

## Análise da diversidade do *Plasmodium falciparum* pela caracterização de clones isolados de amostras da região amazônica brasileira

Álvaro A. Couto\*  
 Marco A. Santos\*  
 Salma G. Oliveira\*

\*FSESP-MS – Instituto Evandro Chagas – Programa Malária – Belém, Pará.

Amostras de *Plasmodium falciparum* da região amazônica brasileira têm sido caracterizadas com base no estudo de marcadores genéticos.<sup>2,5</sup>

Esta investigação permitiram demonstrar a diversidade existente entre as amostras de áreas distintas, bem como de um mesmo paciente quando da ocorrência de casos de recrudescências.<sup>6</sup> Desta forma, estes estudos comprovam que a população de parasitas isolados de um paciente é constituída de uma mistura de tipos geneticamente diferentes, coexistindo no mesmo paciente.

A clonagem, técnica inicialmente utilizada em malária de roedores<sup>10</sup>, agora tem sido aplicada nas investigações com *P. falciparum*<sup>1,9</sup>. Rosário<sup>4</sup>, com base na investigação de misturas de parasitas para tipos enzimáticos, isolou clones que exibiam um único tipo de cada enzima analisada. Trager et alii<sup>8</sup> isolaram clones por micromanipulação, analisando nestes a presença ou ausência de “knobs” nos eritrócitos infectados.

Todas as características estudadas no *P. falciparum* têm mostrado que os clones em crescimento *in vitro* permanecem estáveis por períodos consideráveis<sup>8</sup>.

No presente trabalho, descrevemos a análise de 8 clones isolados pelo método das diluições previamente descrito por Rosário<sup>4</sup>, utilizando-se para este estudo as amostras IEC-132/83 e IEC-145/83, obtidas de pacientes oriundos do Território Federal do Amapá e Tucuruí (PA), respectivamente. Após a coleta das amostras, estas foram submetidas a cultivo contínuo *in vitro*<sup>3</sup>, cuja metodologia tem permitido o uso experimental desses parasitas, sendo posteriormente caracterizadas com base no estudo de susceptibilidades a drogas e análise de tipos enzimáticos, onde se comprovou a existência de população mista para a enzima GPI-glucose-fosfato-isomerase (GPI-1 e GPI-2). Após esse estudo, as amostras foram criopreservadas em nitrogênio líquido.

A técnica de clonagem, em nosso programa, foi realizada com sucesso, primeiramente com a amostra IEC-132/83, em agosto de 1984 e, em seguida, com a amostra IEC-145/83, em fevereiro de 1985, tendo sido, portanto, a primeira vez

Recebido para publicação em  
 17/05/86.

que clones de *P. falciparum* foram isolados no Brasil. As duas amostras foram diluídas em meio RPMI 1640, estimando-se um parasita por 100 µl e posteriormente inoculadas em orifícios de microplacas. Após aproximadamente 21 dias, foram observados em microscopia óptica, e os inóculos positivos transferidos para placas de petri de 35 mm. Alguns destes clones foram caracterizados para dois marcadores genéticos, testes de sensibilidade às drogas e tipificação enzimática (tabela I).

Da amostra IEC-132/83 foram caracterizados três clones identificados (IEC-132/83-C, IEC-132/83-E e IEC-132/83-F) e da amostra IEC-145/83 foram caracterizados cinco clones (IEC-145/83-12, IEC-145/83-13, IEC-145/83-22, IEC-145/83-27 e IEC-145/83-30).

Tanto a amostra IEC-132/83 como a IEC-145/83, no que se refere aos tipos enzimáticos, apresentaram perfil idêntico, ou seja, todos os clones analisados foram do tipo GPI-2. Entretanto, observou-se que os clones apresentaram variações no nível de sensibilidade às drogas, uma vez que as amostras originais apresentavam-se resistentes à cloroquina, à amodiaquina e ao quinino e sensíveis à mefloquina. Os clones IEC-132/83-C, IEC-132/83-E e IEC-132/83-F apresentaram níveis de sensibilidade superiores e inferiores ao da amostra original. Para o quinino, apenas o clone IEC-132/83-C difere dos demais, apresentando nível de sensibilidade inferior ao do original.

