

Adecuación de una prueba radiométrica para la detección de resistencia múltiple de *Plasmodium falciparum* a medicamentos

Jacqueline Chaparro¹, Moisés Wasserman².

Resumen

Uno de los elementos indispensables para desarrollar estrategias terapéuticas contra la malaria es establecer los niveles y distribución geográfica de la resistencia de *Plasmodium falciparum* a medicamentos; desafortunadamente los métodos disponibles en la actualidad no son adecuados para hacer una búsqueda de la resistencia a nivel epidemiológico. En este trabajo se adecuó una prueba radiométrica "in vitro" para detectar resistencia de *P. falciparum* a varios medicamentos simultáneamente; este ensayo permite hacer una determinación cuantitativa de la resistencia, tiene corta duración comparado con la prueba "in vivo" y facilita el análisis de un gran número de muestras en corto tiempo. Aunque el ensayo no puede ser aplicado sobre muestras de pacientes que hayan tomado antimaláricos recientemente y es necesario que los aislamientos se desarrollen en condiciones de cultivo "in vitro", el desconocimiento de las bases moleculares de la resistencia a cloroquina, amodiaquina, mefloquina, quinina y halofantrina, lleva al uso de la prueba radiométrica ya que no requiere la identificación directa de un gen o de un producto génico.

Palabras clave: *Plasmodium falciparum*, resistencia, pruebas in vitro, antimaláricos

Modification of a Radiometric Microtest to detect *Plasmodium falciparum* Resistance to Several Drugs

Summary

The development of strategies to control malaria requires precise knowledge about the drug-resistant parasite levels and geographical distribution. Unfortunately currently available methods are not fully adequate for these parameters to be established. This paper describes the improvement of a radiometric micro-test to detect resistance to several drugs. This test is easy, rapid and permits analysis of numerous samples in a short time. A molecular assay is not currently available for the determination of resistance because the molecular mechanisms behind chloroquine, amodiaquine, mefloquine, quinine or halofantrine resistance remain obscure. Under these circumstances, we recommend the use of the modified microtest for them.

Key words: *Plasmodium falciparum*, resistance, in vitro tests, anti-malaric drugs.

Este trabajo hace parte de la tesis de maestría en Bioquímica de la Universidad Nacional de Colombia, ejecutada por la estudiante Jacqueline Chaparro bajo la dirección del doctor Moisés Wasserman

¹ Grupo de Bioquímica, Instituto Nacional de Salud; Bogotá, Colombia.

² Universidad Nacional de Colombia, Grupo de Bioquímica, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia.

Recibido para publicación 13 de febrero de 1999, aprobado 22 de abril de 1999

La malaria es una de las enfermedades parasitarias humanas de mayor incidencia en el mundo, es responsable de cerca de 2.7 millones de muertes anualmente y se calcula que casi el 40% de la población mundial vive en zonas donde la malaria es un riesgo potencial (1). En la actualidad el paludismo se ha vuelto virtualmente incontrolable en muchas áreas del mundo debido a la aparición de parásitos resistentes a los medicamentos más económicos y seguros (2-4); aunque esta situación ha fomentado el desarrollo de nuevos antimaláricos, es importante considerar el tiempo que toma sintetizar y seleccionar un fármaco, la posibilidad de que el parásito desarrolle prontamente resistencia a esos nuevos compuestos y los altos costos de algunos de esos medicamentos (5-6).

Los esfuerzos para detener la resistencia requieren habilidad para mapearla rápida y exactamente a una escala epidemiológica y los actuales métodos no son adecuados para hacer una búsqueda de ese tipo (7-12); aunque es ampliamente aceptado que la prueba ideal para detectar resistencia de *P. falciparum* a fármacos es la prueba "in vivo", hay también acuerdo en que es un ensayo costoso que requiere mucho tiempo y es metodológicamente complicado. Por este motivo, durante mucho tiempo se ha trabajado en el desarrollo de ensayos "in vitro" que puedan ser aplicados masivamente y que permitan detectar resistencia a medicamentos a escala epidemiológica; desafortunadamente el desconocimiento de las bases moleculares de la resistencia a muchos de los antimaláricos de mayor distribución, ha hecho imposible el uso de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (13), el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (14) y el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción amplificados por PCR (AFLP) (15).

Este trabajo plantea adecuar una técnica "in vitro" que permita detectar resistencia a antimaláricos y hacer un acercamiento inicial a su uso en campo, aplicándola sobre algunos aislamientos de *P. falciparum* obtenidos de pacientes. La prueba mide la respuesta a medicamentos con base en la inhibición del desarrollo (determinado a través de la inhibición de la incorporación de ³H-hipoxantina) de parásitos sometidos a diferentes concentraciones de cloroquina,

amodiaquina, mefloquina, quinina, halofantrina o de la combinación pirimetamina-sulfadoxina. El estudio pretende aportar conocimiento y algunas herramientas útiles en la búsqueda de resistencia múltiple de *P. falciparum* a medicamentos en el país.

