

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DE LISBOA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Estudo da resistência aos anti-maláricos –
Desenvolvimento de um novo teste de sensibilidade
do *Plasmodium* spp., baseado na detecção de
hemozoína

Teresa Maria Monteiro Maurício Lopes Meira

Mestrado em Bioquímica
Bioquímica Médica

- 2009 -

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DE LISBOA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Estudo da resistência aos anti-maláricos –
Desenvolvimento de um novo teste de sensibilidade
do *Plasmodium* spp., baseado na detecção de
hemozoína

Teresa Maria Monteiro Maurício Lopes Meira

Dissertação orientada pelo Prof. Doutor Thomas Häscheid e pela
Prof.^a Doutora Margarida Meireles

Mestrado em Bioquímica
Bioquímica Médica

- 2009 -

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Doutor Thomas Häscheid, muito obrigada pela orientação, disponibilidade, apoio e por todos os dias me lembrar o que é a Ciência. À Prof. Doutora Margarida Meireles pela orientação e pelo apoio incondicional na fase final da entrega desta dissertação. Ao Instituto de Microbiologia da Faculdade Medicina, em especial ao Prof. Doutor Melo Cristino, pela disponibilização das instalações e equipamentos.

À Doutora Ana Pamplona e Ana Pena pela ajuda e disponibilidade que deram ao longo deste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia em especial para as minhas colegas Maria Rebelo e Rosângela Frita pela força e incentivo que me deram.

À minha família e amigos pelo apoio, amizade, carinho e confiança que me transmitem constantemente. Um obrigado muito grande à minha prima Vera pela ajuda preciosa, dedicação e carinho nesta fase do mestrado.

Ao João pelo carinho, dedicação e apoio em todas as etapas deste trabalho.

Aos meus pais pela compreensão, amor, dedicação e confiança que me transmitiram ao longo destes anos.

Aos meus filhos, Beatriz e Pedro, a quem dedico este trabalho, pelo que representam para mim e pelo amor e compreensão que demonstraram nesta fase da nossa vida.

A todos Muito Obrigada.

RESUMO

A malária é conhecida pela sua elevada morbidade e mortalidade. Estima-se que em 2006, tenha havido 247 milhões de casos de malária e um milhão de mortes. O número de casos esta a aumentar, associado à um aumento da resistência aos fármacos antimaláricos. Por causa disso, é de extrema importância que se desenvolvam métodos rápidos para o estudo da sensibilidade do *P. falciparum*.

Com o presente estudo pretendeu-se desenvolver uma nova metodologia para a detecção do pigmento malárico, baseado na citometria de fluxo. A ideia é desenvolver um teste de sensibilidade do *Plasmodium* spp aos anti-maláricos que funciona sem adição de reagentes.

Foi utilizada a espécie *P.berghei* ANKA, transfectados com a proteína GFP, uma espécie que infecta ratinhos. Nos eritrócitos parasitados estudou-se o efeito da cloroquina, para o estabelecimento de curvas dose – resposta ao fármaco. O sangue de ratinho foi colhido e incubado com diferentes concentrações de fármaco. As células foram analisadas após incubação de uma, duas, três horas e *overnight*. O efeito inibitório da cloroquina foi detectado por determinação de eritrócitos que expressaram uma despolarização elevada, e por análise do grau da expressão da GFP.

Com base na detecção da despolarização, verifica-se um efeito inibitório logo após a primeira hora de incubação, por análise das curvas dose-resposta da cloroquina. Este efeito aumenta até às 3 horas de incubação. Ao contrário disso, nenhum efeito é visível na análise do GFP.

Este trabalho mostra que é possível observar o efeito inibitório da cloroquina em células infectadas com *P. berghei* ANKA, com base na detecção de hemozoína. Este método por ser rápido e robusto, pode ser a base de um novo teste de susceptibilidade *in vitro* de *Plasmodium* spp a anti-maláricos.

ABSTRACT

Malaria is well known for its high morbidity and mortality rates. In 2006, an estimated 246 Million cases occurred, causing around 1 million deaths. Yet, the number of cases is still rising, associated to an increasing problem of resistance to antimalarial drugs. Because of this, the development of rapid methods to detect drug resistance is of paramount importance.

The present study had as objective the redevelopments of a novel method to detect the malarial pigment, based on flow cytometric principles. The idea was to develop a new sensitivity test for antimalarial drugs for *Plasmodium* spp. , that would work without additional reagents.

The murine *P. berghei* ANKA strain, a strain that has been transfected with green fluorescent protein (GFP) was used. The parasitized erythrocytes were studied to establish a dose-response curve of the drug. The blood of infected mice was incubated with different concentrations of the drug. The cells were analysed after 1, 2, 3 and overnight incubation. The inhibitory effect of chloroquine was detected measuring the expression of depolarization in infected erythrocytes, as well as the GFP expression.

Based on the depolarization an inhibitory effect was noted after only one hour, and the effect was more pronounced at three hours. Contrary to this, no effect was observed when the GFP expression was analysed.

This study shows that it is possible to observe the inhibitory effect of chloroquine on *P. berghei* ANKA infected erythrocytes, based on the detection of hemozoin. This method may be a rapid and robust way to develop a novel in-vitro sensitivity test for *Plasmodium* spp.

Palavras-chave: Hemozoína; anti-maláricos; teste de susceptibilidade *in vitro*; citometria de fluxo.

Key words: Haemozoin; antimalarial drugs; *in vitro* drug sensitivity assay, flow cytometry.

ABREVIATURAS

CQ – Cloroquina

Cyt- Citocromo b

DHFR- Dihidrofolato redutase

DNA – ácido desoxirribonucleico

Depol SSC – *do inglês SSC depolarized*

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético

ELISA – *do inglês Enzyme-linked immunosorbent assay*

FACS – *do inglês Fluorescence-Activated Cell Sorter*

FSC – *do inglês Forward Scatter*

GFP – *do inglês Green fluorescent protein*

HEPES – Tampão do ácido 4 – (2-hidroxietil) -1-piperazinaetanosulfónico

MAPSS - *do inglês Multi-Angle Polarized Scatter Separation*

OMS – Organização Mundial de Saúde

Hz – Hemozoína

PbGFP – *do inglês Plasmodium berghei green fluorescent protein*

PCR – *do inglês Polimerase Chain Reaction*

P. berghei – *Plasmodium berghei*

P. falciparum – *Plasmodium falciparum*

P.vivax – *Plasmodium vivax*

P. ovale – *Plasmodium ovale*

P. malariae - *Plasmodium malariae*

Pyr - pirimetamina

RPMI – *do inglês Roswell Park Memorial Institute*

RNA – Ácido ribonucleico

SSC – *do inglês Side Scatter*

ÍNDICE

I.	INTRODUÇÃO	1
1.	Malária	1
1.1.	Considerações gerais	1
1.2.	Epidemiologia da Malária	2
1.3.	Manifestações Clínicas	3
1.4.	Prevenção e Tratamento da Malária	4
1.5.	Resistência aos anti-maláricos - dimensão do problema	5
1.6.	Avaliação da resistência aos anti-maláricos	8
2.	Testes de susceptibilidade <i>in vitro</i>	9
2.1.	Métodos com base na morfologia	11
2.2.	Métodos com incorporação de radioisótopos	12
2.3.	Métodos não radioactivos	13
2.4.	Avaliação global dos métodos	15
3.	Hemozoína	16
4.	Hemozoína e detecção por citometria de fluxo	19
4.1.	Princípios básicos da citometria de fluxo	19
4.2.	Detecção da hemozoína por citometria de fluxo	21
5.	Estudos preliminares	22
6.	Breves considerações	23
II.	OBJECTIVOS	24
III.	MATERIAIS E MÉTODOS	25
1.	Material corrente de laboratório	25
2.	Soluções e meios de cultura	25
3.	Fármacos anti-maláricos	26
4.	Modelo animal e colheita de sangue	27
5.	Citómetro de fluxo	28
5.1.	Considerações gerais	28
5.2.	Reagentes	30

5.3. Contagem absoluta de células	31
6. Ensaio de susceptibilidade de <i>P.berghei</i> aos antimaláricos	32
6.1. Preparação das suspensões com cloroquina	32
6.2. Análise das suspensões após tratamento com cloroquina	33
IV. RESULTADOS	35
1. Ensaio para o estabelecimento dos parâmetros	35
2. Análise dos resultados obtidos no citómetro de fluxo	35
3. Estudo do background do meio rpmi e do tampão facs	36
4. Importância das condições de esterilidade	37
5. Avaliação de uma suspensão de sangue de ratinho não infectado e infectado com <i>P. berghei</i> anka	38
6. Importância da escolha das concentrações do fármaco	39
7. Avaliação do efeito inibitório da cloroquina numa suspensão de sangue de ratinho infectada com <i>P.berghei</i> anka	40
8. Avaliação de uma suspensão de sangue de ratinho infectada com <i>P.berghei</i> transfectado com GFP	42
9. Avaliação de uma suspensão de sangue de ratinho infectada com <i>P.berghei</i> transfectado com GFP – contagens absolutas	43
V. DISCUSSÃO	48
VI. CONCLUSÃO	56
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

I. INTRODUÇÃO

1. MALÁRIA

1.1. Considerações gerais

A malária é uma doença infecciosa, sendo uma das principais causas de morte, a nível mundial. Considerada um grave problema de saúde pública, devido ao modo de transmissão (mosquito-Homem), a malária está sempre associada a uma mortalidade e morbilidade elevadas. Segundo o relatório da Organização Mundial de Saúde, calcula-se que em 2006, tenha havido 247 milhões casos de malária, originando um milhão de mortes (WHO, 2008).

A malária é causada por quatro espécies de protozoários pertencentes ao género *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*, uma quinta espécie, *P. knowlesi* que inicialmente era zoonótica, confinada aos macacos, começou a estar associada à doença humana (Singh *et al*, 2004). A maioria das infecções é causada por *P. falciparum* e *P. vivax*, apresentando um maior número de mortes associadas a *P. falciparum*, podendo ocorrer, embora numa pequena percentagem, infecções mistas (Greenwood *et al*, 2005).

A transmissão da malária é feita basicamente através da picada de um mosquito fêmea da espécie *Anopheles* sp.. Embora possa ocorrer transmissão congénita (Weatherall *et al*, 2002), esta é a forma mais comum do parasita completar o seu ciclo de vida.

Os parasitas têm um ciclo de vida complexo (Figura 1) tanto no vector (mosquito) como no hospedeiro. Os esporozoítos injectados pelo mosquito quando

da picada, migram para os hepatócitos, onde após multiplicação, transformam-se em esquizontes, estes por reprodução assexuada originam milhares de merozoítos. Os merozoítos são libertados para a corrente sanguínea, onde se inicia o estadio eritrocitário (infecção dos eritrócitos, crescimento intracelular e multiplicação). Este processo é reiniciado com a ruptura dos eritrócitos e uma reinvasão das células adjacentes. É nesta fase que surge a primeira sintomatologia da doença (Mackintosh *et al*, 2004; Stevenson *et al*, 2004; Hyde, 2007)

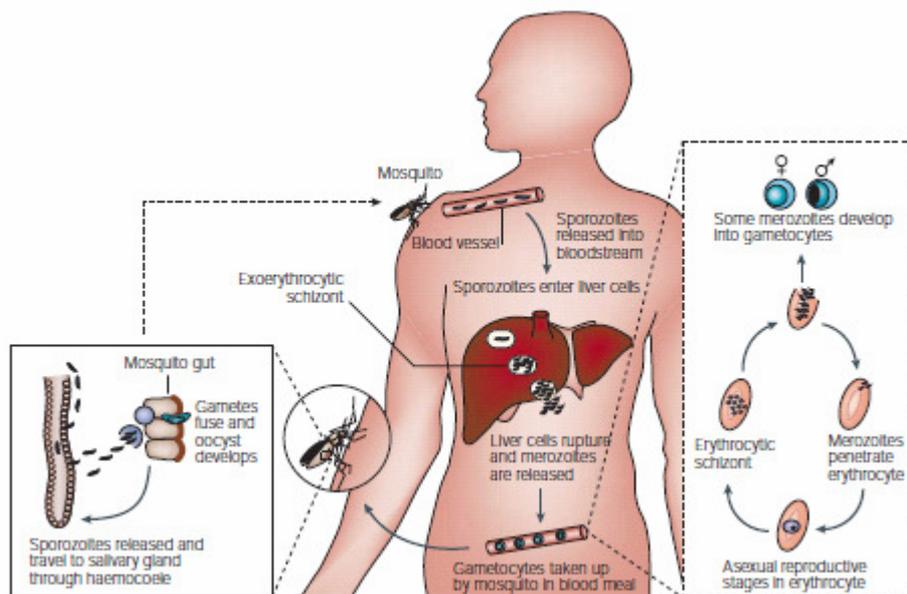


Figura 1. Ciclo de vida do *Plasmodium* spp. Adaptado de Stevenson, 2004

1.2. Epidemiologia da Malária

Em 2006, os casos de malária estavam avaliados em 247 milhões, entre 3,3 bilhões de pessoas em risco, causando quase um milhão de mortes, na sua maioria crianças menores de 5 anos (WHO, 2008), em países subdesenvolvidos das zonas tropicais. Em 2008, havia 109 países endêmicos para a malária (WHO, 2008). O risco

de transmissão aumenta nas áreas rurais e varia sazonalmente em diversas regiões (Greenwood *et al*, 2005).

À escala global, as regiões com maior intensidade de transmissão da malária são África Sub-Sahariana e Sudoeste Asiático (Hay *et al*, 2004) (Guerra *et al*, 2008), como mostra a Figura 2.

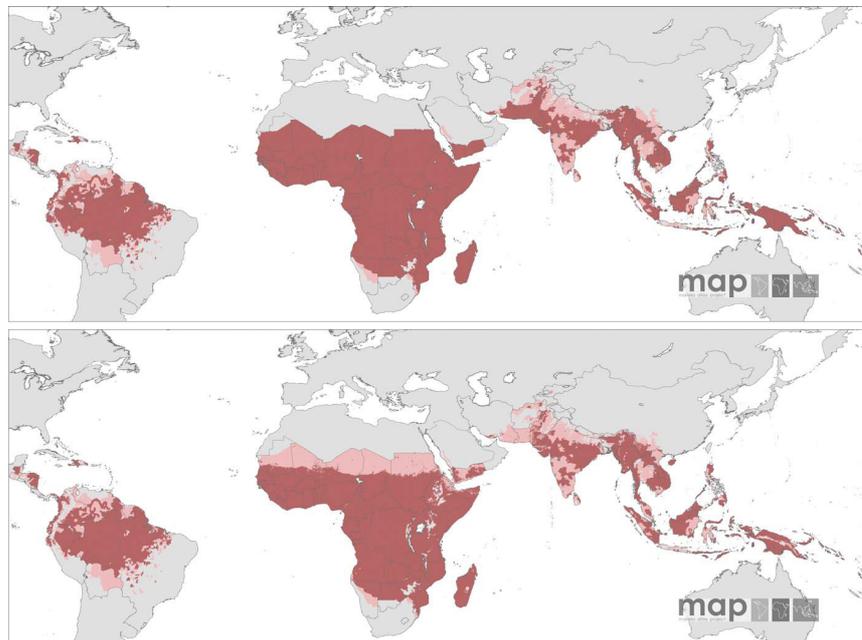


Figura 2. Distribuição geográfica da malária no mundo. (Adaptado de Guerra, 2008)

1.3. Manifestações Clínicas

Durante vários anos, a malária, nas formas mais graves, era caracterizada por duas situações clínicas principais: anemia grave e a malária cerebral, devida à forma como o parasita modifica o eritrócito, em que as formas mais maduras aderem à superfície endotelial e progressivamente bloqueiam os microcapilares de órgãos principais, como o cérebro (Hyde, 2007). A grande alteração ao longo destes últimos

anos, é que a forma mais grave de malária é uma doença sistémica complexa (Mackintosh *et al*, 2004).

