

RESISTÊNCIA À PIRIMETAMINA E AO CICLOGUANIL NA ÁFRICA OCIDENTAL – presença da mutação 59^{Arg} no gene *dhfr* do *Plasmodium falciparum**

L. PINHEIRO, V. E. ROSÁRIO

Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais. Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Lisboa

RESUMO/SUMMARY

Na costa ocidental de África (Guiné-Bissau, São Tomé e Príncipe e Angola) a eficácia do uso da cloroquina como antimalárico decresceu e a escolha de fármacos para uso profilático e/ou terapêutico é muitas vezes baseada em alternativas ditas de segunda linha como acontece com o Fansidar® (pirimetamina/sulfadoxina). A prevalência das mutações pontuais existentes no gene *dhfr-ts*, conferidoras do fenótipo resistente à pirimetamina, em amostras parasitadas com *P. falciparum* destas áreas geográficas é desconhecida. Neste estudo usou-se a técnica de PCR/RFLP para determinar em 33 amostras de *P. falciparum*, colhidas no terreno e não submetidas a cultura *in vitro*, o genótipo sensível/resistente à pirimetamina e ao cicloguanil. A análise dos fragmentos hidrolisados mostrou uma prevalência de 63,63% da mutação Ser¹⁰⁸Asn¹⁰⁸ indicadora de resistência à pirimetamina.

Palavras chave: resistência à pirimetamina, *dhfr-ts*

Presence of pyrimethamine and cycloguanil resistance genotype in West Africa – evidence of a single mutation 59^{Arg} in the *dhfr* gene of *Plasmodium falciparum*.

In 3 different geographical areas of West Africa (Guinea-Bissau, S. Tomé e Príncipe and Angola) where chloroquine activity against *P. falciparum* seems to have decreased, the choice for prevention and/or treatment of malaria is often based on second line drugs such as Fansidar® (pyrimethamine/sulphadoxine). Little is known about the genetic basis of *dhfr-ts* gene mutations from parasites from these areas. In this study a PCR/RFLP methodology was used to screen 33 field isolates, without intervening steps of *in vitro* culture, for the pyrimethamine and cycloguanil sensitive/resistant genotype of *P. falciparum*. Analysis of the digested fragments revealed a prevalence of a Ser¹⁰⁸ to Asn¹⁰⁸ change in 63.63% of the samples tested.

Key-words: pyrimethamine-resistance, *dhfr-ts*

* Apoio financeiro dos projectos STRIDE (STRDA/C/SAU/348/92) e STD3 (TS3-CT93-0224)

INTRODUÇÃO

A resistência farmacológica do *Plasmodium falciparum* é um dos problemas mais cruciais nos programas de controlo da malária. Com o aumento contínuo da resistência à cloroquina no continente africano o uso de antimaláricos do grupo dos antifolatos (pirimetamina e proguanil) tem tendência a aumentar uma vez que o uso de outro tipo de fármacos de eficácia comprovada permanece muito dispendioso¹. No entanto, o tratamento eficaz da malária a *P. falciparum* com a pirimetamina tem sido comprometido com o aparecimento de parasitas resistentes àquele antimalárico. Pouco após a introdução deste fármaco nos regimes terapêuticos e/ou profiláticos no continente africano, há cerca de quatro décadas, começaram a surgir os primeiros relatos de falência terapêutica². Ao contrário do que acontece com a cloroquina, a ocorrência de resistência aos fármacos do grupo dos antifolatos é esporádica, multifocal e associada à pressão farmacológica numa dada área geográfica³. Estudos prévios demonstraram que a resistência do *P. falciparum* à pirimetamina estava associada a várias mutações pontuais na região da dihidrofolato-reductase (dhfr) no gene dihidrofolato reductase-timidilato sintetase (*dhfr-ts*)⁴⁻⁶. A mutação pontual 108^{Asn} é suficiente para conferir resistência à pirimetamina e os parasitas que tenham três mutações diferentes no mesmo gene (108^{Asn}, 51^{Ile} e 59^{Arg}) são 16 a 32 vezes mais resistentes ao fármaco do que os parasitas que possuam apenas a mutação 108^{Asn}⁵. Estudos biomoleculares sobre a resistência diferencial entre a pirimetamina e o cicloguanil (metabolito activo do proguanil) mostraram que o par de mutações 108^{Thr} e 16^{Val} ocorriam em conjunto nos parasitas cicloguanil-resistentes mas pirimetamina-sensíveis⁵. Alguns autores evidenciaram também o aparecimento da mutação 164^{Leu} associada à mutação 108^{Asn} em clones e amostras de parasitas resistentes quer à pirimetamina quer ao cicloguanil⁶. Existe uma correlação significativa entre a inibição à pirimetamina e ao cicloguanil em mutantes do gene *dhfr*, *in vitro*, e amostras parasitas, *in vivo*⁷.

