

## AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DO PLASMODIUM FALCIPARUM À CLOROQUINA, QUININO E MEFLOQUINA (1)

S.M. DI SANTI (2), V.L.F. CAMARGO NEVES (2), M. BOULOS (2), A.P. DUTRA (2),  
A.M.S.V. RAMOS (2), M. SANTOS (2) & L.C.B. BARATA (2)

---

### RESUMO

Nosso estudo envolveu a análise de cepas de *Plasmodium falciparum* provenientes da Região Amazônica Brasileira, coletadas no Laboratório de Malária da SUCEN. Os estudos "in vitro" foram efetuados com a cloroquina (46 ensaios), quinino (42 ensaios) e mefloquina (51 ensaios). Os resultados mostraram resistência de 100% em relação à cloroquina, 2,4% ao quinino e 31,4% à mefloquina, na análise "in vitro". Sete pacientes foram tratados com quinino isolado e nove com a associação mefloquina + pirimetamina-sulfadoxina, não mostrando correlação com os testes "in vitro".

**UNITERMOS:** Terapêutica da malária; Microtestes de sensibilidade ao *Plasmodium falciparum*.

---

### INTRODUÇÃO

A resistência do *Plasmodium falciparum* a diversos antimaláricos, isto é, sua capacidade de multiplicar-se ou sobreviver em presença de determinada concentração de uma droga que normalmente é eficaz contra parasitas da mesma espécie<sup>16</sup>, vem sendo descrita há longo tempo.

MOORE & LANIER<sup>8</sup> descreveram o aparecimento da resistência à cloroquina, em 1961, na Colômbia. Hoje, numerosas regiões apresentam o grave problema da resistência a esta 4-aminoquinoleína, incluindo o Sudeste Asiático<sup>14</sup>, Indochina, Malásia, Indonésia, Papua Nova Guiné<sup>15</sup>, Kênia, Tanzânia, Sudão, Zaire e mais recentemente Angola<sup>6 e 10</sup>.

O primeiro relato de falha no tratamento com o quinino data de 1910, no Brasil<sup>9</sup>. Apesar de ser o quinino, ainda hoje, a droga preconizada pela OMS<sup>17</sup> para o tratamento de malária falcipara grave, não podemos ignorar que, apesar de raros, outros relatos de resistência foram descritos, como por exemplo na Tailândia<sup>7 e 11</sup>.

A mefloquina (4-quinolinometanol) é considerada atualmente uma alternativa terapêutica apropriada para o tratamento de *P. falciparum* resistente aos demais antimaláricos. Esta droga apresenta certas vantagens, como o fato de poder ser administrada em dose única, isolada ou em associação com outros medicamentos (sulfadoxina-pirimetamina), proporcionando

---

(1) Auxílio financeiro do CNPq-Polonoroeste 700349/85.

(2) Laboratório de Malária da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo. Rua Cardeal Arcoverde, 2878. CEP 05408 São Paulo, SP., Brasil.

uma rápida diminuição e negatificação dos parasitas. Mas já existem relatos de resistência "in vivo" na Tailândia e Leste da África<sup>1,3</sup>. No Brasil, estudos recentes têm demonstrado casos de cepas resistentes "in vitro" e "in vivo" à mefloquina isolada ou em tripla combinação<sup>2 e 13</sup>. Porém, por sua vida média ser bastante longa (21 dias), constitui-se de fator importante na seleção de cepas resistentes, visto que indivíduos com baixa dosagem da droga no sangue periférico, permanecendo em áreas com possibilidade de transmissão, estarão transferindo baixos níveis de mefloquina ao mosquito, facilitando o desenvolvimento de resistência. Com base nestes dados, torna-se imprescindível a pesquisa de outras alternativas terapêuticas para o tratamento da malária causada por *Plasmodium falciparum*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram realizados no período de novembro de 1984 a fevereiro de 1988. Após o diagnóstico da espécie de plasmódio, realizado pelo Laboratório de Malária da SUCEN, os pacientes se submeteram a punção venosa para retirada da amostra de sangue, colhido em seringa heparinizada.

A parasitemia variou de 5.000 a 100.000 formas assexuadas por milímetro cúbico e foram triados para coleta, pacientes que não apresentassem relato de tratamento progressivo com drogas antimaláricas.

Os testes foram baseados na técnica de RIECKMANN e cols., 1978<sup>12</sup>.

O sangue parasitado foi lavado duas vezes com RPMI 1640 (Flow), suplementado com bicarbonato de sódio (Merck, 2 mg/ml), Hepes (Sigma, 6 mg/ml) e sulfato de gentamicina (Schering, 40 µg/ml). Desprezou-se a papa leucocitária. A seguir este sangue foi diluído para um hematócrito de 5% em RPMI completo, isto é, complementado com bicarbonato de sódio, Hepes, sulfato de gentamicina e soro humano AB<sup>+</sup> ou A<sup>+</sup>.