Os sintomas da malária desenvolvem-se durante o estadio eritrocitário do ciclo de vida do parasita. Assim, o indivíduo permanece assintomático desde a picada do mosquito até à libertação dos merozoítos, devida à lise dos eritrócitos infectados (Schuster, 2002), o que pode compreender um período de 1-4 semanas (Weatherall, 2002).

1.4. Prevenção e Tratamento da Malária

O esforço renovado para o controlo da malária de uma forma global, orientando-se no sentido da sua erradicação, só é possível actuando em duas frentes: a prevenção e o tratamento (WHO, 2008). Com vista a acelerar o processo de controlo da malária, foram fornecidas redes tratadas com insecticida para indivíduos em risco, pulverização residual intradomiciliária com insecticida para famílias em risco; medicamentos anti-maláricos adequados para indivíduos doentes ou com suspeita e o tratamento preventivo na gravidez (WHO, 2008).

Os fármacos anti-maláricos são utilizados para a prevenção e tratamento da malária. A maioria, tem como alvo o estadio eritrocitário do ciclo de vida do parasita, a que corresponde o período sintomático.

No Quadro 1 são apresentadas as principais características dos fármacos anti-maláricos, nomeadamente, a sua utilização, alvo e frequência da resistência.

Quadro 1. Compostos anti-maláricos e suas principais características. (Adaptado de Witkowski B. *et al.*, 2009)

Classe	Molécula	Uso	Alvo	Resistência
Quinolinas	Cloroquina	+++	Formação de Hz	++++
	Quinino	+++		++
	Mefloquina	+++		+++
	Amodiaquina	+++		+++
	Halofantrina	++		++
	Lumefantrina	+++		++
Endoperóxidos e derivados sintéticos	Artemisina	+	Hemo e proteínas do vacúolo	-/+
	Artesunato	++		-/+
	Artemether	++		-/+
Antifolatos	Pirimetamina	+++	DHFR	++++
Outros	Atovaquona	++	Cyt b	+

DHFR- dihidrofolato reductase; Cyt b- citocromo b; Hz- hemozoína.

Apesar da implementação dos diversos programas de controlo da infecção, a transmissão do parasita é elevada, o que se traduz num aumento de casos nestes últimos anos (White, 2008). Esta situação é devida a uma combinação de factores:

- Aumento da resistência dos parasitas aos anti-maláricos;
- Aumento da resistência do vector ao insecticida;
- Alterações climáticas;
- Aumento das viagens para áreas endémicas.

1.5. Resistência aos anti-maláricos - dimensão do problema

Em várias regiões endémicas de malária, o espectro de anti-maláricos resume-se à utilização de cloroquina e sulfadoxina-pirimetamina, devido a acessibilidade e sustentabilidade destes fármacos, embora estejam implicados nos mecanismos de resistência (May & Meyer, 2003). Muitos factores contribuem para o

desenvolvimento e aumento das resistências, como o excesso de uso dos anti-maláricos como profilaxia; protocolos terapêuticos inadequados ou incompletos; uma variabilidade genética e metabólica que confere adaptabilidade ao parasita e uma transmissão suficientemente elevada para permitir que as populações resistentes possam proliferar (Hyde, 2009, Wongsrichanalai, 2002). As características do fármaco e a imunidade do hospedeiro também são factores a ter conta no contexto das resistências, como a seguir se sumariza (Quadro 2).

Quadro 2. Factores determinantes na resistência aos fármacos anti-maláricos. (Adaptado de Wongsrichanalai, C., *et al*, 2002).

FACTOR	CARACTERÍSTICAS	CONTEXTO
Fármaco	Tempo de semi-vida	Resistência a fármacos que têm um tempo de semi-vida mais curto
	Dose	Uso de fármacos em quantidades sub terapêuticas e administração em massa.
	Não específico	Uso presuntivo de fármacos sem diagnóstico laboratorial ou com outras indicações terapêuticas
	Farmacocinética	Fórmulas com baixa biodisponibilidade
	Resistência cruzada	Fármacos anti-maláricos com antibacterianos
Humano	Imunidade do hospedeiro	Quando existe uma certa imunidade à malária, pode existir cura apesar do facto de haver resistência. Um grave problema com os refugiados que permitem a introdução da malária resistente
	Manutenção de parasitémias residuais	Falência do protocolo terapêutico não detectada
Parasita	Mutações genéticas	Mecanismos moleculares de resistência aos anti-maláricos.
	Nível de transmissão	Risco aumentado de desenvolvimento de resistências tanto ocorrem em zonas de baixa como elevada transmissão
Vector	Afinidade vector-parasita Condições ambientais	Proliferação de parasitas resistentes

Na ausência de uma vacina clinicamente comprovada, a prevenção e o tratamento da malária dependem muito dos fármacos profiláticos e terapêuticos.

Desde a síntese do primeiro anti-malárico na década de 30, apenas um pequeno número de compostos conseguiu a licença para utilização em humanos, e alguns estão comprometidos com as resistências que se vão desenvolvendo, incluído as fórmulas de baixo custo que são essenciais a África, nomeadamente a cloroquina e a pirimetamina (Hyde, 2007, Wellems, 2001).

A perda de eficácia clínica da cloroquina e sulfadoxina-pirimetamina, considerados os fármacos de primeira linha pertencentes a classes diferentes estão na base da múltipla resistência aos antimaláricos, o que se está a tornar um problema emergente. Na Figura 3 estão indicadas as áreas em que a sensibilidade do *P. falciparum* é reduzida e resistente, de acordo com a OMS.

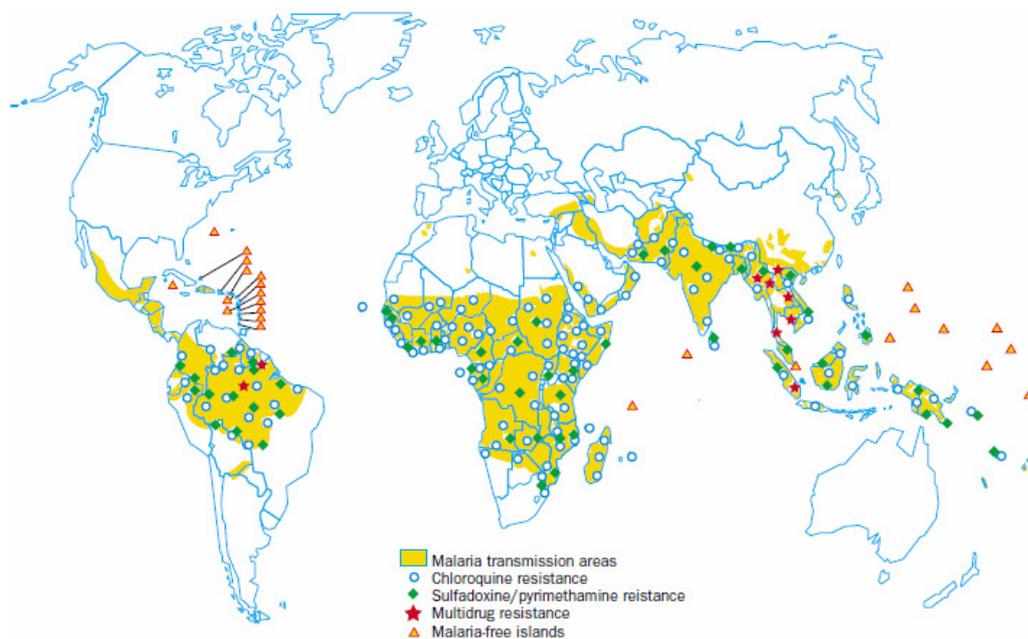


Figura 3. Áreas de multi-resistência do *P.falciparum* à cloroquina e pirimetamina - sulfadoxina. Adaptado de (Wongsrichanalai *et al*, 2002).

1.6. Avaliação da resistência aos anti-maláricos

De uma forma geral, existem três métodos para avaliar a resistência aos anti-maláricos: *in vivo*, *in vitro* e os métodos moleculares. Muito se tem debatido sobre qual o método ideal. Dadas as características de cada teste, pode-se inferir que são complementares na informação que fornecem sobre a falência terapêutica que poderá implicar ou não a resistência aos anti-maláricos.

A avaliação da susceptibilidade aos anti-maláricos é feita, de uma forma geral, por teste de eficácia terapêutica (testes *in vivo*) (Wongsrichanalai *et al*, 2002), considerado o *gold standard* actual (Basco, 2007). A resposta *in vivo* foi definida pela OMS em termos de estirpe sensível, e três níveis de resistência [RI, RII, RIII] (WHO, 2001). Esta classificação mantém-se válida em áreas de baixa transmissão de malária, mas difícil de aplicar em áreas com uma elevada transmissão, em que novas infecções podem ser confundidas com infecções recrudescentes. Este teste consiste na avaliação terapêutica de um indivíduo sintomático, com parasitemia conhecida, após exposição a doses pré-estabelecidas de fármaco e consequente monitorização da resposta clínica (Bloland, 2001).

Os testes *in vitro* medem a sensibilidade intrínseca do parasita, sem que haja factores biológicos a influenciar, através da inibição do crescimento ou da maturação do parasita (Bloland, 2001; Wongsrichanalai *et al* 2002; Laufer, 2007).

Os testes com base em métodos moleculares, como a técnica de PCR (*polimerase chain reaction*) em tempo real, permitem estudar a associação entre marcadores moleculares e a resistência a determinado fármaco. No entanto, estes

testes estando em vias de desenvolvimento necessitam de serem validados (Bloland, 2001; Noedl *et al*, 2003; Laufer *et al*, 2007).

O Quadro 3 estabelece uma comparação entre os três métodos em termos de vantagens e limitações.

Quadro 3. Avaliação global dos métodos para avaliar a susceptibilidade do *Plasmodium sp.* aos anti-maláricos.

Métodos	Vantagens	Limitações	Refs
<i>in vivo</i>	Melhor informação sobre eficácia terapêutica. Melhor compreensão da situação clínica e epidemiológica.	Influencia de factores externos. Não reflecte o verdadeiro nível de resistência aos fármacos. Longo período de follow-up (28 dias) Não detecta reinfeções.	Bloland, 2001
<i>in vitro</i>	<i>Screening in vitro</i> de interações de fármacos combinados. Teste complementar para avaliar a falência terapêutica devido a resistências aos anti-maláricos. Validação de marcadores moleculares. Medida indirecta da concentração de fármaco no plasma. Monitorização da resistência aos anti-maláricos	Dificuldade de adaptação às condições da rotina., devido a poucos recursos e técnicos pouco especializados. Equipamentos dispendioso. Experiências com turn around time de 48-96h. Pouca correlação entre a resposta <i>in vitro</i> e a resposta clínica.	Noedl, 2003 Basco, 2007 Laufer, 2007 Bloland, 2001
Moleculares	Pequena quantidade de amostra. Independente de factores externos. Capacidade de processar um grande número de amostras num curto período de tempo. Permite distinguir uma infecção recrudescente de uma reinfeção Detecção precoce de resistência aos anti-maláricos	Limitado a determinados fármacos Um resultado negativo não exclui a resistência à malária. Tal como um resultado positivo não indica uma infecção activa, podendo ser uma contaminação. Equipamento sofisticado e técnicas muito especializadas	Bloland, 2001 Laufer, 2007

2. TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO*

Os testes de susceptibilidade *in vitro* medem o efeito do fármaco no crescimento e maturação dos parasitas. De uma forma geral, os parasitas são

colocados em meio de cultura e expostos a concentrações seriadas de fármacos e o efeito é medido em relação a um controlo sem anti-malárico. Vários testes têm sido desenvolvidos e estudados (Basco, 2007). Basicamente, desenvolveram-se 4 tipos de testes: morfológicos, testes com incorporação de radioisótopos, testes não radioactivos como o imunoensaio enzimático (ELISA) e os fluorimétricos (uso de corantes fluorescentes de DNA) (Figura 4). Como cada método tem a sua forma de detecção e medida indirecta do crescimento do parasita, dando informação específica sobre o metabolismo e maturação, os resultados obtidos nem sempre são comparáveis.

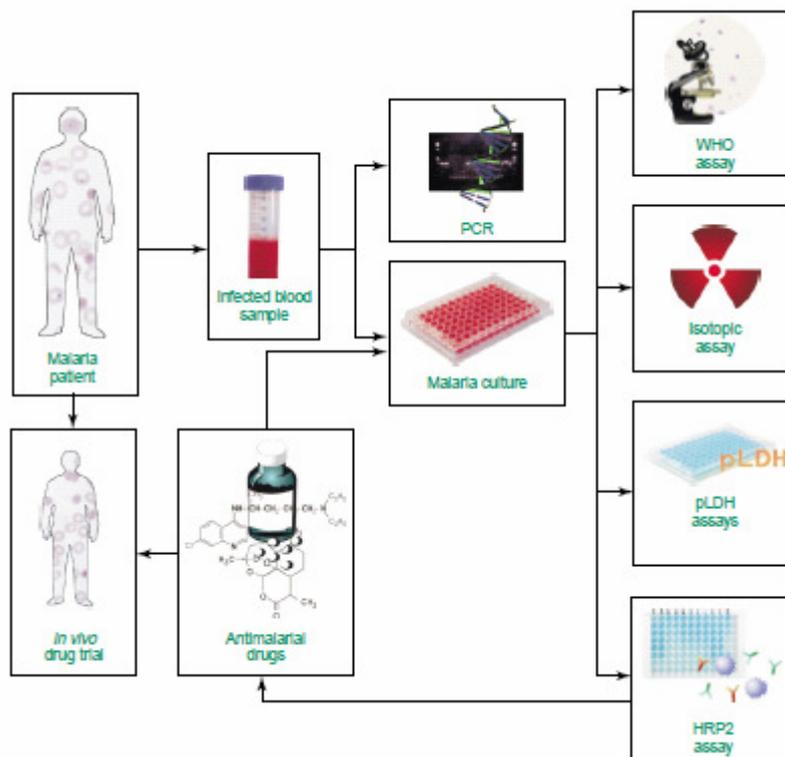


Figura 4. Diferentes testes de sensibilidade *in vitro* (Adaptado de Noedi, 2003).