Materiales y métodos

Parásitos

La cepa colombiana FCB2 fue mantenida en cultivo por medio del método de Trager y Jensen (16) utilizando sangre humana tipo O Rh+. La sangre fue suspendida al 5% en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con HEPES (25mM), NaHCO₃ (32mM), GSH (1mg/l) y suero humano inactivado (10%). La sincronización del cultivo se hizo por lisis diferencial con sorbitol 5% (17). Antes de ser usados, los parásitos fueron sometidos a dos lavados con buffer isotónico (HBS).

Eritrocitos

Lavado. La sangre fue centrifugada a 2500rpm durante 5 min., se retiró el plasma y se lavó tres veces con HBS.

Lavado con ficoll-hypaque. Con el ánimo de eliminar los leucocitos en el ensayo, la sangre empacada fue diluida 1:1 en HBS y colocada sobre un colchón de histopaque 1:1. Tras centrifugar 30min a 2000rpm se retiró la capa de células blancas y se hicieron tres lavados con HBS.

Medicamentos

Los medicamentos usados fueron cloroquina y quinina disueltas en HBS, amodiaquina y mefloquina disueltas en agua destilada, halofantrina (donada por Tecnoquímicas S.A.) disuelta en etanol 70%, sulfadoxina (donada por Roche S.A.) disuelta en dimetil sulfóxido (DMSO) y pirimetamina disuelta en ácido láctico 5%. Halofantrina, pirimetamina y sulfadoxina fueron disueltas a concentraciones de 5mM, 10mM y 1M respectivamente y las diluciones finales fueron hechas en HBS. Para determinar si los compuestos en que fueron solubilizados los medicamentos podían alterar los resultados de la prueba, se hizo un ensayo en el que una microplaca fue dosificada con los solventes (sin los fármacos) y se determinó su efecto sobre el desarrollo de los parásitos.

Métodos de cultivos modificados

Debido a que el RPMI-1640 comercial contiene hipoxantina que conlleva a la dilución isotópica de la ^3H -hipoxantina, el RPMI fue preparado a partir de soluciones concentradas de vitaminas, aminoácidos y sales. Adicionalmente debido a que el ácido p-aminobenzoico (PABA) y el ácido fólico interfieren con la acción de la pirimetamina y la sulfadoxina, se preparó un RPMI con bajas concentraciones de PABA (10 $\mu\text{g/l}$) y ácido fólico (0.5 $\mu\text{g/l}$). Para determinar si estos dos medios modificados podían sostener los cultivos, se hizo un ensayo en el que se siguió el desarrollo de los parásitos durante tres días. Como control fue usado el RPMI-1640 comercial (PABA 1mg/l y ácido fólico 1mg/l).

Preparación del ensayo

Dos microplacas de 96 pozos fueron dosificadas por duplicado con los medicamentos (tabla 1) y el medio sin hipoxantina fue adicionado hasta un volumen final de 150 μl por pozo; se agregó la sangre y finalmente los parásitos, los cuales habían sido sometidos previamente a dos lavados con HBS. Las dos microplacas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera de CO_2 5% y O_2 15%, y a las 32 horas de desarrollo se agregó ^3H -hipoxantina a una de las ellas ensayando concentraciones entre 0.09 μCi y 0.9 μCi por pozo. Se eligió este momento porque entre las 32 y 44 horas de desarrollo se producen los picos máximos de síntesis de ácidos nucleicos en el parásito y tiene lugar la incorporación de hipoxantina, precursor de purinas y pirimidinas (18). Finalmente las microplacas fueron incubadas 18 horas más, antes de procesar las muestras radioactivas y hacer los extendidos hematológicos de la microplaca sin ^3H -hipoxantina; la prueba fue aceptada cuando la lectura en el control sin medicamento fue ≥ 2000 cpm (ensayo radiométrico) o cuando la parasitemia final en el control sin medicamento fue al menos el doble de la inicial (ensayo microscópico). Los resultados fueron expresados como IC_{50} .

Determinación del IC_{50}

El IC_{50} fue definido como la concentración del medicamento que redujo la incorporación de ^3H -hipoxantina en un 50% (prueba radiométrica)

o produjo una inhibición del 50% en la invasión (prueba microscópica). Como el análisis de las muestras a través de extendidos es lenta, dispendiosa y en cierta medida subjetiva, se hizo una correlación entre el IC_{50} microscópico y el IC_{50} radiométrico para establecer si las dos pruebas podían ser usadas indistintamente. Se consideró como resistente cualquier aislamiento con IC_{50} igual o superior a 0.0114 μM para cloroquina, 0.004 μM para amodiaquina, 0.064 μM para mefloquina, 0.5 μM para quinina, 0.004 μM para halofantrina y 1.63/130 μM para pirimetamina-sulfadoxina (19).

Efecto de las células blancas

Se sabe que las células blancas incorporan cloroquina pero se desconoce su comportamiento frente a otros antimaláricos o frente a la hipoxantina (20); la presencia de leucocitos en las muestras de pacientes hizo necesario evaluar su comportamiento en la prueba. Para tal efecto se llevaron a cabo ensayos en los que se comparó la incorporación de ^3H -hipoxantina de parásitos cultivados con sangre no tratada con Ficoll-hypaque (con leucocitos), de parásitos cultivados con sangre tratada con Ficoll-hypaque (sin leucocitos) y de sangre no infectada (sin parásitos). Se incluyó un control que consistió en sangre infectada a la que no se agregó ^3H -hipoxantina (línea base). El ensayo fue hecho con todos los medicamentos y todas las concentraciones predeterminadas (cuadro 1), usando la cepa FCB1.