As placas pré-doseadas contendo as várias concentrações da droga, em picomoles, foram fornecidas pela O.M.S. As drogas utilizadas foram a cloroquina, quinino e mefloquina. (Quadro I)

O sangue parasitado diluído foi distribuído nas placas de microtestes (50 µl/alvéolo) e a seguir incubado em dessecador com atmosfera de

5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Em todos os testes foi feito um controle (K) sem droga para verificação da maturação dos anéis até esquizontes. O tempo mínimo de incubação foi de 24 horas e o máximo de 48 horas. Após este intervalo foram realizadas lâminas-controle (gota espessa corada por Giemsa a 2% em solução tamponada pH 7,02), para constatar a presença de esquizontes (parasitas com 3 ou mais núcleos). Foram considerados os testes contendo na lâmina-controle número igual ou maior que 20% de esquizontes em 200 formas assexuadas.

QUADRO I

Concentração das drogas por alvéolo

Dose (pmol) Droga	A	B	C	D	E	F	G	H
Cloroquina	0	1	2	4	5,7	8	16	32
Quinino	0	4	8	16	32	64	128	256
Mefloquina	0	0,5	1	2	4	5,7	8	16

Foram classificadas como resistentes aquelas cepas que apresentaram esquizontes na presença de 5,7 ou mais picomoles de cloroquina, 64 ou mais picomoles de quinino e 4 ou mais picomoles de mefloquina, seguindo os critérios estabelecidos pela O.M.S.

Quanto à procedência das cepas de *Plasmodium falciparum*, 56,8% foram provenientes de pacientes que adquiriram a infecção no Estado de Rondônia, 16,9% no Estado de Mato Grosso, 15,7% no Estado do Pará, 3,9% no Estado do Acre, 2% no Estado de Goiás e 2% de Estado indeterminado (Acre ou Rondônia).

## RESULTADOS

Foram realizados 46 microtestes de sensibilidade com a cloroquina. Os resultados mostraram 46 cepas com crescimento dos parasitas até o estágio de esquizontes, em concentração igual ou superior a 5,7 picomoles/orifício, havendo, portanto, 100% de resistência "in vitro" à cloroquina.

Quanto ao quinino, dos 42 testes realizados, apenas 01 apresentou crescimento em 64 picomoles (2,4%), sendo, portanto, considerada resistente.

Os resultados com a mefloquina mostraram 31,4% de resistência, isto é, dos 51 micro-

testes realizados, 16 apresentaram esquizontes em concentração igual ou maior que 4 picomoles/orifício.

Estes dados estão apresentados no Quadro 2.

Com base nos testes realizados, segundo a procedência, não observamos áreas com maior incidência de resistência às drogas estudadas, havendo uma distribuição uniforme de cepas resistentes. Tabelas 1, 2 e 3.

QUADRO 2

Porcentagem de cepas sensíveis e resistentes à cloroquina, quinino e mefloquina.

	S	R
Cloroquina n = 46	0 (0%)	46 (100%)
Quinino n = 42	41 (97,6%)	01 (2,4%)
Mefloquina n = 51	35 (68,6%)	16 (31,4%)

No período de 1984 a 1986, houve um aumento significativo do índice de resistência à mefloquina. Não foi possível avaliar se este quadro se mantém até hoje, devido ao pequeno número de testes realizados após 1986. Na tabela 4, observamos o padrão de resistência da mefloquina segundo o período de realização do teste.

## DISCUSSÃO

O conhecimento do grau de sensibilidade do *P. falciparum* aos diferentes medicamentos é de muito anseio de todos aqueles que deparam com as dificuldades de tratar um paciente acometido por tal protozoose.

A despeito de existirem dados sobre os microtestes de sensibilidade em nosso meio, estes são esparsos, não trazendo informações uniformes e não correlacionando tais dados com a susceptibilidade "in vivo".

Os pacientes atendidos no Laboratório de Malária da SUCEN, são oriundos de várias regiões malarígenas do Brasil, sendo amostragem do que ocorre no país.