2.1. Métodos com base na morfologia

A maturação *in vitro* de trofozoítos de *P. falciparum* em esquizontes, foi observada num estudo desenvolvido por Rieckmann *et al*, em sangue desfibrinado parasitado que foi incubado em meio com glucose, durante 24h, com concentrações crescentes de cloroquina e quinino. Foi observado o efeito inibitório dos anti-maláricos. Esta técnica designada de “macroteste” permitiu distinguir estirpes sensíveis de estirpes resistentes à cloroquina através da observação das alterações na maturação do parasita devido ao efeito do fármaco. Dez anos mais tarde este teste foi ligeiramente modificado utilizando microculturas para medir o efeito inibitório na maturação dos esquizontes, em 24 horas (Rieckmann, 1978). Embora tecnicamente simples, a contagem dos esquizontes é subjectiva e morosa, sendo feita em relação ao número total de parasitas (Noedl *et al*, 2003).

O microteste sofreu algumas modificações e foi adoptado pela OMS que concebeu um kit adaptado aos laboratórios de campo. Considerado o método padrão entre 1981 e 2000 teve três séries: Mark I, Mark II e Mark III (Basco, 2007). No entanto, devido à sua *fraca performance*, ser um método de avaliação subjectiva e trabalhoso, este acabou por ser suspenso.

Praticamente em paralelo, foi desenvolvido um teste que se baseou na determinação da parasitémia (*48h test*) (Nguyen *et al*, 1980). O parasita é colocado em cultura contínua durante um período de 48-96h, com mudança de meio a cada 24h. A parasitémia é determinada por observação microscópica de esfregaços antes e depois da exposição ao fármaco (Basco, 2007; Noedl *et al*, 2003). Este teste também foi modificado, principalmente, porque necessitava de grandes quantidades

de reagentes e parasitas, para testar as cinco concentrações de fármaco. No entanto, dado possuir um longo tempo de incubação, e não ser tão sensível como os métodos com e sem radioisótopo, é um teste que só se realiza em determinadas condições (Basco, 2007).

2.2. Métodos com incorporação de radioisótopos

Existem diversos precursores marcados com radioisótopos para estudar a maturação dos parasitas. Neste grupo incluem-se os precursores dos ácidos nucleicos (purinas e pirimidinas), proteínas e fosfolípidos (Noedl *et al*, 2003). Em culturas com parasitas, os eritrócitos e as plaquetas não sintetizam DNA, RNA, proteínas ou membranas; os leucócitos não se multiplicam e tendem a desintegrar-se ao fim de alguns dias, portanto as únicas células activas são os parasitas. Embora haja um ligeiro *background* nos eritrócitos não infectados, a incorporação de radioisótopos em precursores é uma medida indirecta da actividade metabólica dos parasitas, nomeadamente, na utilização destes compostos marcados que não são sintetizados pelo parasita (WHO, 2001; Basco 2007).

A hipoxantina marcada com trítio, [³H], é a base puríca mais utilizada nos microtestes radioactivos, para marcação do DNA e RNA. A incorporação desta purina radioactiva é directamente proporcional ao número de eritrócitos parasitados, dentro das condições estabelecidas para o ensaio de sensibilidade *in vitro* (Basco 2007).

Este método permite um elevado grau de automatização, o que traz uma enorme vantagem face aos outros métodos. A leitura automática dos resultados permite reduzir a subjectividade dos métodos morfológicos (Noedl *et al* 2003).

Desjardins *et al* em 1979, desenvolveu o primeiro ensaio com radioisótopos semi-automático, inicialmente utilizado para *screening* dos fármacos. Este método é hoje considerado o “gold standard” dos testes de sensibilidade *in vitro* (Desjardin *et al*, 1979, Basco 2007).

Embora o método radioactivo seja considerado o método de referência nos países desenvolvidos, não pode ser utilizado na maioria dos países onde a malária é endémica, dadas as suas especificações técnicas e equipamento de elevado custo. Assim o investimento será no sentido do desenvolvimento de métodos não radioactivos, que possuam uma sensibilidade e especificidade semelhantes.

2.3. Métodos não radioactivos

Existem diversos testes que estão a ser desenvolvidos e implementados, como a citometria de fluxo, métodos de imunoensaio por ELISA e os métodos fluorimétricos.

A citometria de fluxo é utilizada para detectar e fazer a contagem dos eritrócitos, na presença de corantes de DNA, diferenciando assim o estadio maturativo pela quantidade de DNA: eritrócitos não infectados não têm DNA portanto não exibem fluorescência. O aumento da emissão de fluorescência é directamente proporcional à passagem de trofozoítos (estadio mais jovem) para esquizontes (estadio mais maduro) e conseqüente aumento do conteúdo em DNA.

Uma amostra que contenha os vários estadios eritrocitários exhibe três picos: um largo, sem fluorescência, que corresponde a eritrócitos não infectados um menos intenso (trofozoítos jovens) e um segundo pico mais intenso, que representa os eritrócitos infectados com esquizontes (Basco, 2007). Com base neste ensaio a citometria de fluxo tem sido utilizada para testes de sensibilidade *in vitro* (Franklin *et al*, 1986, van Vianen *et al*, 1990, Saito-Ito *et al*, 2001).

Os ensaios fluorimétricos constituem um método alternativo à citometria de fluxo (Corbett *e tal*, 2004; Mark 2009). Findo o período de incubação dependendo do corante a utilizar, os eritrócitos podem ser lisados e o DNA é extraído para eliminar a hemozoína. Por exemplo o SYBR Green I não necessita deste procedimento, podendo ser aplicado directamente (Bennett *et al*, 2004, Corbett *et al*, 2004). A fluorescência é medida num fluorímetro e a intensidade é directamente proporcional à quantidade de DNA.

Este método é rápido e simples e o equipamento é menos dispendioso que um citómetro de fluxo ou um contador de radiação. No entanto, a sensibilidade, que é um ponto fulcral nestes métodos, continua a não ser elevada, Corbett *et al*, (2004) realizou os ensaios com uma parasitémia de 2%, o que constitui uma desvantagem para os métodos fluorimétricos.

Os métodos colorimétricos são testes onde tem havido um grande investimento, principalmente nos que são baseados na técnica de ELISA. Os ensaios enzimáticos são menos sensíveis que os ensaios por ELISA. A determinação da actividade enzimática do enzima LDH (Lactato Desidrogenase) do parasita necessita de uma parasitémia acima de 1% (Makler, 1993) o que torna o ensaio pouco sensível

para ser aplicado na rotina. A primeira geração destes testes foi abandonada e uma segunda geração utiliza anticorpos monoclonais para realização do ensaio por ELISA, para melhorar a sensibilidade. Esta técnica quando aplicada aos ensaios de sensibilidade *in vitro* denomina-se de DELI “double-site enzyme-linked lactate desidrogenase imunodetection” (Druille, 2001).

Outro ensaio por ELISA serve para detectar e quantificar uma proteína específica do *P. falciparum*, HRP II (*Histidine rich protein*). Esta proteína é secretada sobretudo na forma tardia do parasita em anel e trofozoítos (Noedl *et al*, 2002), sendo um indicador da multiplicação do parasita *in vitro*. Foi desenvolvido um protocolo simples com pouco manuseamento da amostra antes da cultura (Noedl *et al* 2004). No entanto, é necessário validar, estabelecendo para tal uma comparação com outros métodos.

2.4. Avaliação global dos métodos

Como anteriormente foi apresentado, não existe um teste de susceptibilidade *in vitro* “ideal”, existem vários métodos e outros estão ser desenvolvidos. De facto, todos têm limitações importantes, como seja o período de incubação (48-96h) e outras particularidades de cada técnica, que por vezes podem ser condicionantes. A baixa sensibilidade é um ponto comum a todos, à excepção, dos métodos por imunoensaio (ELISA). Esta situação dificulta a validação dos testes se se pretender extrapolar o método para a rotina. Nas regiões endémicas, principalmente em zonas de elevada transmissão em que há muitas infecções recrudescentes ou reinfeções, o nível de parasitémia pode ser muito baixo, necessitando assim de um teste com elevada sensibilidade.

Quadro 4. Avaliação global dos testes de susceptibilidade *in vitro*. Adaptado de Basco 2007.

Método	Características	Situação actual	Refs
Testes morfológicos			
Macroteste	Culturas suboptimizadas sem tampão, não baseadas na cultura contínua de Trager e Jensen.	Suspensão	Rieckmann, 1971
Microteste	Culturas contínuas de Trager e Jensen. Adaptado à rotina.	Adoptados pela OMS. Suspensão.	Rieckmann, 1978
48 h test	Determinação da parasitemia antes e depois da exposição ao fármaco. Para estirpes isoladas e de cultura.	Útil em laboratórios com poucos recursos.	Nguyen –Dinn e Tragger, 1978, 1980
Métodos radioactivos			
[³H] Hipoxantina	Para parasitas isolados e em estirpes de cultura. Pode ser automatizado por determinações em grande número.	<i>Gold standard</i>	Desjardins, 1979
Métodos não radioactivos			
Colorimétricos	Actividade enzimática LDH. Baixa sensibilidade, não adaptado a estirpes isoladas.	Devido ao baixo custo é utilizado nalguns laboratório para screening inicial.	Makler, 1993
ELISA	Elevada especificidade e sensibilidade. Alternativa aos ensaios com radioisótopos.	Fase avançada de desenvolvimento. existência de duas versões: detecção da LDH e HRP II.	Druille, 2001 e Noedl 2002
Citometria de fluxo	Equipamento dispendioso, não adaptado às condições nas regiões endémicas. Simples, rápido e preciso.	Em desenvolvimento	Franklin, 1986, van Vianen, 1990, Saito-Ito, 2001
Fluorimétricos	Equipamento dispendioso. Menos sofisticado que o citómetro de fluxo	Em desenvolvimento	Corbett, 2004, Jonhson, 2007

3. HEMOZOÍNA

O pigmento malárico, conhecido por hemozoína, é produzido pelo *Plasmodium sp.*, durante o seu breve estadio intraeritrocitário, a partir da digestão da hemoglobina, para a obtenção de aminoácidos e ferro (Weissbuch & Leiserowitz, 2008). O parasita pode digerir até 60-80% do conteúdo do eritrócito num processo que ocorre no vacúolo digestivo do parasita, um organelo com pH

ácido, onde existem uma série de proteases (Krugliak *et al*, 2002). Neste compartimento, os enzimas catalizam todo o processo de hidrólise da hemoglobina em pequenos péptidos, produzindo o grupo hémico livre [Fe²⁺-protoporfirina IX (Fe²⁺-PIX)], que é tóxico para o parasita (Weissbuch & Leiserowitz, 2008). Este bioproduto por sua vez sofre um processo de oxidação, originando a ferriprotoporfirina, Fe³⁺-PPIX, que precipita no vacúolo digestivo, sob a forma de cristais, conhecidos por hemozoína, processo conhecido como biomineralização (Ziegler, *e tal*, 1999; Egan *et al*, 2001) embora do ponto de vista fisiológico o termo mais apropriado seja biocristalização (Hempelmann & Hempelmann, 2002). Os cristais de hemozoína libertam-se quando ocorre a lise do eritrócito e rapidamente são fagocitados por monócitos e fagócitos circulantes.

O primeiro ensaio de sensibilidade com base na detecção de hemozoína foi desenvolvido por Rieckmann, 1982, conhecido ser um teste com base na precipitação de um pigmento escuro, após adição de uma solução de NaOH-NaCl 1N, que é o resultado da agregação dos cristais de hemozoína. A precipitação era visível, indicadora da maturação do parasita, não necessitando de microscópio, o que poderia constituir uma vantagem. No entanto, para além de não constituir um ensaio preciso, devido ao tipo de resultados, os leucócitos aglutinam em soluções alcalinas, o que desta forma interfere com a formação do precipitado. É um teste que não é utilizado (Basco, 2007).

Os cristais de hemozoína são birrefringentes e paramagnéticos, características que os tornam detectáveis por luz polarizada (Lawrence, 2002) ou de campo escuro (Jamjoom, 1983, 1988, 1991), por citometria de fluxo (Hänscheid, 2000) e por

espectroscopia de massa de desadsorção por laser ou de espectroscopia de Ressonância de Raman, em que é possível traçar um espectro da hemozoína em eritrócitos em cultura (Webster *et al*, 2008).

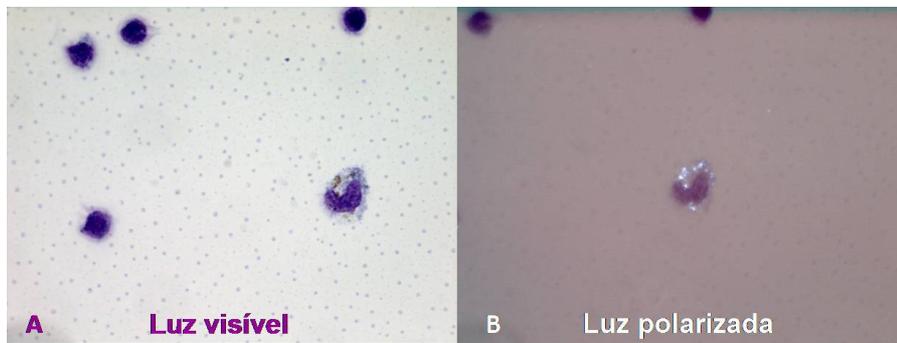


Figura 5. Hemozoína presente num monócito.

A- Observação da hemozoína em microscópio óptico.

B- Observação da hemozoína em microscópio óptico com luz polarizada (notar a birrefringência dos cristais de hemozoína)

Quadro 5. Métodos de detecção da hemozoína

Método de detecção	Vantagens	Limitações
Luz polarizada e de campo escuro	Detecção rápida da hemozoína (birrefringência)	Equipamento com elevado custo. Técnicos especializados. Não distingue a hemozoína presente nos trofozoítos jovens.
Citometria de fluxo	Boa especificidade. Detecção de hemozoína em eritrócitos intactos. Grande potencial no diagnóstico da malária. Método rápido.	Equipamento com elevado custo. Baixa sensibilidade para indivíduos não imunes.
Espectroscopia de massa de desadsorção por laser	Muito específico. Boa sensibilidade.	Equipamento de elevado custo. Não é possível diferenciar as espécies de <i>Plasmodium spp.</i>

4. HEMOZOÍNA E DETECÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO

4.1. Princípios básicos da citometria de fluxo

A citometria de fluxo é um método analítico que permite a detecção de características físicas multiparamétricas de uma única célula ou de outras partículas biológicas, a informação obtida pode ser qualitativa ou quantitativa (Brown *et al*, 2000).

Em termos gerais, a citometria de fluxo traduz-se na passagem de partículas em suspensão, uma a uma, num fluxo contínuo, em frente a um laser que emite luz. A unidade base de um citómetro de fluxo compreende: o sistema de fluidos (*Sheath*); sistema óptico e sistema electrónico. Geralmente, a fonte de excitação é um laser de árgon que emite luz num comprimento de onda de 488nm.