No nosso trabalho analisámos 33 amostras de sangue provenientes da costa ocidental de África no sentido de identificar a presença de mutações pontuais no gene *dhfr* do *Plasmodium falciparum*. Os resultados obtidos mostraram uma prevalência da mutação ^{Ser}108^{Asn} em 63,63% das amostras testadas.

MATERIALE MÉTODOS

Colheita das amostras: As amostras de sangue, provenientes de doentes da África ocidental (Guiné-Bissau, São Tomé e Príncipe e Angola), foram obtidas por picada digital. Foram realizados uma gota espessa e um esfregaço

de sangue para determinação microscópica da espécie de plasmódio infectante e respectiva parasitemia e colheita de duas gotas de sangue em tiras de papel de filtro nº 4 MM que secaram ao ar e foram guardadas individualmente. Neste estudo, após realização de uma PCR para exclusão das amostras com infecções mistas⁸, foram usadas apenas as amostras de sangue que continham *P. falciparum*.

Preparação e amplificação de ADN: O ADN foi extraído directamente do papel de filtro pelo método de fenol-clorofórmio⁸. O método de dupla amplificação genética (PCR) seguido de hidrólise enzimática (RFLP) que usámos foi o descrito por Duraisingh⁹. De modo sumário, adicionaram-se 2µl de ADN purificado a 50µl de solução de reacção da PCR. Na primeira reacção de PCR amplificou-se um segmento do gene *dhfr* com 648 pares de bases (pb). Nas duas reacções de amplificação subsequentes usaram-se 2µl de produto amplificado previamente para cada uma delas e dois pares de sequências iniciadoras diferentes. Uma das reacções tinha como objectivo identificar as mutações 59 Arg, 108^{Ser} e 108^{Thr} presentes num segmento do gene *dhfr* com 326 pb, a outra reacção permitia amplificar os segmentos do gene *dhfr* com 522 pb que continham as mutações 16^{Ala}, 51^{Asp}, 108^{Asp} e 164^{Leu}. Em todas as reacções de amplificação foram usados controlos negativos e positivos.

Polimorfismos de hidrólise por enzimas de restrição (RFLP): Dependendo da intensidade das bandas de electroforese do gel de controlo dos produtos amplificados usaram-se 2-5 µl de produto amplificado em cada incubação com as diferentes enzimas de restrição (New England Biolabs, Beverly MA, USA). O produto amplificado contendo 522 pb foi hidrolisado com as enzimas *DraI* para identificar a mutação 164^{Leu} *BsrI* para 108^{Asp}, *NlaIII* para 16^{Ala} e *Tsp509I* para 51^{Asp}. Para a análise das mutações no segmento de 326 pb usaram-se as enzimas *AluI* para detectar a mutação 108^{Ser}, *BstNI* para 108^{Thr} e *XmnI* para 59^{Arg}. Como controlos do PCR e das diferentes hidrólises enzimáticas foi usado ADN de amostras de *P. falciparum* originárias de diferentes áreas, nomeadamente as estirpes K1 (Tailândia), FC27 (Papua Nova Guiné), FCR3 (Gâmbia), W2 (Indochina), V1/S (Vietname) e 7G8 (Brazil). Todos os produtos de hidrólise foram separados por electroforese em gel de agarose a 2%.

RESULTADOS

As mutações encontradas no gene *dhfr* das 33 amostras de *P. falciparum* estudadas estão esquematizadas no quadro I.

Vinte e uma das 33 amostras (63,63%) continham a mutação 108^{Asn} característica da resistência à pirimetamina.

Quadro I - Prevalências das mutações pontuais no gene *dhfr* de 33 amostras de *P. falciparum* da África Ocidental.

	Origem			Nº amostras	Susceptibilidade farmacológica esperada
	Guiné-Bissau	S. Tomé Príncipe	Angola		Pirimet / Ciclog
108Ser	7	3	1	11	Não mutado
108Asn	2	7	1	10	Pirimet R / Ciclog S
108Thr	0	0	0	0	Pirimet S
108Asn + 51Ile + 59Arg	3	0	2	5	Pirimet R +++ / Ciclog S ++
108Asn + 51Ile	0	0	4	4	Pirimet R ++ / Ciclog R+
108Asn + 59Arg	0	1	1	2	Pirimet R + / Ciclog R
59Arg	1	0	0	1	Ciclog R
16Val	0	0	0	0	NA
164Leu	0	0	0	0	NA
108Asn + 164Leu	0	0	0	0	Pirimet R / Ciclog R
108Thr + 16Val	0	0	0	0	Pirimet S / Ciclog R++
Total	13	11	9	33	