Os microtestes de sensibilidade, segundo a

TABELA 1

Resposta "in vitro" do *P. falciparum* à cloroquina, segundo a procedência

Estado	Cepas com crescimento até dada concentração em pmoles/alvéolo						
	1	2	4	5,7	8	16	32
Rondônia n = 26	26 (100%)	26 (100%)	26 (100%)	26 (100%)	22 (85%)	18 (69%)	08 (31%)
Mato Grosso n = 09	09 (100%)	09 (100%)	09 (100%)	09 (100%)	07 (78%)	07 (78%)	02 (22%)
Pará n = 08	08 (100%)	08 (100%)	08 (100%)	08 (100%)	07 (87%)	06 (75%)	04 (50%)
Acre n = 01	01 (100%)	01 (100%)	01 (100%)	01 (100%)	01 (100%)	01 (100%)	01 (100%)
Goiás n = 01	01 (100%)	01 (100%)	01 (100%)	01 (100%)	01 (100%)	01 (100%)	01 (0%)
Indeterminado n = 01	01 (100%)	01 (100%)	01 (100%)	01 (100%)	01 (100%)	01 (100%)	01 (0%)

técnica de Rieckmann, mostraram ausência de sensibilidade à cloroquina em todas as 46 amostras testadas.

Apesar da reconhecida resistência do *P.*

*falciparum* à cloroquina, esta droga continua a ser empregada em vários locais, dentre os quais o Brasil, mostrando ser ainda útil, pelo menos para evitar mortalidade<sup>4</sup>.

TABELA 2

Resposta "in vitro" do *P. falciparum* ao quinino, segundo a procedência

Estado	Cepas com crescimento até dada concentração em pmoles/alvéolo						
	4	8	16	32	64	128	256
Rondônia n = 24	24 (100%)	24 (100%)	13 (54%)	07 (29%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Mato Grosso n = 08	08 (100%)	08 (100%)	06 (75%)	03 (37%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Pará n = 07	07 (100%)	07 (100%)	04 (57%)	02 (29%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Acre n = 01	01 (100%)	01 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Goiás n = 01	01 (100%)	01 (100%)	01 (100%)	01 (100%)	01 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Indeterminado n = 01	01 (100%)	01 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

TABELA 3

Resposta "in vitro" do *P. falciparum* à mefloquina, segundo a procedência

Estado	Cepas com crescimento até dada concentração em pmoles/alvéolo						
	0,5	1	2	4	5,7	8	16
Rondônia n = 29	29 (100%)	29 (100%)	25 (86%)	08 (27%)	05 (17%)	01 (03%)	0 (0%)
Mato Grosso n = 10	10 (10%)	10 (100%)	08 (80%)	03 (30%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Pará n = 08	08 (100%)	08 (100%)	07 (87%)	03 (37%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Acre n = 2	02 (100%)	02 (100%)	01 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Goiás n = 1	01 (100%)	01 (100%)	01 (100%)	01 (100%)	01 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Indeterminado n = 1	01 (100%)	01 (100%)	01 (100%)	01 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Nos testes realizados em 42 amostras para o quinino, observou-se apenas 1 resistente. Este padrão de resposta confronta com os dados obtidos por KNOWLES e col, que encontraram paralelismo de resposta entre a cloroquina e o quinino nos testes "in vitro".

No entanto, em 7 pacientes que tivemos a oportunidade de utilizar o sulfato de quinino na dosagem de 25 mg/kg/dia durante 7 dias, e de cujas amostras foram realizados microtestes de sensibilidade, observamos ausência de correlação. Enquanto todos os testes "in vitro" mostraram sensibilidade do *P. falciparum* ao quinino, 3 pacientes recrudesceram com tratamento completo.

Tal fato demonstra a necessidade de se reestudar o limite de resistência, para os testes "in vitro", relativos ao quinino, na malária brasileira.

Com a mefloquina um fato surpreendente chama a atenção. Apesar desta droga não ter sido rotineiramente empregada durante a época do estudo, observou-se baixa sensibilidade "in vitro" do *P. falciparum* a ela, sensibilidade essa que foi decrescendo com o desenvolver do estudo (tabela 4).

Um outro fato que merece destaque é que, na mesma época, estudos em humanos, mostram resistência bem menor da observada "in vitro".

A exemplo do quinino, aqui também se faz necessário reavaliação do limiar de resistência nos testes "in vitro", para a malária adquirida no Brasil.

A despeito da variada procedência dos casos estudados nesse trabalho, julgamos necessário estudos mais abrangentes, procurando

comparar microtestes de sensibilidade com evolução clínica dos pacientes, possibilitando assim, que amostragem maior esclareça algumas dúvidas aqui abordadas.