No sistema óptico quando uma célula atravessa o feixe de luz, provoca um processo de dispersão da luz e/ou emissão de fluorescência, cuja intensidade está dependente das características físicas da células. Fenómenos físicos como a dispersão, extinção e refacção são avaliados por diferentes sensores, bem como a fluorescência emitida pela célula quando atravessa o laser. A dispersão frontal (*Forward scatter* ou FSC) é proporcional ao tamanho relativo da célula e a dispersão ortogonal ou lateral – 0-90º (*Side Scatter* ou SSC) informa sobre a estrutura interna da células (granularidade, relação núcleo-citoplasma) e a sua forma (Órfão & González, 1995).

O sistema electrónico é constituído por sinais luminosos, amplificados e convertidos em pulsos electrónicos pelos fotomultiplicadores, são medidos e sofrem

uma conversão analógica-digital. Conforme a intensidade do sinal digitalizado, estes são processados em vários canais, acumulando-se em tempo real para uma posterior análise computadorizada. Estes dados geralmente são apresentados sob a forma de histogramas, que combinam um parâmetro com o número de eventos analisados ou de diagramas dot-plot, que combinam os dois parâmetros. Neste diagrama cada ponto corresponde a um evento analisado. (Órfão, 1995, Shapiro, 2003)

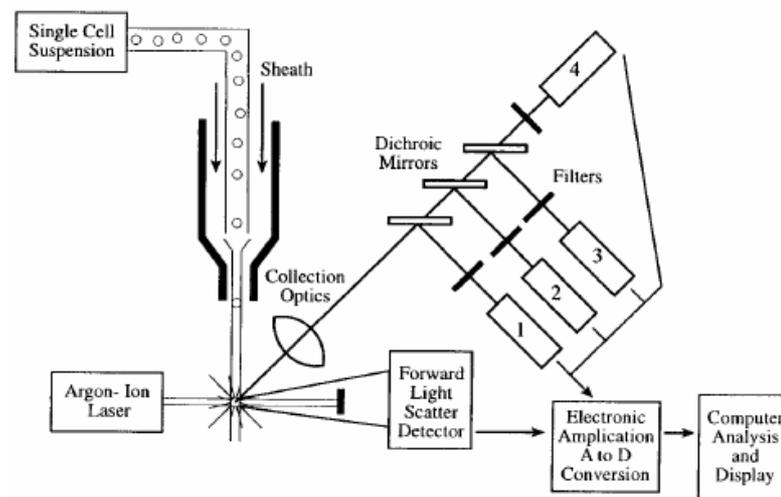


Figura 6. Esquema de um citômetro de fluxo. Uma suspensão de células é focada hidrodinamicamente pelo *Sheath* até intersectar um feixe de luz. Os sinais são recolhidos por um detector de FSC, um detector de SSC (1), e detectores de fluorescência (2-4). Os sinais são amplificados, convertidos à forma digital e representados num *software* informático (adaptado de Brown,2000).

A par do FSC e do SSC característicos de uma dada população de células, os corantes fluorescentes constituem uma ferramenta adicional para o estudo dessa população. Estes corantes podem actuar de diversas maneiras, como por exemplo intercalados ou ligados a diferentes componentes celulares (DNA, RNA, proteínas), ou conjugados a anticorpos específicos para ligação a proteínas nas membranas ou no interior das células, entre outras.

4.2. Detecção da hemozoína por citometria de fluxo

A hemozoína é birrefringente e pode ser detectada por métodos ópticos como a citometria de fluxo (Hänscheid *et al*, 2000). Vários estudos têm demonstrado que este método de detecção de hemozoína detectada em leucócitos pode constituir um método de diagnóstico de malária em regiões endémicas (Hänscheid, 2008) e não endémicas (Hänscheid *et al*, 2000).

Estes estudos foram realizados numa nova geração de contadores (Cell-Dyn[®], Abbott Diagnostics) que se baseiam na tecnologia MAPSS[®] (*Multi-Angle Polarized Scatter Separation*). Trata-se de uma metodologia baseada na citometria de fluxo em que os eosinófilos são diferenciados dos restantes granulócitos através de uma característica única dos grânulos eosinofílicos: a capacidade de despolarizar a luz (Hänscheid *et al*, 2000). A utilização deste equipamento possibilitou a identificação de monócitos que também despolarizam a luz devido à presença do pigmento da malária (Hänscheid *et al*, 2000). A investigação desta ocorrência permitiu identificar doentes com monócitos contendo hemozoína e estabelecer o diagnóstico indirecto de malária. Num estudo efectuado no Serviço de Urgência do Hospital de Santa Maria, este método permitiu diagnosticar casos de malária, mesmo quando não houve suspeita clínica, durante a realização do hemograma de rotina

Através de estudos realizados por microscopia tem sido possível estabelecer uma correlação entre a presença de hemozoína em monócitos e neutrófilos e a mortalidade nas formas graves de malária em adultos. O contador hematológico automatizado (Cell-Dyn[®]) pode permitir estabelecer esta correlação com maior precisão que a microscopia óptica, uma vez que analisa 10.000 células em tempo

inferior a um minuto. No entanto, não é possível adequar o *software* do equipamento de forma a incluir algoritmos que permitam a detecção e quantificação automatizada de leucocitos contendo hemozoína. Esta análise limita-se actualmente à contagem manual das populações características constantes no gráfico *90º depolarized light scatter (granularity)(depol SSC) vs. 90º light scatter (lobularity)*, que o equipamento produz como parte do hemograma. O laboratório dispõe, no entanto, de um citómetro de fluxo que foi especificamente desenhado e detecta a luz despolarizada de modo similiar ao MAPSS[®] utilizado pelo Cell-Dyn[®]. Este equipamento analisa um elevado número de leucócitos (100.000 em 1-2 minutos) e assim deverá permitir a detecção e quantificação precisa de monócitos e neutrófilos contendo hemozoína.

Embora com o Cell Dyn[®] não seja possível detectar os eritrócitos infectados devido à lise diferencial, para contagem dos leucócitos, foi possível detectar hemozoína intraeritrocitária num indivíduo com elevada resistência à lise dos eritrócitos (Hänscheid *et al*, 2000a), ilustrando desta forma a potencialidade do equipamento.

5. ESTUDOS PRELIMINARES

Em experiências preliminares observou-se, em cultura de células sanguíneas de ratinho exposta a concentrações seriadas de cloroquina, que a detecção de hemozoína intra-eritrocitária permitiu observar o efeito inibitório do fármaco, em poucas horas de incubação.

É importante que esta detecção de hemozoína em parasitas intraeritrocitários seja verificada e validada para determinar o efeito dos fármacos anti-maláricos.

6. BREVES CONSIDERAÇÕES

Como a maioria dos citómetros são dispendiosos, não sendo possível a sua aquisição em zonas endémicas, é emergente a concepção de um citómetro de fluxo barato para detectar e quantificar plasmódios (Shapiro, 2008), abrindo assim a possibilidade de adaptar o método de detecção de hemozoína ao diagnóstico e avaliação da susceptibilidade aos anti-maláricos.

II. OBJECTIVOS

O principal objectivo deste estudo consiste no desenvolvimento de um método rápido e robusto para o estudo da resistência aos anti-maláricos.

O método a desenvolver baseia-se:

- Na detecção de hemozoína em parasitas intraeritrocitários, por citometria de fluxo;

- E, no estabelecimento de curvas dose-resposta após incubação dos parasitas com os anti-maláricos.

Pretende-se portanto, otimizar um protocolo com vista a obter resultados clinicamente relevantes de uma forma simples (sem adição de reagentes) e rápida (resultados em 24h).

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. MATERIAL CORRENTE DE LABORATÓRIO

No decorrer deste trabalho, foi utilizado na sua maioria material descartável que consistiu em tubos de polipropileno de 15 mL e 50 mL (*Orange Scientific*), , tubos *ependorf* de polipropileno de 1,5 mL, pontas azuis, amarelas e brancas, tubos adequados para o citómetro Cyflow de 3,5 mL, com as dimensões exactas para o cálculo correcto do número total de células.

Os materiais de vidro utilizados foram frascos de pirex *SCHOTT* de 500 mL e 1000 mL e provetas graduadas de 20 mL e 100 mL.

Foram utilizadas pipetas de Pasteur graduadas esterilizadas de 3 mL, micropipetas (Gilson e BioPipette)) com gamas entre 100-1000 μL , 50-200 μL , 10-100 μL e 0,5-10 μL

Para os ensaios de sensibilidade aos anti-maláricos utilizaram-se placas de cultura, de 24 poços, feitas em poliestireno, próprias para este tipo de ensaios (existem certos tipos de materiais que não podem ser utilizados, pois há absorção do fármaco).

2. SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA

Consoante o fim a que se destinava, foram utilizados dois tipos de água: água de qualidade do tipo I, colhida através do sistema Milli-Q UF-Plus (Millipore, Billerica), com uma resistividade de 18,2 M Ω .cm e com um filtro de 0,22 μm , e água bidestilada estéril para a preparação das soluções.

O meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 é constituído por uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos e vitaminas e outros componentes considerados essenciais para o crescimento celular. Dado se tratar de um meio altamente nutritivo para cultura de células, é necessário que o manuseamento seja feito em condições de esterilidade. Ao meio é adicionado um indicador de pH, o vermelho de fenol, que permite por alteração da cor normal (laranja) do meio inferir sobre o seu pH. Ao longo do tempo o meio vai ficando vermelho devido à diminuição do pH, nestas condições não é utilizado.

Embora o meio de cultura RPMI 1640 seja muito nutritivo, é necessário adicionar determinados suplementos, que são essenciais para a cultura de parasitas.

Quadro 6. Composição do meio RPMI 1640 completo*

Fórmula	[Composto]final/ % (m/v)
RPMI 1640 (1x concentrado)	-
Tampão HEPES	1
Penicilina/Estreptomicina 100000UP/mL	1
Aminoácidos não essenciais	1
Glutamina [◇]	1
Soro bovino fetal	10 (v/v)

* Todos os reagentes possuem um elevado grau de pureza e são comercializados pela Gibco, Invitrogen.

[◇] Existe meio RPMI 1640 que na sua composição tem glutamina.

3. FÁRMACOS ANTI-MALÁRICOS

Os anti-maláricos utilizados neste trabalho foram a cloroquina (Sigma-Aldrich) As soluções stock (1280 μM) e de trabalho (12,8 μM) da cloroquina foram preparadas com água bidestilada estéril, em condições de esterilidade. A filtração destas

soluções não é recomendada, pois as concentrações são muito baixas, alguma quantidade de cloroquina poderia ficar retida na membrana do filtro. As diluições foram feitas em meio de cultura RPMI completo, a partir da solução de trabalho, numa gama de concentrações de 5, 10, 25, 50, 100 e 200 nM.

As soluções *stock* e de trabalho foram conservadas a 4°C, o que aumenta o seu período de estabilidade. As diluições também foram conservadas a 4°C, no entanto quando havia uma mudança de pH, que era registada pela alteração da cor do meio RPMI (laranja para vermelho), estas eram preparadas de novo.

4. MODELO ANIMAL E COLHEITA DE SANGUE

O modelo murínico utilizado para estudar os estadios eritrocitários do parasita *P. berghei* é da estirpe C57BL/6. Os murganhos foram infectados com *P. berghei* ANKA transfectado com a proteína GFP (green fluorescent protein) e *P. berghei* ANKA.

Estes animais foram criados no biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência e mantidos no biotério do Instituto de Medicina Molecular. Toda a conduta e protocolos foram aprovados pelo regulamento da protecção dos animais, instruído pela Direcção Geral de Veterinária.

A colheita de sangue foi realizada no laboratório de Imunologia, onde foram feitas várias alíquotas para diversos fins, nomeadamente congelamento para posterior infecção de murganhos sãos.

O sangue foi colhido após sacrifício do murganho, por asfixia com CO₂, por punção cardíaca.

Todo o material foi desinfetado com etanol a 70% e a colheita era feita com uma seringa contendo anti-coagulante, heparina (1:50 em PBS).

O tubo com sangue foi mantido em gelo até ser feita a suspensão em meio RPMI 1640.

A parasitemia dos ratinhos, utilizados neste estudo, foi de 1-10%.

5. CITÓMETRO DE FLUXO

5.1. Considerações gerais

Os ensaios de citometria de fluxo foram realizados num citómetro CyFlow SL (Partec GmbH, Münster, Germany), que foi instalado de acordo com as instruções do fabricante. O equipamento possui um laser sólido de 488 nm, e filtros de 520 (FL1 – verde) e 630 nm (FL3 – vermelho), conforme se indica na Figura 7.

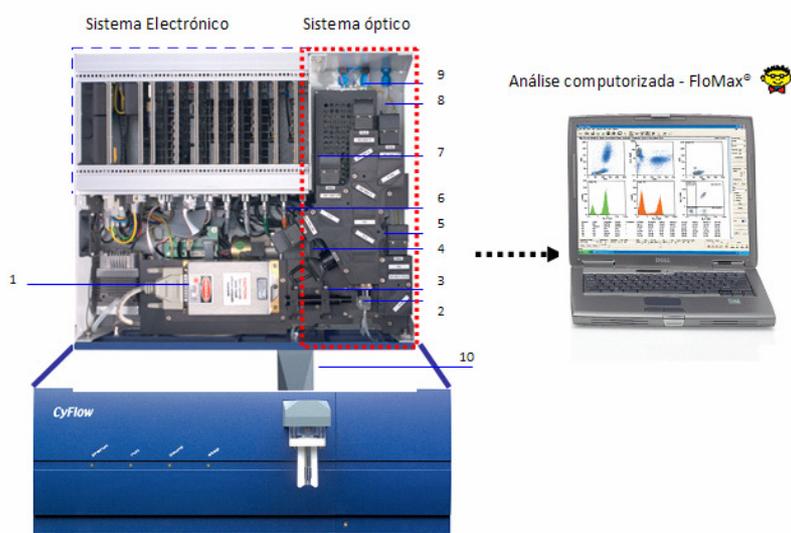


Figura 7. Citómetro CyFlow® e seus componentes.

(http://www.partec.com/preview/cms/upload/CyFlowSL_Microbiology.pdf)

1 – Laser de 488 nm; 2- *Cuvette* de fluxo; 3- Focagem da luz laser; 4- Câmara CCD, 5 – FSC, 6 - SSC 1; 7- SSC 2; 8- Detector de fluorescência verde – FL1; 9 - Detector de fluorescência vermelha – FL3, 10 - Amostra.

Ao lado do equipamento, estavam colocados os recipientes do *Sheath* (sistema de fluídos), possui um filtro de 30 μ m (Partec) na extremidade do tubo que transporta o *Sheath*, e do esgoto líquido (Waste) (Figura 8). Neste recipiente era colocada lixívia a 10%, para inactivar o material biológico analisado que poderia constituir um risco. Os eléctrodos presentes nos recipientes, permitiam que o equipamento alertasse para o reabastecimento do *Sheath* ou o esvaziamento do recipiente do esgoto líquido.