Cuadro 1. Rangos de concentración de medicamentos usados en los microensayos radiométrico y microscópico.

		Concentraciones del medicamento (μM)					
CQ	0	0,0114	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6
AQ	0	0,004	0,015	0,05	0,1	0,25	0,4
Q	0	0,05	0,15	0,3	0,5	0,8	1,6
MQ	0	0,032	0,064	0,15	0,25	0,4	
H	0	0,001	0,004	0,015	0,03	0,06	
P	0	0,002	0,008	0,016	0,065		
S	0	0,16	0,64	1,3	5,2		

Las concentraciones sombreadas corresponden a los umbrales de resistencia establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS). CQ, cloroquina; AQ, amodiaquina; Q, quinina; MQ, mefloquina; H, halofantrina; P, pirimetamina; S, sulfadoxina.

Efecto del estadio de desarrollo del parásito en que es agregada la ^3H -Hipoxantina

Para evaluar este factor se agregó la marca en dos momentos diferentes a dos experimentos simultáneos. En uno se adicionó la ^3H -hipoxantina al inicio del ensayo en estadio de anillos (± 18 horas de desarrollo) y en el otro a las 32 horas de desarrollo en estadio de trofozoito.

Efecto de la parasitemia y el hematocrito ajustados

La parasitemia se evaluó en un rango entre 0.1% y 5%, para establecer si la prueba podía aplicarse a aislamientos con parasitemias muy bajas o si muestras con conteos muy altos debían ser diluidas. Para determinar el efecto del hematocrito se diseñaron experimentos en los que este parámetro varió en un rango entre 0.5% y 5%.

Comportamiento de diferentes cepas de *P. falciparum* en la prueba

La prueba radiométrica fue aplicada a varios aislamientos de *P. falciparum* de diversos orígenes geográficos; de Sur América FCB1, FCB2 (Colombia) y 7G8 (Brasil), de Asia T4 (Tailandia) y Camboya (Camboya) y de Africa FCR3 (Gambia) y Palo Alto (Uganda).

Selección de pacientes para aplicar la prueba radiométrica

Las muestras fueron obtenidas durante dos visitas a la ciudad de Villavicencio, una a la ciudad de Buenaventura y desde pacientes remitidos al Hospital Militar en Bogotá. Los criterios de inclusión fueron diagnóstico positivo para *P. falciparum*, edad superior a 12 años y aceptación voluntaria para participar en el estudio. Los criterios de exclusión fueron infección mixta, embarazo, diagnóstico clínico de malaria severa, tratamiento con fármacos durante las dos semanas anteriores y parasitemia superior a 2%. Se tomó una muestra de orina y una muestra de sangre venosa que fue dividida en dos alícuotas; una fue transportada a temperatura ambiente y la otra sobre hielo seco (19). En el laboratorio las muestras fueron lavadas tres veces con RPMI-1640 y usadas inmediatamente en el ensayo radiométrico. La presencia de antimaláricos fue detectada en orina por medio de la prueba de Lelijveld, J. y Kortmann, H. y el ensayo de la lignina (19,21).

Resultados y discusión

Medicamentos

Halofantrina, pirimetamina y sulfadoxina fueron disueltas en etanol 70%, ácido láctico 5% y DMSO respectivamente. Para determinar el efecto de estos solventes los parásitos fueron mantenidos en cultivo con estos compuestos en ausencia de los medicamentos; no se observó efecto alguno (datos no mostrados).

Medios modificados

No hubo diferencias importantes en la morfología o en el porcentaje de reinvasión de los parásitos cultivados en alguno de los dos medios modificados o en el RPMI-1640 comercial. Esto demostró que al menos durante 72 horas los medios modificados podían sostener el cultivo y por tanto el ensayo (datos no mostrados).

Efectos de las células blancas

No solo no hubo una diferencia significativa sobre los valores de IC_{50} establecidos para los cultivos mantenidos en presencia o ausencia de células blancas, sino que también el sistema con sangre no infectada tuvo una incorporación cercana al control de sangre infectada sin marca (línea base); esto indicó que el efecto observado en

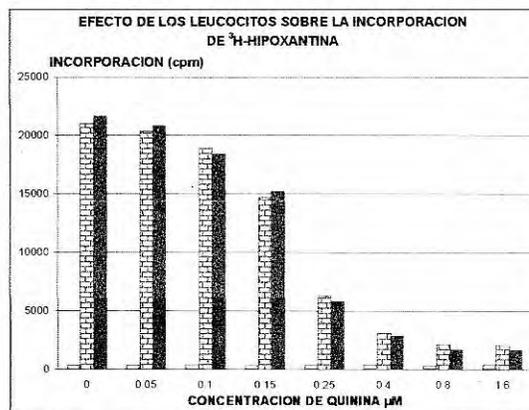


Figura 1. Efecto de las células blancas sobre la incorporación de ^3H -Hipoxantina de *Plasmodium falciparum*. La prueba se hizo en presencia de diferentes concentraciones de quinina, con tres sistemas en paralelo. Sangre sin parásitos (□), un cultivo de la cepa FCB1 mantenido con sangre no tratada con ficoll-hipaque, es decir con leucocitos (▤) y un cultivo de la cepa FCB1 mantenido con sangre tratada con ficoll-hipaque, es decir sin leucocitos (■).

estos ensayos fue independiente de la presencia o ausencia de leucocitos en el cultivo (figura 1). Con base en estos resultados se estableció que las muestras de cultivos o pacientes podían ser usadas en la prueba sin necesidad de eliminar previamente las células blancas.