Na amostra IEC-145/83 para a cloroquina não se verifi-

TABELA 1

Caracterização de Clones de *P. falciparum*

AMOSTRAS	Caracterização Enzimática			TESTE DE SENSIBILIDADE			
	GPI	ADA	PEP	Clq (x10 <sup>-8</sup> M)	CMef. (x10 <sup>-8</sup> M)	Amod. (x10 <sup>-8</sup> M)	SQ (x10 <sup>-8</sup> M)
IEC-132/83*	1 e 2	2	1	16	1	8	62,5
Clone C	2	2	1	8	0,5	0,5	31,25
Clone E	2	2	1	16	2	2	62,5
Clone F	2	2	1	32	2	4	62,5
IEC-145/83*	1 e 2	2	1	32	4	8	125
Clone 12	2	2	1	32	6	8	125
Clone 13	NT	2	1	32	8	16	250
Clone 22	2	2	1	32	8	8	62,5
Clone 27	2	2	1	32	1	8	62,5
Clone 30	2	2	1	32	8	8	62,5

\* Amostra

NT – Não testada

a Clq – Difosfato de Cloroquina  
 CMef – Cloridrato de Mefloquina  
 Amod – Amodiaquina  
 SQ – Sulfato de Quinino

caram variações, entretanto, para as demais drogas, observaram-se clones com até o dobro de resistência da amostra original.

Até o presente momento, não se tem determinado relação entre tipo enzimático e sensibilidade a drogas, porém futuras investigações com clones poderão determinar alguma possível relação entre essas características<sup>7</sup>.

Continuamos nossas investigações utilizando clones, objetivando determinar alguma possível relação entre tipo enzimático e sensibilidade a drogas.

Por outro lado, a produção de gametócitos *in vitro*, a partir de clones, tem sido muito importante para obtenção de infecção experimental de mosquitos, principalmente por permitir estudos genéticos.

Finalmente, estas observações sugerem que a amostra original é formada por várias subpopulações e que estas caracterizadas isoladamente permitem a análise da composição genética das amostras de *P. falciparum*.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com o apoio da FSESP – CNPq – FINEP – SUCAM UNDP/WORLD BANK – WHO. Agradecemos especialmente ao Dr. Virgílio E. do Rosário pela orientação técnica e aos laboratoristas José Maria Nascimento e Edvaldo Santa Rosa pelo auxílio nas técnicas laboratoriais de caracterização. Agradecemos, também, ao Dr. L. Shaw (Wellcome Parasitology – FSESP – I.E. CHAGAS) e Dra. Maria de Fátima Assis (UFPA – Dept<sup>o</sup> Genética) pela revisão do manuscrito e à Sra. Margarete Garcia pela datilografia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BHASIN, V.K. & TRAGER, W. Gametocyteforming and Non-gametocyte-forming Clones of *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Med. Hyg.*, 33 (4): 534-7, 1984.
2. COUTO, A.; ROSÁRIO, V.E. & WALLIKER, D. Análise enzimática de 56 amostras de *Plasmodium falciparum* da Bacia Amazônica (Brasil). *R. bras. de Malariol. D. Trop.*, 35: 11-9, 1983.
3. JENSEN, J.B. & TRAGER, W. *Plasmodium falciparum* in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. *J. Parasitol.*, 63, (5), 1977.
4. ROSÁRIO, V.E. Cloning of naturally occurring mixed infections of malaria parasites. *Science*, 212: 1037-8, 1981.
5. ROSÁRIO, V.E. Caracterização de cepas de *Plasmodium falciparum* do Brasil. *R. Fund. SESP*, 28 (2): 115-36, 1983.

## COMUNICAÇÕES BREVES

6. ROSÁRIO, V.E.; COUTO, A.; SANTOS, M.A. & SOUZA, J.M. Caracterização de cepas de *Plasmodium falciparum* coletadas de pacientes recrudescentes. *R. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 27 (5): 274-8, 1985.
7. THAITONG, S. Clone of different sensitivities in drug-resistant isolates of *Plasmodium falciparum*. *Bull. WHO*, 61 (4): 709-12, 1983.
8. THAITONG, S.; BEALE, G.H.; FENTON, B.; Mc BRIDGE, J.; ROSÁRIO, V.; WALKER, A.; & WALLIKER, D. Clonal diversity in a single isolate of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Trans. Soc. of Trop. Med. Hyg.*, 78: 242-5, 1984.
9. TRAGER, W.; TERSHAKOVEC, M.; LYANDVERT, L.; STANLEY, H.; LANNERS, N. & GUBERT, E. Clones of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* obtained by microscope selection: Their characterization with regard to knobs, chloroquine sensitivity, and formation of gametocytes.
10. WALLIKER, D.; CARTER, R. & MORGAN, S. Genetics recombination in *P. berghei*. *Parasitology*, 66: 309-20, 1973.