Figura 8. Recipientes do sistema hidrodinâmico (*Sheath*) e do esgoto líquido (*Waste*).

1 – Eléctrodos; 2- Filtro de 30 μ m.

A recolha do *Sheath* foi realizada de uma forma lenta e escorrendo pela parede do recipiente, para que não se formasse nenhuma bolha, minimizando assim o *background*.

O parâmetro *gain* adoptado foi seleccionado de acordo com as células analisadas, de modo a centrar a distribuição celular no histograma FSC/SSC. Em todos os casos, o *gain* dos detectores ópticos era logarítmico, e a velocidade de amostragem utilizada (em μ L/seg) era tal que permitisse a análise de cerca de 1000 a 2000 eventos por segundo. O citómetro de fluxo é controlado por um computador e

através de *software* próprio é possível fazer a aquisição e tratamento de dados em ambiente Windows (Partec FloMax 2.4d)

A calibração inicial do equipamento foi efectuada mediante o alinhamento do sistema óptico e do sistema fluídico com esferas de calibração de 3 μm , com *settings* próprios para este procedimento. A verificação da calibração era feita periodicamente durante o estudo, de forma a verificar o bom alinhamento do sistema óptico, bem como o bom funcionamento dos tubos fotomultiplicadores.

5.2. Reagentes

As esferas de calibração do citómetro CyFlow, de 3 μm (Partec) foram armazenadas entre 2 e 8 $^{\circ}\text{C}$, ao abrigo da luz.

Para efectuar as medições no citómetro de fluxo foi necessário diluir a suspensão em tampão FACS, composto por PBS (1x concentrado, da GIBCO, Invitrogen) e soro bovino fetal (SBF) (Gibco, Invitrogen) numa concentração final de 2% (v/v). Este tampão foi armazenado a 4 $^{\circ}\text{C}$, permanecendo estável durante vários meses.

O SYBR[®] Green I *Nucleic Acid Gel Stain* (Molecular Probes[™], Invitrogen), fornecido 10000x concentrado em DMSO (dimetilsulfoxido), foi diluído a uma concentração final de 10x (solução de trabalho) e armazenado a -20 $^{\circ}\text{C}$, protegido contra a luz.

5.3. Contagem absoluta de células

O equipamento possui dois sensores (eléctrodos) que medem um volume de amostra de 200 μL , e que permitem a determinação da contagem de células por unidade de volume (Figura 9)

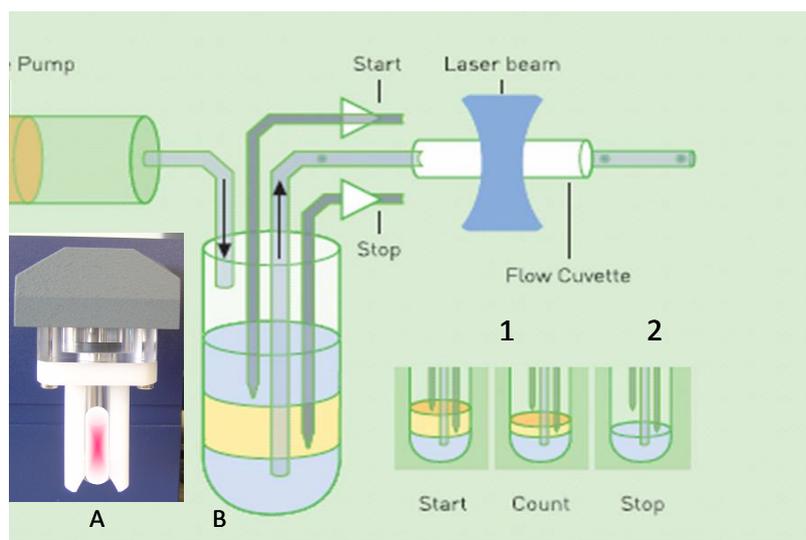


Figura 9. Contagem absoluta de células.

(http://www.partec.com/preview/cms/upload/CyFlowSL_Microbiology.pdf)

A amostra é aspirada (1) até atingir o eléctrodo mais curto (2). Inicia-se a contagem que só termina quando se deixa de detectar a amostra (3). O volume de amostra aspirado para contagem de células é de 200 μL . A – Tubo de amostra colocado no equipamento; B – esquema de contagem absoluta de células.

A contagem absoluta de células foi efectuada por análise de um volume de cerca de 1000 μL de amostra (em que a amostra é diluída 1:10 em FACS *buffer*), após uma breve homogeneização da suspensão no vórtex (MS1 Minishaker IKA), sem formação de espuma. Os tubos para este efeito têm que ter um diâmetro conhecido, uma vez que esse parâmetro entra nos cálculos efectuados pelo equipamento para a contagem absoluta.

6. ENSAIOS DE SUSCEPTIBILIDADE DE *P. BERGHEI* AOS ANTIMALÁRICOS

6.1. Preparação das suspensões com cloroquina

O sangue após colhido foi diluído em meio RPMI 1640 numa concentração final de 2% (v/v). Um volume de 500 μL de suspensão a 2%, foi distribuído pelos poços da placa de cultura conforme um esquema pré-estabelecido, onde os ensaios eram feitos em triplicado (Figura 10).

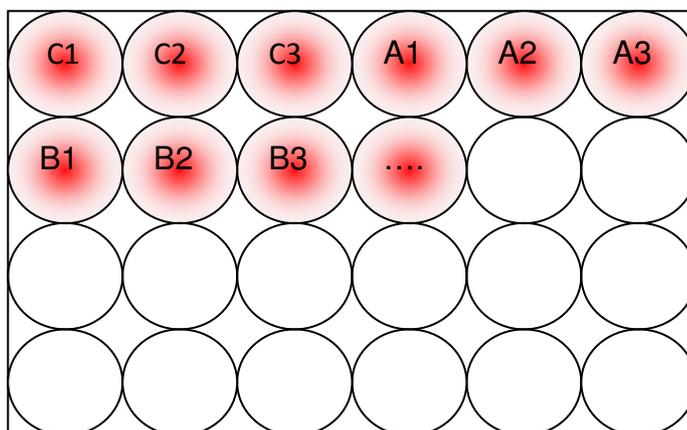


Figura 10. Esquema da incubação das células e dos fármacos anti-maláricos.

Os controlos são colocados nos primeiros poços (C1-C3) e nos seguintes são colocadas as diluições seriadas crescentes do fármaco (A1-A3; B1-B3;...).

Depois de distribuída a suspensão, foi retirada uma alíquota de 5 ou 10 μL (conforme o tipo de contagem que se fosse realizar, 50 000 eventos ou contagem absoluta de células), para posterior análise no citómetro. Um volume de 500 μL de fármaco diluído, com concentrações estabelecidas, foi adicionado ao poço correspondente. Nos controlos (ensaio sem fármaco) adicionaram-se 500 μL de meio RPMI. Notar que o volume aumenta para o dobro (1000 μL) o que origina uma diluição de 1:2 da concentração inicial da suspensão de células e de fármaco.

As placas de cultura foram incubadas numa estufa (*Heraeus*) a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂.

Foram analisadas amostras em intervalos de 1h, até seis horas de incubação, depois após 18, 24 e 48h.

6.2. Análise das suspensões após tratamento com cloroquina

Como se pretendia estabelecer uma curva de dose-resposta, no tempo respectivo, foi retirada uma alíquota de cada poço para ser analisada no citómetro CyFlow. Esta alíquota foi diluída 1:10 em tampão FACS, num volume final de 1000 µL.

A análise constou da aquisição de 50 000 eventos ou contagem absoluta de células. Para o tratamento dos dados, foi desenhado um *gate* poligonal (R1), que abrangesse cerca 80-90% da população principal representada no histograma FSC/SSC, excluindo as plaquetas e os *debris*. Este *gate* é criado de uma forma arbitrária, contudo tem detectar os eventos mais despolarizados, eliminando aqueles que não se pretendam analisar. Definindo sempre o mesmo *gate* é possível estabelecer comparações intra ensaio. Para análise dos eventos mais despolarizados o histograma *depol* SSC/ SSC é dividido em 4 quadrantes para que nos primeiros quadrantes Q1 e Q2, fiquem os eventos mais despolarizados, correspondendo às formas mais maduras dos parasitas que têm maior quantidade de hemozoína (também aqui a escolha é arbitrária mas é aplicada a todos os ensaios).

Um segundo *gate* R2 foi desenhado de forma a detectar a fluorescência, devida ao parasita expressar uma proteína fluorescente verde (GFP) (FL1). O *gate* R2

abrange o pico de fluorescência do gráfico FL1. A análise dos dados foi realizada no programa FloMax.

IV.RESULTADOS

1. - ENSAIO PARA O ESTABELECIMENTO DOS PARÂMETROS

Alguns parâmetros do equipamento (*settings*) devem ser ajustados no sentido de otimizar a aquisição das partículas a analisar. Este ajuste é necessário quando se desenvolve um ensaio para um determinado tipo de células/partículas, que apresentam um comportamento próprio de dispersão de luz. Assim, um dos parâmetros a otimizar foi o *gain* dos detectores ópticos, através do qual o sinal de amplificação pode ser ajustado separadamente para cada parâmetro (FSC ou SSC).

Relativamente, ao *gain* este baseou-se nas características da população de células em estudo. Assim, os valores foram estabelecidos para que permitissem a análise dos eventos muito aglomerados em que o FSC tem um valor baixo (excepto na zona dos *debris* celulares) e eventos mais isolados com valor de SSC mais elevado.

2. ANÁLISE DOS RESULTADOS OBTIDOS NO CITÓMETRO DE FLUXO

A análise de resultados conforme descrito em III – 6.2, é baseada na estratégia de traçar um *gate* em torno da população que se pretende analisar (Figura 12):

- *Gate* R1 no histograma FSC/SSC (eritrócitos), é aplicado a todos os gráficos;
- *Gate* R2 no histograma FL1/FL3, detecta as células com fluorescência devida a GFP.
- Q1+Q2 no histograma *depol* SSC/SSC, detecta as células mais despolarizadas na população do *gate* R1.

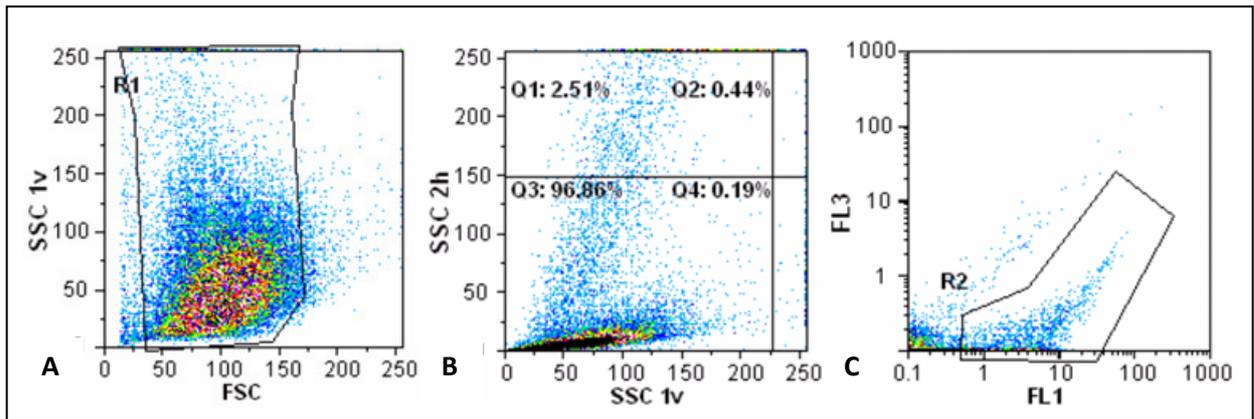


Figura 12. Análise dos resultados – estratégia de traçado dos *gates* em torno das populações a estudar. Em A temos a população de eritrócitos que ao ser aplicada em B, permite determinar o número de células mais despolarizadas (Q1+Q2). Em C o gate R2 permite determinar o número de células com fluorescência devida à proteína GFP.

Quando se pretende analisar o efeito inibitório da cloroquina numa mesma população, para que seja possível comparar os dois métodos (detecção de hemozoína e da fluorescência GFP), é necessário que o *gate* R2 seja aplicado no histograma da despolarização, de modo a que consigamos analisar os eritrócitos infectados com maior despolarização.

3. ESTUDO DO BACKGROUND DO MEIO RPMI E DO TAMPÃO FACS

De forma a verificar se as partículas em suspensão no meio de cultura RPMI 1640 e no tampão FACS (utilizado para diluir as suspensões a analisar) poderiam interferir nos ensaios, procedeu-se à análise destas soluções como amostras. Em simultâneo, foi analisada uma amostra de água de qualidade tipo I, como controlo.

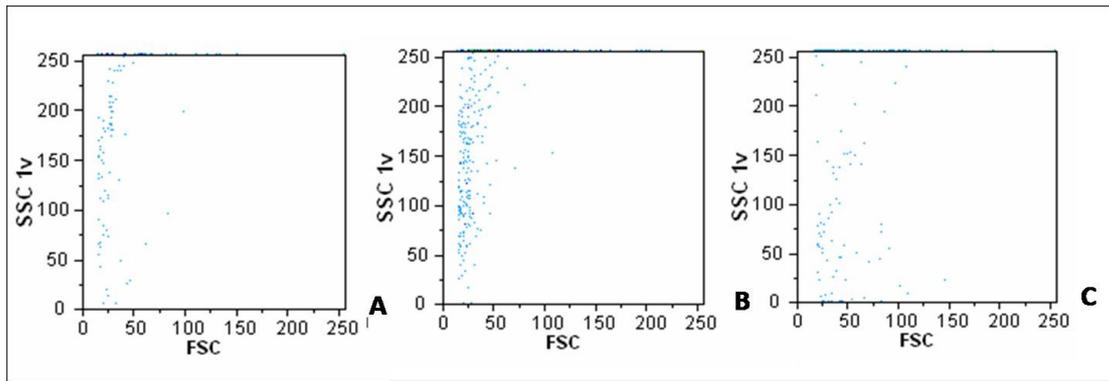


Figura 13. Análise do background do meio RPMI 1640 e tampão FACS (contagens absolutas).

A- Água de qualidade tipo I; B- Meio RPMI 1640; C-Tampão FACS.

Os resultados obtidos permitem concluir que não há interferência do meio RPMI ou do tampão FACS, na análise dos resultados dos ensaios.

4. IMPORTÂNCIA DAS CONDIÇÕES DE ESTERILIDADE

Em Microbiologia, trabalhar em esterilidade é uma condição exigida para garantir a qualidade dos resultados.

A contaminação pode surgir em qualquer fase do ensaio ou pré-ensaio. Nas primeiras duas experiências houve contaminação da cultura com *Pseudomonas aeruginosa* (isolada em gelose de sangue). Esta contaminação foi visível ao fim de 24h (Figura 14). A origem da contaminação foi investigada através de sementeira em gelose de sangue dos vários produtos que são utilizados em cada experiência, nomeadamente as soluções de cloroquina, o meio de cultura, o tampão PBS, inclusive o próprio sangue do ratinho. De facto, este último era fonte de contaminação, mais especificamente a heparina que lhe foi adicionada como anticoagulante.