NA - Não Avaliável

Onze destas 21 amostras (52,38%) tinham esta mutação associada à mutação 51^{Ile} e/ou 59^{Arg}, padrão este implicado na presença de níveis mais elevados de resistência quer à pirimetamina quer ao cicloguanil^{3,6}. Nenhuma das amostras continha a mutação 108^{Thr} associada a 16^{Val} implicadas na resistência ao cicloguanil. A presença das alterações 164^{Leu} e 108^{Asn}, promotoras de uma resistência cruzada entre a pirimetamina e o cicloguanil⁶ não foi encontrada neste estudo. Uma das 33 amostras analisadas tinha a mutação 59^{Arg} isolada.

DISCUSSÃO

A relação entre o uso dos antifolatos e a selecção de génotipos resistentes é um motivo importante para a realização de estudos de epidemiologia molecular. Estes permitem a fácil determinação de alterações possíveis nos padrões genéticos de amostras colhidas no terreno em estudos longitudinais. O uso de métodos de biologia molecular é dispendioso e tecnicamente sofisticado para ser usado individualmente no diagnóstico da malária e da resistência aos antimaláricos. No entanto, os resultados de estudos epidemiológicos sobre a prevalência de génotipos resistentes aos fármacos numa determinada região endémica fornece às autoridades sanitárias locais informações importantes. Desta forma é possível modificar os esquemas terapêuticos e/ou profilácticos em uso nessa região actuando de modo mais eficaz contra a malária.

A resposta farmacológica de clones de *P. falciparum* adaptados a cultura *in vitro* é uma técnica fiável mas morosa e pode ser substituída pelo uso da PCR seguida de hidrólise enzimática (RFLP). Este procedimento técnico permite separar os parasitas resistentes dos parasitas sensíveis de

modo específico e sensível¹¹. O nosso objectivo fundamental neste estudo foi determinar a prevalência de *P. falciparum* pirimetamina-resistentes e cicloguanil-resistentes, provenientes da África ocidental, com base na determinação dos padrões mutacionais no gene *dhfr*. Das 33 amostras analisadas 63,63% tinham mutações pontuais naquele gene responsáveis pela resistência à pirimetamina. Destas, 11 amostras (52,38%) tinham uma segunda ou mesmo uma terceira alteração na sequência de amino-ácidos (51^{Ile} e/ou 59^{Arg}) implicadas no aumento progressivo dos níveis de resistência farmacológica^{3,6}. Sabemos que enquanto os parasitas pirimetamina-resistentes com múltiplas mutações no gene *dhfr* têm uma reactividade cruzada variável com o cicloguanil⁶, os parasitas cicloguanil-resistentes duplamente mutados (16^{Val} e 108^{Thr}) são sensíveis à pirimetamina. No nosso trabalho não detectámos nenhuma destas duas mutações implicadas na resistência ao cicloguanil. No entanto, a mutação 59^{Arg} isolada foi detectada numa única amostra. Um estudo prévio⁷ sugere que todas as estirpes resistentes à pirimetamina são originadas a partir de mutações pontuais sequenciais da 108^{Asn}, considerada uma mutação precursora. Estes autores especulam também que os mutantes simples do *dhfr*, com excepção dos que têm a mutação 108^{Asn}, têm pouca probabilidade de ter emergido na natureza uma vez que as suas propriedades catalíticas parecem ser insuficientes para manter uma síntese adequada de ADN. Embora os parasitas com a mutação simples 108^{Asn} pareçam melhor adaptados à sobrevivência em ambientes de elevada pressão de selecção induzida pelo uso de antifolatos, não podemos subestimar a eficiência catalítica demonstrada naquele estudo⁷ pelos indivíduos que continham a alteração genética 59^{Arg}. Supomos que a amostra de *P. falciparum* do nosso estudo que contém essa alteração no gene *dhfr* seja resistente ao cicloguanil como acontece com o a amostra C59R do trabalho de Sirawaraporn⁷. A capacidade de ligação dos antifolatos à enzima *dhfr* é provavelmente mais afectada do que a actividade enzimática em si e este facto poderá explicar o baixo K_i para ambos os fármacos no mutante C59R. Em condições naturais, a única mutação isolada presente no *P. falciparum* é a 108^{Asn}. Contudo, o uso de técnicas de biologia molecular em estudos microepidemiológicos evidenciará diferentes padrões genéticos no gene *dhfr*. Um estudo recente em 50 amostras de *P. falciparum* provenientes do Vietname detectou uma nova mutação (140^{Leu}) associada à resistência ao cicloguanil numa única amostra¹². O estudo da susceptibilidade farmacológica de amostras de *P. falciparum* colhidas, entre 1992 e 1994, de viajantes provenientes da África ocidental sob diferentes