Efectos del estadio de desarrollo en que es adicionada la ^3H -Hipoxantina

El ensayo se consideró pertinente porque en algunas pruebas hechas con la cepa 7G8, el valor de IC_{50} varió significativamente dependiendo del estadio de desarrollo en que fue agregada la marca radioactiva. Por razones desconocidas el ciclo de vida de la cepa 7G8 se prolongó ocasionalmente a 72 horas y en esas oportunidades la cepa exhibió una resistencia mucho más alta (IC_{50} para cloroquina = $1.15\mu\text{M}$) que la observada cuando el ciclo tuvo la duración usual de 48 horas (IC_{50} para cloroquina = $0.545\mu\text{M}$). Ensayos posteriores con la cepa FCB2 demostraron que los valores de IC_{50} determinados son independientes del estadio de desarrollo en que es agregada la marca radioactiva (cuadro 2) y que el comportamiento de la cepa 7G8 fue ocasionado por características de la cepa misma y no por problemas en la aplicación de la prueba.

Cuadro 2. Valores del IC_{50} para la cepa FCB2 de acuerdo al estadio de desarrollo en que es agregada la ^3H -Hipoxantina.

Cepa	Medicamento	Adición de la ^3H -Hipoxantina	
		En anillos	En trofozoitos
FCB2	Cloroquina	$\text{IC}_{50} = 0,54\mu\text{M}$	$\text{IC}_{50} = 0,54\mu\text{M}$
FCB2	Amodiaquina	$\text{IC}_{50} = 0,14\mu\text{M}$	$\text{IC}_{50} = 0,13\mu\text{M}$

La ^3H -hipoxantina fue adicionada en estadio de anillos o en estadio de trofozoitos en experimentos simultáneos.

Relación entre la concentración de ^3H -Hipoxantina y la parasitemia inicial ajustada

Se hizo un ensayo para determinar el límite de sensibilidad de la prueba incrementando la cantidad de ^3H -hipoxantina, a medida que la parasitemia iba disminuyendo. De acuerdo con los resultados mostrados en la cuadro 3 se decidió usar $0.09\mu\text{Ci}$ por pozo para aislamientos mantenidos en condiciones de cultivo "in vitro",

$0.25\mu\text{Ci}$ para aislamientos obtenidos desde pacientes con parasitemias $\geq 0.3\%$ y $0.45\mu\text{Ci}$ para aislamientos con parasitemias $\geq 0.1\%$. Si se tienen cultivos con parasitemias inferiores a 0.1% , se debe usar una mayor concentración de marca radioactiva para alcanzar una incorporación de 2000cpm o más en el control sin medicamento; sin embargo, los resultados no son interpretables porque el ruido de fondo que aparece no permite establecer diferencias significativas entre la incorporación del control sin medicamento y la incorporación a lo largo del rango de concentraciones. Se estableció entonces que la parasitemia límite inferior que puede usarse en el ensayo radiométrico es 0.1% .

Cuadro 3. Relación entre la ^3H -Hipoxantina adicionada y la parasitemia inicial ajustada en la prueba.

^3H -hipoxantina por pozo	Parasitemia Inicial	Incorporación en el control (cpm)
$0,09\mu\text{Ci}$	3,00%	28893
$0,09\mu\text{Ci}$	1,50%	20743
$0,09\mu\text{Ci}$	0,70%	12263
$0,25\mu\text{Ci}$	0,35%	9809
$0,45\mu\text{Ci}$	0,20%	3668
$0,45\mu\text{Ci}$	0,10%	2200
$0,65\mu\text{Ci}$	0,08%	2000 *
$0,90\mu\text{Ci}$	0,08%	2500 *

La prueba es aceptada solo cuando la lectura en el control sin medicamento es = 2000cpm (cuentas por minuto). * El ruido de fondo en el ensayo es cercano a 2000cpm .

Evaluación del efecto de la parasitemia inicial ajustada

En la cuadro 4 se muestran los resultados de las pruebas hechas con cloroquina sobre la cepa FCB1 tanto con el método radiométrico como con el método microscópico. Como parasitemias de 0.1% son el límite de detección de la prueba radiométrica, toda muestra con parasitemia inferior a 0.1% fue analizada solo por el método microscópico. Esta situación no representó una desventaja del método radiométrico frente al método microscópico tradicional, ya que los datos obtenidos con este último ensayo no fueron tampoco interpretables al usar aislamientos con parasitemias inferiores a 0.1% . En otras palabras,

Cuadro 4. Efecto de la parasitemia inicial ajustada sobre los valores de IC_{50} .