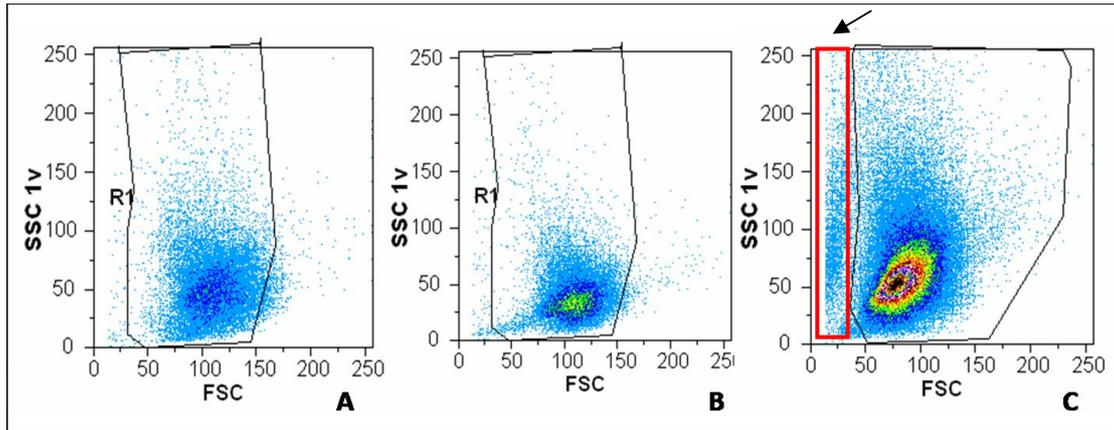


Figura 14. Contaminação das culturas com *Pseudomonas aeruginosa*.

A- [CQ]= 5 μ M (tempo 0); B- [CQ]= 5 μ M (tempo 120); C-[CQ]= 5 μ M (tempo 24h). Em C observa-se um população aumentada de células (*gate*) relativamente ao ensaio inicial (A) e um número aumentado de células lisadas, observável fora do *gate* (assinalado com uma seta). Estas observações sugerem uma possível contaminação.

5. AVALIAÇÃO DE UMA SUSPENSÃO DE SANGUE DE RATINHO NÃO INFECTADO E INFECTADO COM *P. BERGHEI ANKA*

Foram analisadas duas amostras de sangue de ratinho, uma sem infecção e outra infectada com *P. berghei ANKA*.

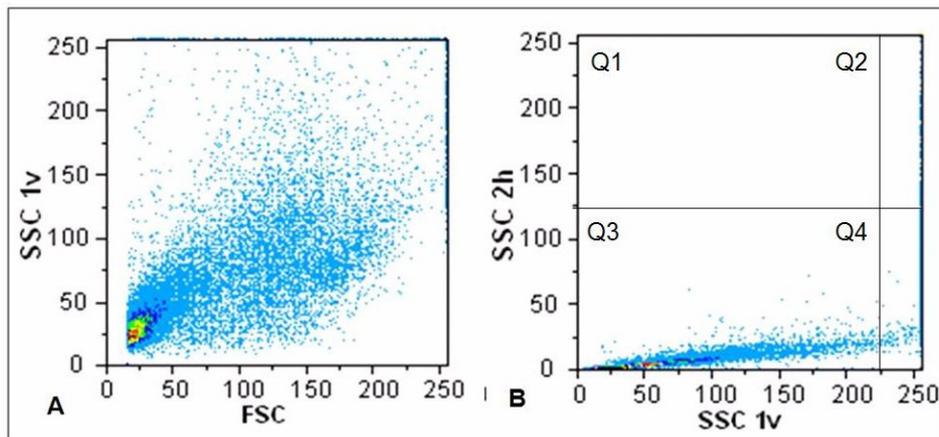


Figura 15. Análise do sangue de ratinho não infectado. A- Contagem absoluta do número de células (população total de células presentes na amostra); B- Contagem de células despolarizadas (como o ratinho não está infectado não se observa despolarização das células).

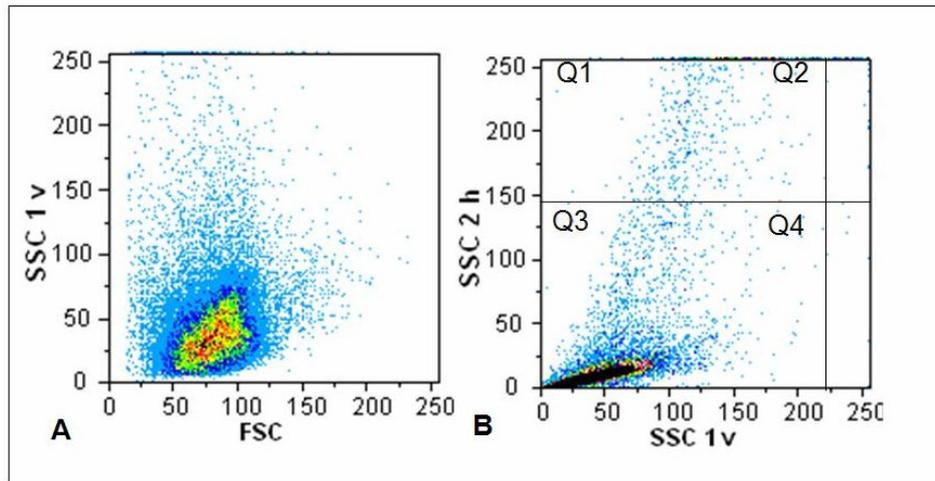


Figura 16. Contagem absoluta do número de células de uma suspensão de sangue de ratinho infectado com *Plasmodium berghei*. A- Contagem absoluta do número de células (população total de células presentes na amostra); B- Em Q1+Q2 estão presentes as células mais despolarizadas (eritrócitos parasitados).

Como se pode observar nas Figura 15 e Figura 16, após uma contagem absoluta de células, observa-se que só existem células despolarizadas, na amostra de sangue infectado com o parasita. Os eventos mais despolarizados correspondem a eritrócitos parasitados contendo hemozoína.

6. IMPORTÂNCIA DA ESCOLHA DAS CONCENTRAÇÕES DO FÁRMACO

Foram realizadas várias experiências no sentido de analisar quais as concentrações a serem utilizadas nos ensaios de susceptibilidade *in vitro*. O sangue utilizado foi de ratinho infectado com *P. berghei* ANKA. Inicialmente, utilizou-se um intervalo alargado de concentrações de cloroquina: 5, 25, 50, 100, 200 nM. A escolha desta gama de concentrações foi baseada em vários estudos revistos por Basco, 2007.

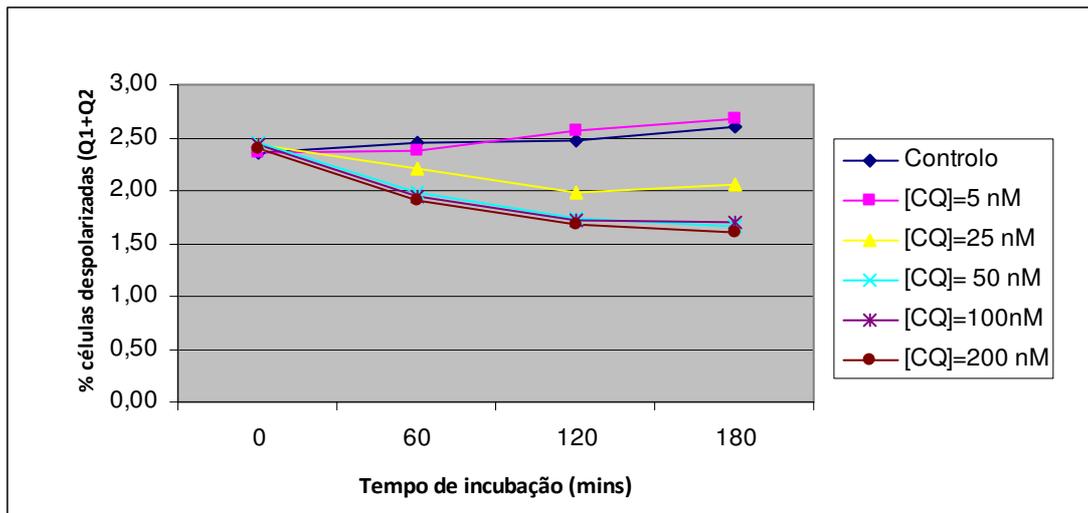


Figura 17. Efeito da cloroquina (CQ) nos eritrócitos parasitados por *P. berghei* ANKA , ao longo de 3 horas. Observa-se uma diminuição das células despolarizadas um efeito inibitório após a primeira hora de incubação para as concentrações de 25, 50, 100 e 200 nM. A concentração de cloroquina de 5 nM teve um efeito semelhante ao controlo. Q1+Q2- representam as células com maior despolarização.

No total foram analisados 50 000 eventos dos quais, a soma de Q1 e Q2 , representa os eventos mais despolarizados (Figura 12). Nestes 2 quadrantes temos as formas mais maduras do parasita que têm maior quantidade em hemozoína, constituindo assim um bom “marcador” para analisar o efeito da cloroquina no parasita.

Mediante a análise do gráfico (Figura 17)**Erro! A origem da referência não foi encontrada.** as concentrações escolhidas foram de 5 nM, 25 nM e 50 nM.

7. AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DA CLOROQUINA NUMA SUSPENSÃO DE SANGUE DE RATINHO INFECTADA COM *P.berghei* ANKA

Neste ensaio utilizou-se sangue de ratinho infectado com *P. berghei* ANKA. Como esta estirpe não está transfectada com a proteína GFP, o efeito inibitório é

seguido pela detecção de hemozoína, feita pela análise da percentagem das células despolarizadas, em 50 000 eventos.

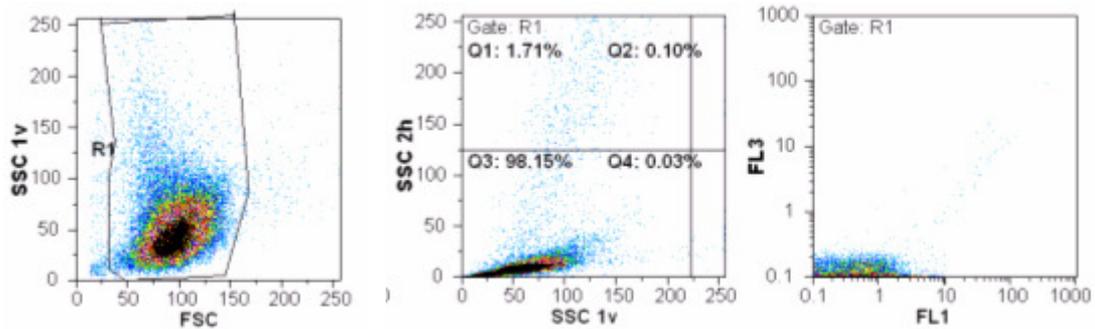


Figura 18. Estratégia de análise das células mais despolarizadas (Q1+Q2) com base no gate R1. No gráfico FL1, confirma-se que a estirpe de *P. berghei*, não é transfectada com a proteína GFP, pois não há emissão de fluorescência.

Com base no gate R1 traçado, e aplicado ao histograma da despolarização, é possível saber a percentagem das células despolarizadas e traçar a curva dose-resposta para avaliação do efeito inibitório da cloroquina (Figura 19).

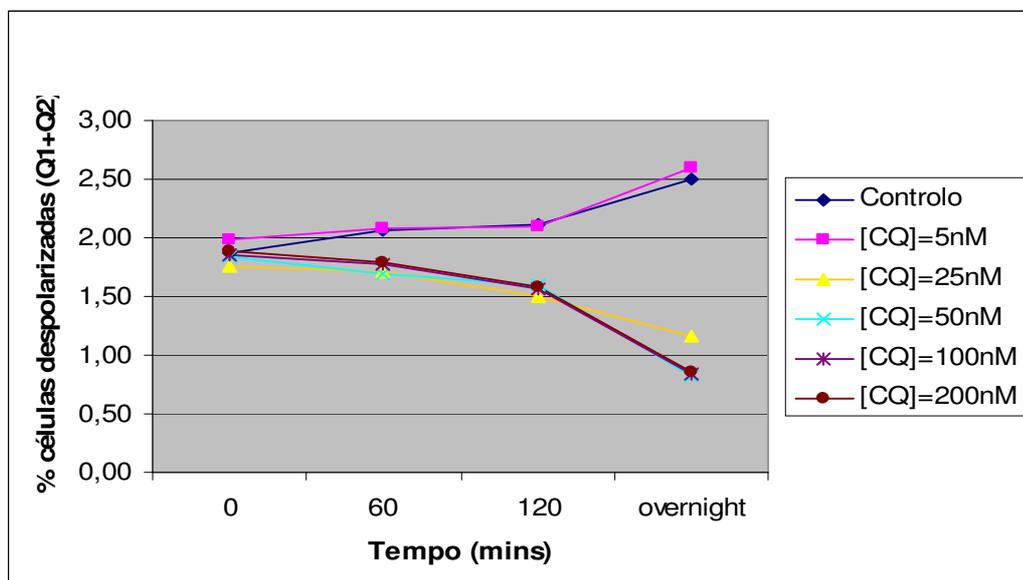


Figura 19. Efeito da cloroquina (CQ) em eritrócitos infectados *P. berghei* ANKA, ao longo de 24h. Observa-se uma diminuição das células despolarizadas um efeito inibitório após as primeiras duas horas de incubação para as concentrações de 25, 50, 100 e 200 nM. A concentração de cloroquina de 5 nM teve um efeito semelhante ao controlo. Q1+Q2- representam as células com maior despolarização.

8. AVALIAÇÃO DE UMA SUSPENSÃO DE SANGUE DE RATINHO INFECTADA COM *P. BERGHEI* TRANSFECTADO COM GFP

A utilização de sangue de ratinho infectado com *P. berghei* ANKA GFP permite analisar o efeito inibitório através da análise da fluorescência específica do parasita, devido a ser transfectado com uma proteína fluorescente GFP, cujo sinal é possível visualizar no gráfico FL1 (Figura 20)

A análise do efeito inibitório da cloroquina foi seguida durante 24h, através da contagem de 50 000 eventos.

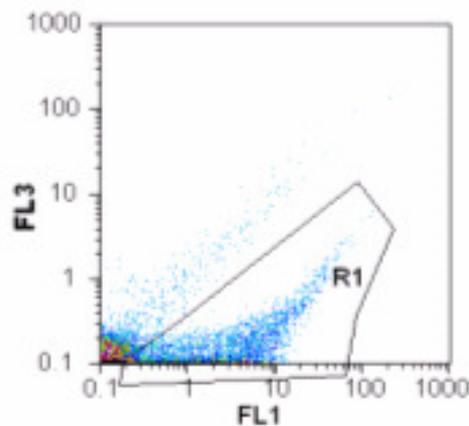


Figura 20. Análise das células com fluorescência em FL1. O traçado do gate R1 dá a percentagem de células com fluorescência devida a GFP.