regimes profiláticos¹³ mostrou uma resistência global de 50% nos grupos de indivíduos que tomavam cicloguanil ou cicloguanil e cloroquina. Um trabalho realizado com amostras de campo na Nigéria¹⁴ detectou uma prevalência de 72,22% da mutação 108^{Asn}. Os nossos resultados indicam uma prevalência de 52,38% de genótipos resistentes ao cicloguanil e de 63,63% de genótipos resistentes à pirimetamina na África Ocidental o que, de algum modo, é concordante com os dados obtidos pelos grupos anteriormente referidos. Neste momento não existe nenhum consenso em relação aos regimes profiláticos para as regiões de África onde a resistência à cloroquina já está documentada, como acontece para algumas regiões da África Ocidental. No entanto, um grupo de especialistas europeus¹⁵ recomenda o uso da cloroquina associada ao proguanil como uma alternativa para a profilaxia da malária nas regiões a sul do Sara onde a malária é endêmica e a resistência à cloroquina está disseminada.

BIBLIOGRAFIA

1. BLOLAND PB, LACKRITZ EM, KAZEMBE PN, WERE J B O, STEKETEE R, CAMPBELL CC: Beyond chloroquine: Implications of drug resistance for evaluating malaria therapy efficacy and treatment policy in Africa. *J Infect Diseases* 1993;167:932-937
2. ARCHIBALD HM: The appearance of *P. falciparum* resistant to pyrimethamine in a Northern Nigerian village. *West African Medical Journal* 1960;9:21-25
3. FOOTE S J, GALATIS D, COWMAN F: Amino acids in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 1990;87:3014-3017
4. COWMAN AF, MORRY MJ, BIGGS BA, CROSS GA, FOOTE SJ: Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 1988;85:9109-9114
5. PETERSON DS, WALLIKER D, WELLEMS TE: Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in falciparum malaria. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*. 1988;85:9114-9118
6. PETERSON DS, MILHOUS WK, WELLEMS TE: Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*. 1990;87:3018-3022
7. SIRAWARAPORN W, SATHITKUL T, SIRAWARAPORN R, YUTHAVONG Y, SANTI D: Antifolate-resistant mutants of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. *Proceedings of Natural Academy of Sciences, USA*. 1997;94:1124-1129
8. SNOUNOU G, PINHEIRO L, GONÇALVES A, FONSECA L, DIAS F, BROWN N, ROSÁRIO VE: The importance of sensitive detection of malaria parasites in the human and insect hosts in epidemiological studies, as shown by the analysis of field samples from Guinea Bissau. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1993; 87:649-653
9. DURASINGH MT, DRAKELEY CJ, MULLER O, BAILEY R, SNOUNOU G, TARGETT G AT, GREENWOOD BM, WARHURST DC: Evidence for selection for the tyrosine-86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* by chloroquine and amodiaquine. *Parasitol* 1997;114:205-211
10. ZOLG JW, PLITT JR, CHEN G, PALMER S: Point mutation in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene as the molecular basis for pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitol* 1989;36:253-262
11. DE PÉCOULAS PE, BASCO LK, ABDALLAH B, DJÉ MK, LE BRAS J, MAZABRAUD A: *Plasmodium falciparum*: detection of antifolate resistance by mutation-specific restriction enzyme digestion. *Experimental Parasitol* 1995; 80:483-487
12. ZINDROU S, DUNG NP, SY ND, SKOLD O, SWEDBERG G: *Plasmodium falciparum*: mutation pattern in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase genes of Vietnamese isolates, a novel mutation, and coexistence of two clones in a Thai patient. *Experimental Parasitol* 1996;84:56-64
13. BASCO LK, DE PÉCOULAS PE, WILSON CM, LE BRAS J, MAZABRAUD A: Point mutation in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and pyrimethamine and cycloguanil resistance in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitol* 1995;69:135-138
14. ADAGU IS, WARHURST DC, OGALA WN, ABDU-AGUYE I, AUDU LI, BAMGBOLA FO, OVWIGHO UB: Antimalarial drug response of *Plasmodium falciparum* from Zaria, Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1995; 89:422-429
15. BRADLEY DJ, WARHURST DC: Malaria prophylactics. *BM J* 1995;310:709-714