Parasitemia Inicial	IC_{50}	
	Método Radiométrico	Método Microscópico
0,2 %	0,40 μ M	0,44 μ M
0,5 %	0,43 μ M	0,47 μ M
1,0 %	0,47 μ M	0,50 μ M
2,5 %	0,51 μ M	0,53 μ M
5,0 %	0,65 μ M	0,67 μ M

Efecto de la cloroquina sobre la cepa FCB1.

para pruebas microscópicas con parasitemias iniciales inferiores a 0.1%, las bajas parasitemias encontradas en los controles sin medicamento hicieron que los conteos tuvieran que ser mucho más minuciosos, aumentado el número de campos microscópicos. Parasitemias iniciales inferiores a 0.085% produjeron resultados similares al del control sin medicamento, es decir que no fue posible establecer diferencia alguna en todo el rango de concentraciones usado. Con base en los resultados anteriores se concluye que las muestras obtenidas desde pacientes deben tener parasitemias iguales o superiores a 0.1% e inferiores a 2% (criterio de exclusión). Considerando que el propósito de la prueba es hacer un acercamiento cuantitativo al problema y que las diferencia en los valores de IC_{50} pueden ser significativas cuando las parasitemias fluctúan en un rango amplio, es recomendable diluir las muestras 1:1 en RPMI (sin hipoxantina, PABA 0.5 μ g/l y ácido fólico 10 μ g/l) cuando la parasitemia sea superior a 1%.

Evaluación del efecto del Hematocrito ajustado

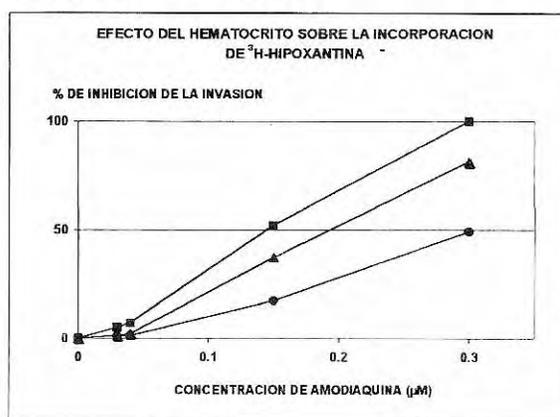
Para hacer este ensayo se determinó el efecto de la amodiaquina sobre la cepa FCB2 ajustando la parasitemia inicial en 1% y el volumen final en cada pozo de la microplaca en 150 μ l. Usando un hematocrito de 5%, la cantidad aproximada de parásitos es 7.5×10^5 y se necesita una concentración de 0.22 μ M de amodiaquina para producir una inhibición del 50% en la invasión. Con un hematocrito de 0.5%, el número de

parásitos se reduce a 7.5×10^4 y una concentración de 0.12 μ M del medicamento es suficiente para producir la misma inhibición (cuadro 5). Este efecto está representado en la figura 2, donde la concentración más alta del medicamento produce mayor inhibición en el ensayo con hematocrito 0.5%, que en el ensayo con hematocrito 5.0%. La gran diferencia en el número de parásitos hace que la misma concentración del fármaco produzca efectos diferentes en los dos sistemas. Se eligió el hematocrito 1% para adelantar las pruebas, no solo porque permite mantener el cultivo hasta reinvasión sin necesidad de hacer cambio de medio, sino también porque es suficiente para hacer extendidos hematológicos con facilidad.

Cuadro 5. Efecto del hematocrito sobre los valores de IC_{50} determinados en el ensayo radiométrico.

Hematocrito	Parásitos por pozo	IC_{50}
0,5%	$7,5 \times 10^4$	0,12 μ M
1,0%	$1,5 \times 10^5$	0,13 μ M
2,0%	$3,0 \times 10^5$	0,15 μ M
3,0%	$4,5 \times 10^5$	0,16 μ M
4,0%	$6,0 \times 10^5$	0,20 μ M
5,0%	$7,5 \times 10^5$	0,22 μ M

Efecto de la amodiaquina sobre la cepa FCB2; la parasitemia fue ajustada en 1% y el volumen total fue de 150 μ l por pozo. El número de parásitos fue calculado asumiendo 1×10^7 glóbulos rojos por μ l de sangre empacada.

**Figura 2.** Efecto del hematocrito sobre la incorporación de 3 H-Hipoxantina de *Plasmodium falciparum*. Efecto de la amodiaquina sobre la cepa FCB2. Se hicieron 3 experimentos simultáneos ajustando el hematocrito en 0.5% (■), 1.0% (▲) y 5.0% (●) respectivamente.

Correlación entre la prueba radiométrica y la prueba microscópica

Se hizo una correlación entre los valores de IC_{50} obtenidos en las pruebas microscópica y radiométrica; en la cuadro 6 puede verse que los resultados hallados para los dos métodos fueron similares usando cloroquina y la cepa FCB2. Comportamientos semejantes fueron encontrados para la misma cepa con amodiaquina y para las otras cepas con los dos medicamentos (resultados no mostrados). Dada la similitud de los datos, es evidente que las pruebas microscópica y radiométrica pueden ser usadas indistintamente para determinar los valores de IC_{50} de diferentes medicamentos.