Com base nos resultados obtidos é possível traçar a curva dose-resposta, em função da fluorescência emitida.

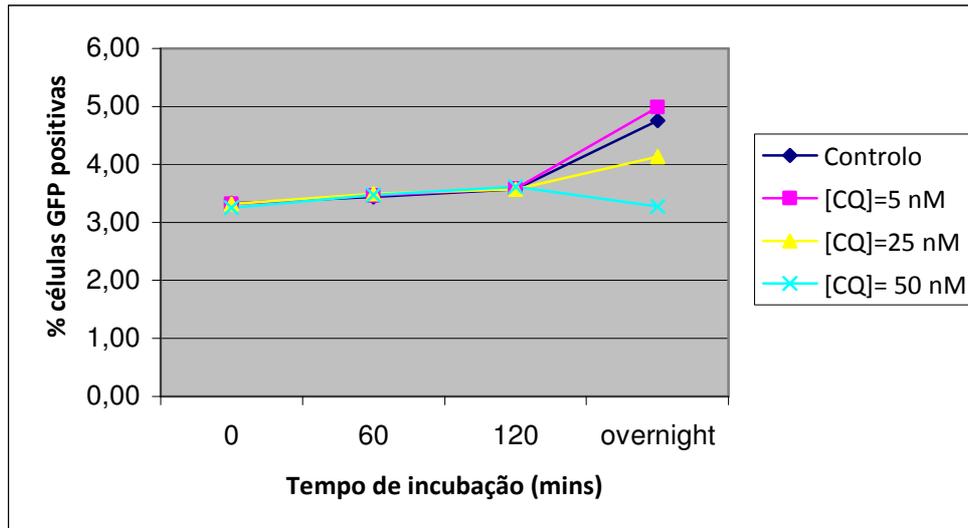


Figura 21. Efeito da cloroquina (CQ) em eritrócitos infectados *P. berghei* ANKA GFP, ao longo de 24h. Observa-se que o número de células mantém-se constante não se observando qualquer efeito inibitório da cloroquina, mesmo na concentração mais elevada.

A análise do gráfico não permitiu concluir acerca do efeito inibitório com base na emissão de fluorescência. Não há uma alteração no número de células GFP, nas primeiras duas horas, havendo um ligeiro aumento para algumas concentrações, à excepção da concentração de cloroquina de 50 nM, que se manteve constante.

Para comparação dos métodos realizou-se então a mesma experiência, mas fazendo uma contagem absoluta das células e uma estratégia de *gate* diferente.

9. AVALIAÇÃO DE UMA SUSPENSÃO DE SANGUE DE RATINHO INFECTADA COM *P. BERGHEI* TRANSFECTADO COM GFP – CONTAGENS ABSOLUTAS

Utilizou-se uma suspensão sangue de ratinho infectado com *P. berghei* ANKA transfectado com GFP, o efeito inibitório da cloroquina, foi seguido durante um período de 3 horas, através de contagens absolutas de células.

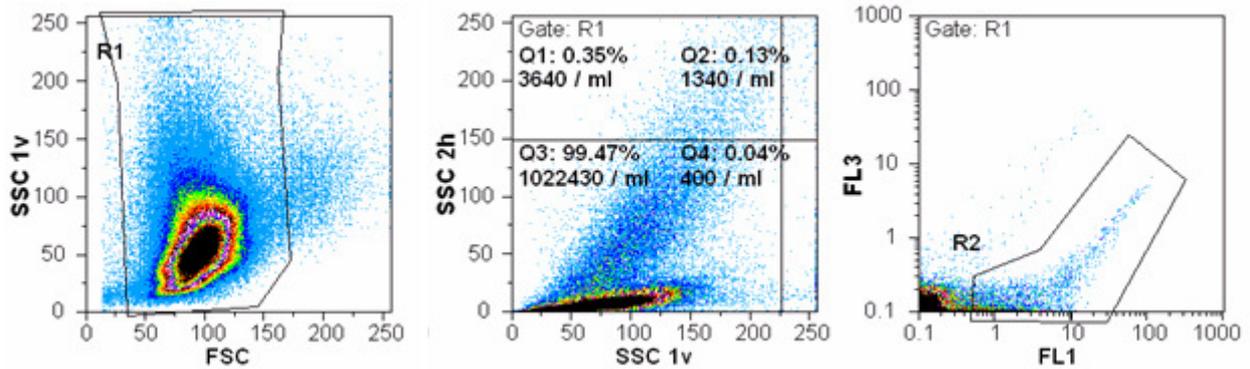


Figura 22. Análise das células mais despolarizadas (Q1+Q2) e células GFP positivas. É traçado o gate R1 para definir a população em estudo, este gate é aplicado aos restantes histogramas. Os quadrantes Q1+Q2 representam as células mais despolarizadas e para determinar o número total de células com fluorescência GFP é aplicado um gate R2.

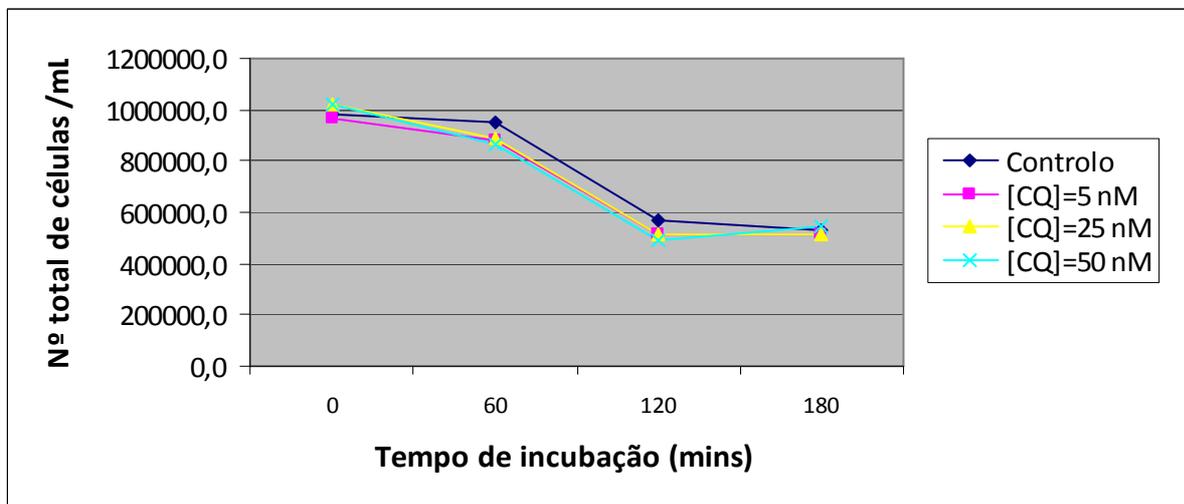


Figura 23. Contagem absoluta do número de células (nº total de células/mL), numa suspensão de sangue de ratinho infectado com *P.berghei* ANKA GFP.

Observa-se uma diminuição precoce do número de células, em cerca de 50%. Este facto, possivelmente é devido a uma adaptação ao meio de cultura RPMI, em que houve uma eventual lise das células.

Como a estirpe de parasita utilizada era GFP positiva foi possível traçar a curva dose-resposta em função da fluorescência emitida, em termos de número total de células GFP positivas (Gate R2).

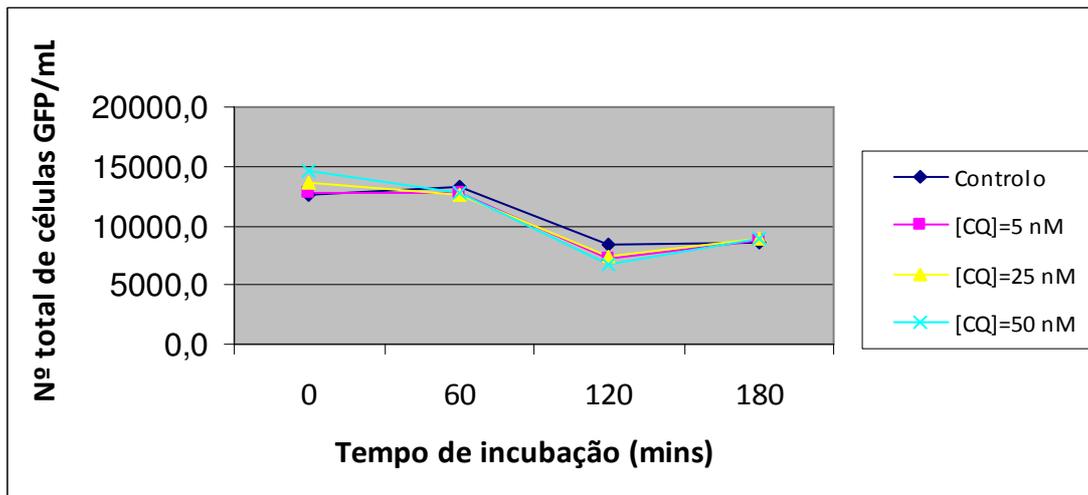


Figura 24. Análise do efeito da cloroquina numa suspensão de sangue de ratinho infectado com *P.berghei* ANKA GFP, através de contagens absolutas do número e células com fluorescência GFP.

Como apenas o parasita emite fluorescência, as células GFP positivas são eritrócitos infectados, observando-se também um decréscimo entre 60-120 minutos (Figura 24), semelhante ao observado na curva traçada com o número total de células (Figura 23).

Em termos de depolarização das células, o efeito inibitório é visível ao fim de 60-120 minutos (Figura 25 e Figura 26).

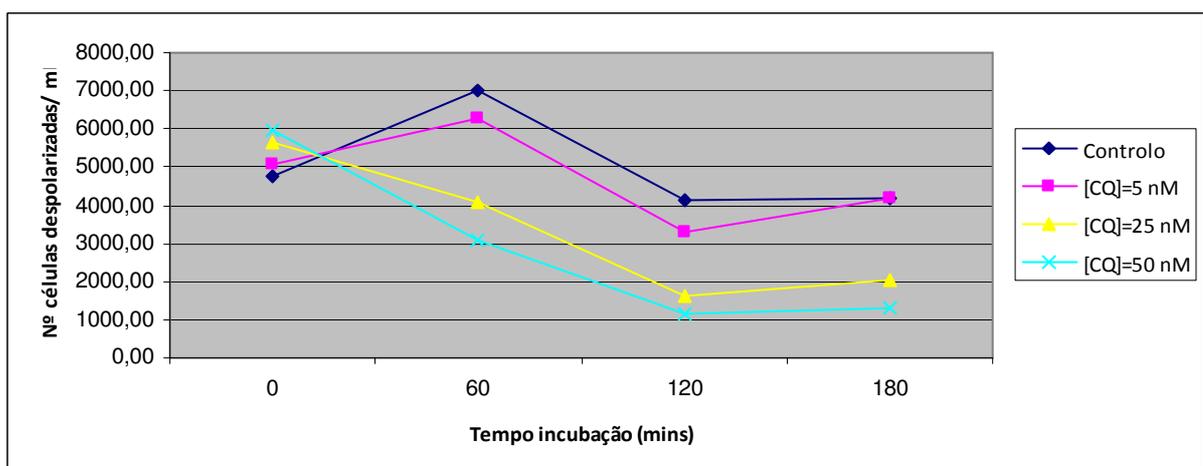


Figura 25. Análise do efeito da cloroquina (CQ) numa suspensão de sangue de ratinho infectado com *P.berghei* ANKA GFP, através de contagens absolutas do número de células muito despolarizadas.

Em relação às concentrações de 25 nM e 50 nM é evidente o efeito inibitório da cloroquina, diminuindo o número de células despolarizadas. Este efeito por comparação, com experiências anteriores, também é evidenciado em termos percentuais (Figura 26).

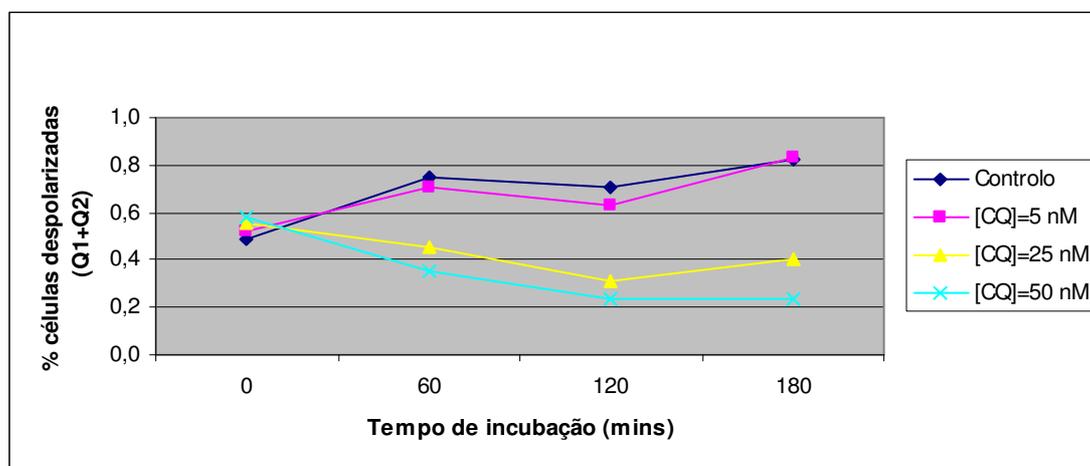


Figura 26. Análise do efeito da cloroquina (CQ) em eritrócitos de ratinho infectados com *P.berghei* ANKA GFP, através da percentagem de células muito despolarizadas (Q1+Q2)

Para que os dois métodos sejam comparáveis é necessário que a mesma população seja analisada, assim foi traçado um gate R2 (a limitar as células com fluorescência devida a GFP) e aplicado ao histograma *depol* SSC/SSC. Com esta estratégia de traçar o *gate* obtemos uma população de eritrócitos infectados muito despolarizados. Com os dados obtidos construiu-se um quadro que evidencia as diferenças, em termos de factor de redução, relativamente ao controlo.

Quadro 7. Comparação entre os dois métodos com base no factor de redução do número células com fluorescência GFP e células muito despolarizadas.

Eventos Analisados	Tempo 0	Tempo 120	Factor de Redução
Células GFP +/ml			
Controlo	12765	8320	1,5x
50nM CQ	15250	6145	2,4x
Q1+Q2 Celulas muitos despolarizadas (nº Total/ml)			
Controlo	3325	2415	1,4x
50nM CQ	4060	925	4,4x
Q1+Q2 Celulas muitos despolarizadas (%)			
Controlo	25,5	29,0	0,8x
50nM CQ	26,4	13,8	1,9x

V. DISCUSSÃO

Um dos problemas da malária à escala global e a rápida disseminação da resistência aos fármacos anti-maláricos, mais utilizados, como a cloroquina, torna urgente a investigação e o fabrico de novos fármacos para o combate à doença. Para tal é necessário investigar as resistências estabelecidas, relativamente, aos fármacos existentes.