## SUMMARY

### Evaluation of *Plasmodium falciparum* response to chloroquine, quinine and mefloquine

The present study is concerned with the analysis of *Plasmodium falciparum* strains from the Brazilian Amazon Region, collected at the Malaria Laboratory — SUCEN. "In vitro" sensitivity tests were performed using chloroquine (46 samples), quinine (42 samples) and mefloquine (51 samples). Results have shown "in vitro" resistance to chloroquine in 100% of the tested samples, to quinine in 2.4% and to mefloquine in 31.4%. Seven patients were treated with quinine and nine with the triple combination (mefloquine plus sulfadoxine plus pyrimethamine). No correlation was shown between the therapeutic response and the "in vitro" tests.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOUDREAU, E.F. — Type II mefloquine resistance in Thailand. *Lancet*, 2: 1335, 1982.
2. BOULOS, M.; DI SANTI, S.M.; BARATA, L.C.B.; SEGURADO, A.A.C.; DUTRA, A.P. & CAMARGO NEVES, V.L.F. — Some aspects of treatment, prophylaxis and chemoresistance of *Plasmodium falciparum* malaria. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 81 (Suppl. 2): 255-257, 1986.
3. BYGJBERG, I.C.; SCHAPIRA, A.; FLACHS, H.; GOMME, G. & JEPSEN, S. — Mefloquine resistance of falciparum malaria from Tanzania enhanced by treatment. *Lancet*, 1: 774-775, 1983.
4. HOFFMAN, S.L.; MASBAR, S.; HUSSEN, P.R.; SOEWUSTA, A.; HARVIN, S.; MASWOTO, H.A.; CAMPBELL, J.R.; SMAKOVSKI, L. & WINDY, I. — Absence of malaria mortality in villagers with chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* treated with chloroquine. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 78: 175-178, 1984.
5. KNOWLES, G.; DAVIDSON, W.Z.; LOLLEY, D. & ALPERS, M.P. — The relationship between the "in vitro" response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, quinine and mefloquine. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 78: 146-150, 1984.
6. KYRONSEPPÄ, H.; LUMIO, J.; UKKONEN, R. & PETERSON, T. — Chloroquine-resistant malaria from Angola. *Lancet*, 1: 1244, 1984.
7. MIGASENA, S.; BUNNAG, D. & HARINASUTA, T.

TABELA 4

Distribuição por ano, dos níveis de resposta à mefloquina

Dose*	1984	1985	1986	1987	1988
0,5	0	0	0	0	0
1	01	06	0	—	01
2	04	18	01	—	04
4**	0	08	02	—	0
5,7	0	03	02	—	0
8	0	01	0	—	0
16	0	0	0	—	0
TOTAL	05	36	05	0	05

\* picomoles

\*\* limiar de sensibilidade

---

DI SANTI, S.M.; CAMARGO NEVES, V.L.F.; BOULOS, M.; DUTRA, A.P.; RAMOS, A.M.S.V.; SANTOS, M. & BARATA, L.C.B. — Avaliação da resposta do *Plasmodium falciparum* à cloroquina, quinino e mefloquina. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 30(3):147-152, 1988.

---

- A case of *Plasmodium falciparum* in Thailand apparently resistant to quinine. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 74: 243-244, 1980.
8. MOORE, D.V. & LANIER, J.E. — Observations on two *Plasmodium falciparum* with an abnormal response to chloroquine. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 10: 5-9, 1961.
  9. NOCHT, B. & WENER, H. — Beobachtungen uber relative Chininresistenz bei Malaria aus Brasilien. *Dtsch. med. Wschr.*, 36: 1557-1560, 1910.
  10. OLSEN, V.V.; JENSEN, T. & JORGENSEN, M. — Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria from Angola. *Lancet*, 1: 1462-1463, 1984.
  11. REACHER, M.; CAMPBELL, C.C.; FREEMAN, J.; DOBERSTYN, E.B. & BRANDLING-BENNETT, A.D. — Drug therapy for *Plasmodium falciparum* malaria resistant to pyrimethamine-sulfadoxine (Fansidar). A study of alternate regimens in Eastern Thailand, 1980. *Lancet*, 2: 1066-1069, 1981.
  12. RIECKMANN, K.H.; SAX, L.J.; CAMPBELL, G.H. & MREMA, J.E. — Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An "in vitro" microtechnique. *Lancet*, 1:22-23, 1978.
  13. SOUZA, J.M. de; SHETH, U.K.; OLIVEIRA, R.M.G.; GOMES, A.T. & CAVALCANTE, E.Q. — A phase I clinical trial of Fansimef (Mefloquine plus sulfadoxine-pyrimethamine) in Brazilian male subjects. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 63: 611-615, 1985.
  14. UPRETY, H.C.; GUPTA, V.K. & SHARMA, V.P. — Modified plan of operation and its impact on malaria. *Indian J. Malar.*, 19:137-138, 1982.
  15. WERNSDORFER, W. — **Known geographical distribution, frequency and intensity of drug-resistant malaria.** (Cyclostyled report) MAP/SGCM/WP/83.10. Geneva, World Health Organization, 1983.
  16. WHO — **Terminology of malaria and of malaria eradication.** Report of a Drafting Committee. Geneva, World Health Organization, 1963. p. 116.
  17. WHO — Advances in malaria chemotherapy. *Wld. Hlth. Org. techn. Rep. Ser.*, (711). 1984.