Cuadro 6. Valores de IC_{50} determinados simultáneamente por medio de los ensayos radiométrico y microscópico.

Experimento	IC_{50}	
	Método Radiométrico	Método Microscópico
1	0,56 μ M	0,56 μ M
2	0,54 μ M	0,56 μ M
3	0,56 μ M	0,58 μ M
4	0,50 μ M	0,50 μ M
5	0,54 μ M	0,56 μ M
X	0,54 μ M	0,55 μ M
S	0,02 μ M	0,03 μ M

(1,2,3,4,5): cinco experimentos distintos usando cloroquina sobre la cepa FCB2. X: promedio de los valores de IC_{50} para los cinco experimentos. S: desviación estandar.

Aplicación de la prueba sobre diferentes cepas de *Plasmodium falciparum* con diferentes medicamentos

En el cuadro 7 se encuentra el promedio de los valores de IC_{50} determinados en varios experimentos para las cepas FCB1, FCB2, FCR3, 7G8, T4, Palo Alto y Camboya, usando cloroquina, amodiaquina, mefloquina, quinina, halofantrina y la combinación pirimetamina-sulfadoxina. Todas las cepas fueron resistentes a cloroquina amodiaquina y mefloquina. A quinina fue sensible la cepa FCB1, T4 se mantuvo en el umbral de resistencia y 7G8, Camboya, FCB2, FCR3 y Palo Alto fueron resistentes. FCB1,

Cuadro 7. Comportamiento de varias cepas de *Plasmodium falciparum* en la prueba radiométrica.

Cepa	IC_{50} (μ M)					
	CQ	AQ	MQ	Q	H	P-S
FCB1	0,47	0,09	0,16	0,17	0,0018	0,002/0,160
FCB2	0,54	0,13	0,16	0,91	0,0013	0,0059/0,475
FCR3	0,45	0,15	0,31	1,24	0,0095	0,0053/0,425
T4	0,54	0,09	0,16	0,48	0,0020	0,017/1,35
Palo Alto	0,68	0,16	0,30	1,01	0,0015	0,0069/0,55
7G8	0,55	0,27	0,15	0,70	0,0019	0,018/1,40
Camboya	0,55	0,14	0,13	0,54	0,0070	0,009/0,75

CQ, Cloroquina; AQ, Amodiaquina; MQ, Mefloquina; Q, Quinina; H, Halofantrina; P-S Pirimetamina-Sulfadoxina. Las concentraciones sombreadas corresponden a aislamientos resistentes.

FCB2, T4, Palo Alto y 7G8 fueron sensibles a halofantrina mientras que Camboya y FCR3 fueron resistentes. Para la combinación pirimetamina-sulfadoxina, FCB1, FCB2, FCR3, Palo Alto y Camboya fueron sensibles; T4 y 7G8 resistentes. En conclusión la prueba desarrollada fue aplicable a cualquier aislamiento y eficaz para detectar resistencia o sensibilidad a varios fármacos simultáneamente. La cepa 7G8 tuvo un comportamiento variable, exhibiendo valores de IC_{50} entre 0.54 y 1.15 μ M para cloroquina, entre 0.2 y 1.0 μ M para quinina, entre 0.1 y 0.4 μ M para mefloquina y entre 0.008/0.64 y 0.018/1.4 μ M para la combinación pirimetamina-sulfadoxina; aunque todas las cepas usadas eran clones puros de laboratorio, el complejo comportamiento de 7G8 parecía ser producido por la presencia de dos o más poblaciones de *P. falciparum* en ese cultivo. Para confirmar esta hipótesis, ADN de la cepa 7G8 fue usado para detectar (por PCR) los alotipos del bloque 2 del gen MSP-1 (proteína 1 de superficie del merozoíto). Este bloque es variable y dentro de él se han encontrado 3 formas polimórficas denominadas K1, MAD20 y RO33 (22,23); un clon o aislamiento puro debe exhibir tan solo uno de los tres tipos alélicos. La aparición de productos para más de un alotipo confirmó que la cepa 7G8 de la cual disponíamos era una mezcla de al menos dos poblaciones de *P. falciparum* (datos no mostrados).

No hay ninguna relación clara entre resistencia a un medicamento y otro, es decir que conocer el comportamiento de una cepa en presencia de un fármaco no permite predecir la respuesta a otro(s) medicamento(s). Por ejemplo: se ha propuesto que a medida que disminuye la resistencia a cloroquina, aumenta la resistencia a mefloquina y que estos aislamientos con poca sensibilidad a mefloquina por lo general presentan también poca sensibilidad a halofantrina (24-27); sin embargo la cepa más resistente a cloroquina exhibió también gran resistencia a mefloquina y fue de las más sensibles a halofantrina (Palo Alto). Aunque la única relación aparente es la resistencia simultánea a cloroquina y amodiaquina, es necesario tener mayor número de muestras para determinar la frecuencia de ese comportamiento y verificar si las cepas CQ-S son también sensibles a amodiaquina. El paso siguiente fue aplicar la prueba sobre aislamientos colectados en campo.

