1	0	0	1	1	100
16	Rio Branco	4	4	0	0	4	4	100
TOTAIS		36	29	12	10	48	39	75

Sensibilidade das formas ...

- Clyde, D.F.; Shute, G.T.; McCarthy, U.C.; Sangalang, R.P.— 1971. Characterization of a drug resistant strain of *Plasmodium falciparum* from Philippines. *J. Trop. Med. Hyg.*, 74: 101-132.
- Contacos, P.G.; Lunn, J.S., Coatney, G. R.—1963. Drug-resistant *falciparum* malaria from Cambodia and Malaya. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 57 : 417-424.
- Darlow, B.; Vrbova, H.; Stace, J.; Heywood, P.; Aalpers, M.— 1980. Frasier-resistant *falciparum* malaria in Papua New Guinea. *Lancet*, 2: 1243.
- Ferraroni, J. J. & Hayes, J. 1979a. Aspectos epidemiológicos da malária no Amazonas. *Acta Amazonica*, 9(3): 471-479.
- 1979b. Drug-resistant *falciparum* malaria among the Mayongong Indians in the Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 28: 909-911
- Ferraroni, J.J.; Alencar, F.H.; Shrimpton, R.—1983. Multiple drug resistance in *falciparum* malaria from Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77: 138-139
- Ferraroni, J.J. Waki, S.; Suzuki, M. 1977. Resistência do *Plasmodium falciparum* às cloroquinas no Estado do Amazonas, detectada pelo método *in vitro*. *Acta Amazonica*, 7(1): 147-148.
- Lopez -Antunano, F. J. & Wernsdorfer, W.H. 1979. *In vitro* response to chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* to mefloquine. *Bull. Wild. Hlth. Org.*, 57: 663-665.
- Maberti, S.— 1960. Desarrollo de resistencia a la pyrimetamin, presentacion de 15 casos estudiados em Trujillo, Venezuela. *Arch. Venez. Med. Trop. Parasitol. Med.*, 3: 239-259
- Markwalder, K.A. & Meyer, H.E. 1982. Possible sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria from Kenya. *Trans. R. Soc. Trop. Med.*, 76: 281.
- Moore, D. V. & Lanier, J. E. — 1961. Observation on two *Plasmodium falciparum* infections with an abnormal response to chloroquine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 10: 5-9.
- Nguyen-Dinh, P. & Trager, W. — 1980. *Plasmodium falciparum* *in vitro*: Determination of chloroquine sensitivity of three new strains by a modified 48 hour test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29: 339-342.
- Organização Mundial da Saúde — 1975. Manual de diagnóstico da malária. *Publicação científica*, (276): 83-97.
- Peters, W. — 1969. Drug resistance in malaria: a perspective. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 63: 25-40.
- Richle, B.M. & Peter, W. 1980. The inhibitory effect of a drug combination on the development of mefloquine resistance to *Plasmodium berghei*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 74: 1-9.
- Rieckmann, K.H. 1980. The *in vitro* cultivation of the pathogens of tropical diseases. In: *Tropical Diseases Research series*, 3, p.36. Basel, Schwabe and Co. AG.
- Rieckmann, K.H. & Lopez-Antunano, F. J. 1971. Chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* in Brazil detected by a simple *in vitro* method. *Bull. Wild. Hlth. Org.*, 45: 157-167.
- Rieckmann, K.H.; McNamara, J.G.; Frischer, H.; Stocker, T.A.; Carson, P.E.; Powell, R.D. 1968. Effects of chloroquine, quinine and cycloquanil upon the maturation of asexual erythrocytic forms of two strains of *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 17: 661-671.
- Rieckmann, K.H.; Sax, S.J.; Campbell, G. H.; Mrema, J.E.— 1978. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* — an *in vitro* microtechnique. *Lancet*, 1: 22-23

- Rumans, L.W.; Dennis, D.T.; Atmosoedjono, S.—1979. Fansidar-resistant falciparum malaria in Indonesia. **Lancet**, 2: 580-581.
- Simpson, M. & Williams, P.—1978. The spread of chloroquine-resistant falciparum malaria in Papua New Guinea. **Med. J. Aust.**, 2: 41-42.
- Trenholme, G.M.; Williams, R.L.; Desjardins, R.E.; Frischer, H.; Carson, P.E.; Rieckmann, K.H.; Canfield, C.J. 1975. Mefloquine (WR 142,490) in the treatment of human malaria. **Science**, 190: 792-794.
- Wolfe, H.L. & Hudleston, J.H.—1979. Investigation of suspected resistance of **Plasmodium falciparum** to chloroquine in Zambia. **Med. J. Zambia**, 2: 173-176.

(Aceito para publicação em 30/6/83)