Aplicación de la prueba sobre muestras de pacientes

Se presentaron varios inconvenientes al momento de coleccionar las muestras por situaciones como el alto porcentaje de pacientes con infecciones mixtas, los cortos tiempos de muestreo impuestos por la imposibilidad de criopreservar las muestras en campo, la automedicación, la edad de los pacientes que con frecuencia fueron niños menores de 12 años (parámetro de exclusión) y el temor de los pacientes a no recibir el tratamiento quimioterapéutico si aceptaban haber tomado antimaláricos con anterioridad. De las doce muestras colectadas 3 resultaron positivas en la prueba eosina-cloroformo (para detectar cloroquina, amodiaquina, mefloquina y quinina) y 4 en el ensayo de lignina (para detectar sulfadoxina); como esta última prueba produce reacción cruzada con varios medicamentos, el ensayo radiométrico fue adelantado (excepto con las muestras que fueron positivas también para la prueba eosina-cloroformo) teniendo presente este resultado. Adicionalmente, aunque la OMS recomienda transportar las muestras en hielo seco, solo unos pocos aislamientos sobrevivieron

a ese manejo; en nuestro caso la mejor alternativa fue mantener y transportar las muestras a temperatura ambiente. Aunque en algunos protocolos las muestras son primero adaptadas a condiciones de cultivo "in vitro" y luego usadas en los ensayos de resistencia, se ha demostrado con marcadores moleculares que un aislamiento cambia rápidamente cuando es mantenido en cultivo (28). En general, se recomienda adelantar inmediatamente los ensayos o congelar las muestras en N₂ líquido y transportarlas rápidamente para hacer la prueba con la mayor brevedad.

Las muestras de campo analizadas fueron resistentes a cloroquina y amodiaquina y sensibles a mefloquina, quinina, halofantrina y pirimetamina-sulfadoxina. Al igual que para las cepas mantenidas en cultivo "in vitro", los aislamientos presentaron resistencia a cloroquina y a amodiaquina a un mismo tiempo y esto sugiere que quizá sí existe una relación entre la resistencia a estos medicamentos; sin embargo, es evidente que debe hacerse un extenso análisis antes de hacer una afirmación de este tipo.

En resumen, la prueba radiométrica tiene varias ventajas como la posibilidad de hacer una determinación cuantitativa de la resistencia, la versatilidad que permite probar varios medicamentos simultáneamente, la corta duración del ensayo comparado con la prueba "in vivo", la rapidez con que puede analizarse un gran número de muestras en un corto tiempo, la reproducibilidad de los resultados y la sencillez técnica del ensayo. Sin embargo, la prueba no puede ser aplicada a pacientes que hayan tomado antimaláricos recientemente y es necesario que los aislamientos se desarrollen en condiciones de cultivo "in vitro"; estas dos características reducen notablemente el rango de aplicación del ensayo.

Finalmente cabe anotar; primero, que la resistencia "in vitro" a pirimetamina y sulfadoxina es producida por mutaciones puntuales que generan alteraciones de aminoácidos en las enzimas Dihidrofolato reductasa (DHFR) y Dihidropteroato sintetasa (DHPS) respectivamente (29-33); y segundo, que en la actualidad los ensayos de restricción enzimática

y PCR diseñados para detectar estas mutaciones, superan prácticamente todos los problemas ya mencionados de los microensayos tradicionales. Sin embargo, el desconocimiento de las bases moleculares de la resistencia a cloroquina, amodiaquina, mefloquina, quinina y halofantrina, lleva al uso de la prueba radiométrica para detectar la resistencia a estos medicamentos.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA). Agradecemos a Raúl Erazo de Tecnoquímicas S.A. y a Lucero de Cuervo de Laboratorios Roche, por la donación de la halofantrina y la mefloquina respectivamente; al Hospital Militar de Bogotá, al Instituto de Salud del Pacífico (INSALPA) y muy especialmente a Stella Buitrago, por su colaboración en la colección de aislamientos de *Plasmodium falciparum*.

Referencias

1. **WHO.** The World Health Report 1997. Geneva: World Health Organization.
2. **Wernsdorfer WH.** The development and spread of drug resistant Malaria. Parasitol. Today 1991;7:297-302.
3. **Slater AFG.** Chloroquine: Mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. Pharmac. Ther 1993;57:203-235.
4. **Cowman AF, Foote J.** Chemotherapy and drug resistance in malaria. Int. J. Parasitol 1990;20:503-513.
5. **Brown GV.** Chemoprophylaxis of malaria. Med. J. Australia 1993;159:187-196.
6. **White NJ.** The treatment of Malaria. England J. Med 1996;335:800-805.
7. **Rieckmann KH, Campbell GH, Sax LJ, Mrema JE.** Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An "in vitro" microtechnique. Lancet 1978;1:22-23.
8. **Nguyen P, Payne D.** Pyrimethamine sensitivity in *Plasmodium falciparum*: determination "in vitro" by a modified test. Bull. WHO 1980;58:909-12.
9. **Le-Bras J, Deloron P.** "In vitro" study of drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* evaluation of a new semi-micro-test. Am. J. Trop. Med. Hyg 1983;32:447-51.
10. **Nguyen P, Magloire R, Chin W.** A simple field kit for the determination of drug susceptibility in *Plasmodium falciparum*. Am. J. Trop. Med. Hyg 1983;32: 452-55.
11. **Spencer H, Watkins WM, Sixsmith DG, Koech DK, Chulay JD.** A new in vitro test for pyrimetamine-sulfadoxine susceptibility of *Plasmodium falciparum* and its correlation with in vivo resistance in Kenya. Bull. WHO 1984;62:615-21.
12. **Webster HK, Boudreau EF, Pavanad K, Yongvanitchit K, Pang LW.** Antimalarial drug susceptibility testing of *Plasmodium falciparum* in Thailand using a microdilution radioisotope method. Am. J. Trop. Med. Hyg 1985;34:228-35.
13. **Saiki RK, Gelfland DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al.** Primed-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988;239:487-49.
14. **Botstin P, White RL, Skolnick MH, Davis RW.** Construction of a genetic map in man using restriction fragments length polymorphism. Am. J. Human. Gen 1980;32:314-331.
15. **Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van-De-Lee T, Horners M, et al.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic acids Res 1995;23:4407-4414.
16. **Trager W, Jensen J.** Human malarial parasites in continuous cultures. Science 1976;193:673-75.
17. **Lambros C, Vanderberg J.** Synchronization of *Plasmodium falciparum* increased erythrocytes stage in culture. J. Parasitol 1979;8:47-9.
18. **Rojas MO, Wasserman M.** Temporal relationships on macromolecular synthesis during the asexual cell cycle of *Plasmodium falciparum*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg 1984;79:792-796.
19. **Wernsdorfer WH, Trigg PI.** Recent progress of malaria research: chemotherapy. Bull. WHO 1974;51:1569-1674.
20. **Gluzman IY, Krogstad DJ, Orjih AU, Nkangineme K, Wellems TE, Martin JT, et al.** A rapid "in vitro" test for Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. Am. J. Med. Hyg 1990;42:521-26.
21. **Lelijveld J, Kortmann H.** The eosin colour test of Dill and Glazco: a simple field tests to detect Chloroquine in Urine. Bull. WHO 1970;42:477-79.
22. **Snewin VA., Herrera M, Sanchez G, Schen A, Langsley G, Herrera S.** Polymorphism of the alleles of the merozoite surface antigens MSA1 and MSA2 in *Plasmodium falciparum* wild isolates from Colombia. Mol. Biochem. Parasitol 1991;49:265-276.
23. **Kaneko O, Kimura M, Kawamoto F, Ferreira MU, Tanabe K.** *Plasmodium falciparum*: Allelic variation in the merozoite surface protein 1 gene in wild isolates from southern Vietnam. Exp. Parasitol 1997;86:45-57.
24. **Ter-Kuile FO, Dolan G, Nosten F, Edstein MQ, Luxemburger C, Pharpun L, et al.** Halofantrine Vs Mefloquine in treatment of multidrug resistant falciparum malaria. Lancet 1993;341:1004-09.

25. **Wilson CM, Volkman SK, Thaithong S, Martin RK, Kyle DE, Milhous WK, et al.** Amplification of *pfmdr1* associated with Mefloquine and Halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Mol. Biochem. Parasitol* 1993;57:151-60.
26. **Barnes DA, Foote SJ, Galatis D, Kemp DJ, Cowman AF.** Selection for high-level Chloroquine resistance results in deamplification of the *pfmdr1* gene and increased sensitivity to mefloquine in *Plasmodium falciparum*. *EMBO J* 1992;11:3067-75.
27. **Peel SA, Bright P, Yount B, Handy J, Baric R.S.** A strong association between Mefloquine and Halofantrine resistance and amplification, overexpression, and mutation in the P-Glycoprotein gene Homolog (*pfmdr*) of *Plasmodium falciparum* in vitro. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1994;51:648-658.
28. **Viriyakosol S, Siripoon N, Zhu XP, Jarra W, Seugorn A, et.al.** *Plasmodium falciparum*: Selective growth of subpopulations from field samples following in vitro culture, as detected by the polymerase chain reaction. *Exp. Parasitol* 1994;79:517-525.
29. **Peterson DS, Walliker D, Wellem TE.** Evidence that point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in falciparum malaria. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 1988;85:9114-18.
30. **Brooks DR, Wang P, Read M, Watkins WM, Sims FG, Hyde JE.** Sequence variation of the hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase: didydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. *Eur. J. Biochem* 1994;224:397-405.
31. **Wang P, Brooks DR., Sims PF, Hyde JE.** A mutation-specific PCR system to detect sequence variation in the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol* 1995;71:115-25.
32. **Plowe CV, Cortese JF., Djimde A, Nwanyanwu OC, Watkins WM, Winstanley PA, et al.** Mutations in *Plasmodium falciparum* Dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *JID* 1997;176:1590-6.
33. **Giraldo LE, Acosta MC, Labrada LA, Praba A, Montenegro J, Saravia NG, Krogstad DJ.** Frequency of the *asn-108* and *thr -108* point mutations in the dihydrofolate reductase gene in *Plasmodium falciparum* from southwest Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1998;59:124-128.