O efeito *in vitro* do fármaco no parasita, tem sido quantificado pelo metabolismo de um substrato marcado com radioisótopo, que permite seguir a maturação e a viabilidade do parasita quando exposto a várias concentrações de fármaco (Desjardins, 1979). A hipoxantina marcada com titrio é o radioisótopo mais utilizado no ensaio referido. Embora, seja considerado o método de referência, dada a sua sensibilidade e reprodutibilidade, o uso de radioisótopos, para além de ser de elevado custo, exige laboratórios com um determinado nível de segurança, com vista à eliminação de material radioactivo. Sendo um método que envolve múltiplos passos no seu procedimento torna-se impraticável a sua adaptação a um número crescente de testes.

Torna-se assim necessário desenvolver um teste que seja objectivo, simples, sensível, rápido e independente da utilização de radioisótopos. A citometria de fluxo é um dos métodos com maior potencial para o estabelecimento de um sistema ideal. Vários ensaios de citometria de fluxo têm sido desenvolvidos no sentido de desenvolver um teste de susceptibilidade aos anti-maláricos (Franklin *et al*, 1986, Saito-Ito *et al*, 2001, Contreras, 2004, Izumiyama, 2009).

Este citómetro possui um sistema óptico que permite a análise de células com elevada precisão. A substituição do fotodetector, habitualmente utilizado para a detecção de FSC, por um tubo fotomultiplicador (aplicado no CyFlow) permite aumentar a sensibilidade da aquisição em 5 vezes (Shapiro, 2003).

O início deste trabalho consistiu no ajuste dos parâmetros do equipamento de forma a otimizar as condições de aquisição das células.

A optimização dos parâmetros, foi feita de acordo com a população de células que se pretendia analisar, para que os eventos mais isolados e mais aglomerados pudessem ser analisados.

Um componente muito importante que importa analisar é o sistema de fluidos hidrodinâmico (*Sheath*), devido a eventuais interferências. Para minimizar estas interferências utilizou-se sempre água de qualidade tipo I, tirada do sistema Milli-Q. Esta água é ultra-pura com uma resistividade de 18,2 MΩ.cm e submetida a um filtro de 0,22 µm. A recolha desta água foi feita, de modo a não produzir bolhas para que não houvesse introdução das mesmas no sistema, o que poderia originar problemas no processo de aquisição das células.

Foram avaliadas as possíveis interferências da água do *Sheath*, o meio de cultura RPMI 1640 completo e o tampão FACS, tendo sido analisadas contagens absolutas de amostras destes materiais. Os resultados obtidos mostraram que as interferências eram mínimas.

O estabelecimento das condições de cultura foi um procedimento, igualmente importante, pois existem diversos factores que podem influenciar a cultura de células.

Importa referir que nos primeiros ensaios houve uma contaminação das culturas, com *Pseudomonas aeruginosa*, o que veio reforçar um aspecto muito importante que é o de assegurar as condições de esterilidade.

Assim, com base nos estudos revistos por Basco 2007 e em protocolos específicos para a cultura de *Plasmodium berghei* (Janse, 2004), foram estabelecidas as condições de cultura de sangue de ratinho, infectado com a estirpe de *Plasmodium berghei* ANKA, que é um modelo experimental muito utilizado no estudo da malária cerebral. Quando esta estirpe está transfectada com a proteína GFP, PbGFP, permite a visualização e a investigação da viabilidade do parasita, em culturas não sincronizadas.

O meio de cultura utilizado foi o meio RPMI 1640, suplementado com soro bovino fetal, aminoácidos não essenciais, glutamina, tampão HEPES (impede grandes alterações no pH) e antibióticos (penicilina e estreptomicina). Contém um indicador de pH, que permite avaliar a estabilidade do meio, através da mudança de cor. Este meio de cultura é o mais indicado para ensaio de susceptibilidade *in vitro*. Outro factor importante foi a preparação das soluções de cloroquina, realizada em condições de esterilidade (em câmara de fluxo laminar). O solvente utilizado foi a água, pois segundo o que está descrito em Basco, 2007, a cloroquina é muito solúvel em água e apresenta uma estabilidade de vários anos, quando armazenada a 4°C.

A escolha da cloroquina não foi arbitrária e está relacionada com dois aspectos importantes: é dos fármacos com mais resistências descritas de *P. falciparum* e o seu mecanismo de acção está envolvido na síntese de hemozoína, que foi o parâmetro

utilizado neste trabalho para analisar o efeito inibitório da cloroquina, na estirpe sensível de *Plasmodium berghei* ANKA.

As primeiras experiências (Figura 17 e Figura 19) permitiram a escolha das concentrações de cloroquina, a utilizar, com base na curva dose-resposta do fármaco. A concentração mais baixa de 5 nM, foi escolhida por não apresentar efeito, constituindo assim mais um controlo. A concentração de 25 nM e 50 nm têm um efeito inibitório visível razão pela qual foram escolhidas.

A análise do efeito inibitório da cloroquina na estirpe sensível de *Plasmodium berghei* ANKA, foi feita com base na fluorescência específica do parasita, devida à proteína GFP e na despolarização característica da hemozoína, presente em maior quantidade nas formas mais maduras. Por esta razão foram escolhidos os eventos mais despolarizados (Q1+Q2), no gráfico *depol/ SSC*.

A análise dos resultados, foi feita com base na aquisição de 50.000 eventos, essencialmente para otimizar os parâmetros do citómetro de fluxo, e em contagens absolutas das células, que permitiu fazer uma avaliação do efeito inibitório da cloroquina no parasita.

Um aspecto observável, aos 120 minutos é uma redução de cerca de 50% do número total de células. O facto desta diminuição ser tão precoce levanta algumas questões, nomeadamente em relação ao metabolismo do parasita que parece ser mais acelerado (Mons *et al*, 1983), relativamente a estirpes de *P.falciparum*, pois possui um ciclo de vida mais curto Este aspecto pode conduzir a uma rápida depleção dos nutrientes provenientes do meio de cultura e a acumulação dos produtos do metabolismo, que sendo tóxicos para as células, podem originar a sua

lise. Assim em culturas estáticas em RPMI, as condições podem determinar a inibição do crescimento do parasita e conseqüentemente o seu desenvolvimento (Mons *et al*, 1983, Shuster, 2002).

No entanto, embora houvesse uma redução do número total de células, o efeito inibitório da cloroquina é visível ao fim de 1 hora. Por comparação com o controlo, foi possível calcular um factor de redução que pode ser uma forma de comparar os métodos. Embora as populações estudadas não sejam as mesmas, pois as células com fluorescência (GFP) são os eritrócitos infectados com o parasita e as células mais despolarizadas (Q1+Q2) correspondem apenas a uma fracção dessas células, se for feito um gate em R2, que corresponde às células GFP positivas, que são os eritrócitos infectados e se for aplicado ao histograma *depol*/SSC, estão a ser analisadas as mesmas células.

Analisando os resultados do controlo e da concentração de cloroquina de 50 nM (Quadro 7), observou-se uma redução de 2,4x, no número de células GFP positivas e uma redução de 4,4x nas células despolarizadas, tendo em conta que o controlo também sofreu uma redução (devido a uma possível lise dos eritrócitos infectados) de 1,5x (nas células GFP) e 1,4x (nas células despolarizadas), a diferença (0,9x e 3x) sugere que o efeito inibitório da cloroquina é possível de ser detectado mais precocemente com base, na análise das células despolarizadas e que não é possível detectar esse mesmo efeito por fluorescência (pelo menos no intervalo de tempo estudado).

Este efeito rápido, observável nas curvas dose-resposta é característico do modo de acção da cloroquina, na estirpe de *Plasmodium berghei*. Isto pode dever-se

a uma agregação (*cumpling*) dos vacúolos contendo hemozoína ou a uma acumulação do grupo hémico por interacções com a cloroquina, conduzindo à morte do parasita, pela não formação de hemozoína.

Estudos *in vivo* e *in vitro*, realizados nas décadas de 60 e 70, desenvolvidos por Warhurst *et al* , 1967, 1972, sugerem que o tratamento com a cloroquina, fragiliza as membranas dos vacúolos digestivos originando um *clumping* do pigmento malárico, o que de certa forma, justifica o rápido efeito inibitório do fármaco.

No entanto, isto pode ser um efeito primário ou secundário. Primário se a cloroquina actuar de uma forma directa na hemozoína, promovendo o *clumping* ou a sua desintegração, por interacção entre os cristais de hemozoína e o fármaco (Weissbuch & Leiserowitz, 2008). Secundário, se a cloroquina actuar a nível do grupo hémico, impedindo a formação de hemozoína, conduzindo assim a uma acumulação nos eritrócitos parasitados, o que resulta na morte do parasita. Esta hipótese foi defendida por Fitch, 1998, em estudos feitos em *Plasmodium berghei*.

Estes trabalhos mostram que a detecção da hemozoína parece ser um bom instrumento de estudo do parasita no seu estadio intraeritrocitário e embora apresente a limitação de não haver um modelo animal que represente todos os estadios do ciclo de vida do parasita.

A detecção da hemozoína por citometria de fluxo, foi demonstrada em vários estudos (Hänscheid, 2000a, 2000b) e como existem muitos fármacos anti-maláricos (cloroquina, mefloquina, quinino entre outros, *ver* Quadro 1) que interferem com a formação de hemozoína (Hänscheid, 2007) e este pode ser um método rápido e fiável.

A utilização do Cyflow torna possível, de uma forma simples e rápida, contagens do número de células por unidade de volume. Com base nos resultados obtidos e com o traçado das curvas dose-resposta foi possível analisar o efeito inibitório da cloroquina ao fim de poucas horas de incubação. No entanto, são necessários estudos adicionais nalguns aspectos considerados importantes. Como seja, a razão pela qual o número de células decresce em cerca de 50%, logo nas primeiras horas. Relativamente a este aspecto, o meio poderá ser suplementado com componentes mais nutritivos bem como atmosfera de incubação poderá ser alterada.

O modelo animal também pode ser considerada uma limitação, pois embora permita estudar uma parte do estadio do ciclo de vida do parasita, sendo um modelo vivo é influenciado por diversos factores que podem originar falsos resultados. As culturas contínuas de *P. falciparum* constituem uma boa alternativa ao modelo animal e uma vez implementadas e optimizadas as condições de cultura, permitem fazer mais estudos, com a vantagem de se estar a estudar a resistência no *P. falciparum*, com a desvantagem de ser um sistema fechado, não dinâmico.

O rápido efeito inibitório da cloroquina também importa ser esclarecido, e para confirmar o *clumping*, as culturas poderão ser incubadas numa mistura de cloroquina e quinino, que a confirmar retarda o efeito inibitório da cloroquina.

A citometria de fluxo constitui assim uma alternativa aos vários métodos fenotípicos. Importa, porém, desenvolver citómetros de fluxo de dimensões mais reduzidas, como o CyFlow, utilizado neste trabalho, que é transportável e ocupa pouco espaço (ideal para laboratórios pequenos). No entanto, o custo destes

equipamentos ainda é elevado o que constitui uma dificuldade na sua implementação.

Em resumo, embora haja aspectos a confirmar e a desenvolver, este trabalho mostrou que a citometria de fluxo pode trazer vantagens importantes para os testes de susceptibilidade *in vitro*.

VI. CONCLUSÃO

Este trabalho permitiu observar o efeito inibitório da cloroquina numa estirpe sensível de *Plasmodium berghei* ANKA, com base na detecção de hemozoína, por citometria de fluxo.

Por constituir um método rápido, simples e sem adição de reagentes pode ser a base de um novo teste de susceptibilidade *in vitro*.

No futuro, seria interessante alargar o estudo a estirpes resistentes de *Plasmodium berghei*, num estudo paralelo ao realizado e a outros fármacos anti-maláricos. Faz parte também deste projecto a implementação de culturas contínuas de *Plasmodium falciparum* sensíveis e resistentes, de forma a se poder aplicar o método desenvolvido neste trabalho.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez-Barrientos A., Arroyo J., Cantón R., Nombela C., Sánchez-Pérez M.. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 2000, 13(2): 167-195.
- Baniecki ML, Wirth DF, Clardy J. High-throughput Plasmodium falciparum growth assay for malaria drug discovery. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51:716-23.
- Basco LK. Field application of in vitro assays for the sensitivity of human malaria parasites to antimalarial drugs. Geneva, World Health Organization, 2007.
- Baton LA. and Ranford-Cartwright, LC. Spreading the seeds of million murdering death*: metamorphoses of malaria in the mosquito, *TRENDS Parasitol.* 2005; 21(12) December
- Bloland P. Drug resistance in malaria. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.4. Geneva: World,Health Organization, 2001.
- Brown, M., Wittwer, C. 2000. Flow cytometry: Principles and clinical applications in haematology. *Clinical Chemistry* 46(8B): 1221-1229.
- Chris Janse. Plasmodium berghei: general parasitological methods. Protocols from Leiden University Medical Center (LUMC). The Netherlands. 2004.
- Contreras CE, Rivas MA, Domínguez J, Charris J, Palcios M, Bianco N, Blanca I. Stage-specific activity of potential antimalarial compounds measured in vitro by

- flow cytometry in comparison to optical microscopy and hypoxanthine uptake. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99(2): 179-184.
- Corbett Y, Herrera L, Gonzalez J, Cubilla L, Capson TL, Coley PD, Kursar TA, Romero LI, Ortega-Barria E. A novel DNA-based microfluorimetric method to evaluate antimalarial drug activity. Am J Trop Med Hyg. 2004; 70: 119-24.
 - Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. Antimicrob Agents Chemother. 1979;16:710-8.
 - Druille P, Moreno A, Blanc C, Braseus P, Jacquier P. A colorimetric study *in vitro* sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2001; 64 (5.6): 233-241.
 - Egan TJ, Mavuso WW, Ncokazi KK. The mechanism of beta-haematin formation in acetate solution. Parallels between haemozoin formation and biomineralization processes. Biochemistry 2001; 40:204–13.
 - Fitch CD. Involvement of heme in the antimalarial action of chloroquine. Transaction of the American Clinical and Climatological Association 1998; 109:97-105.
 - Franke-Fayard B, Trueman H, Ramesar J, Mendoza J, van der Keur M, van der Linden R, Sinden RE, Waters AP, Janse CJ. A *Plasmodium berghei* reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. Mol Biochem Parasitol. 2004;137:23-33.

- Franklin RM, Brun R, Grieder A. Microscopic and flow cytometric analysis of parasitemia in cultures of *Plasmodium falciparum* vitally stained with Hoechst 3342—application to studies of antimalarial agents. *Zeitschrift für Parasitenkunde (Parasitology Research)*, 1986, 72, 201–212.
- Greenwood, BM, Bojang, K, Whitty, CJ, Targett, GA. Malaria. *Lancet* 2005; 365:1487.
- Guerra, C.A., Gikandi, P.W., Tatem, A.J., Noor, A.M., Smith, D.L., Hay, S.I., Snow, R.W. The limits and intensity of *Plasmodium falciparum* transmission: implications for malaria control and elimination worldwide. *PLoS Med* 2008; 5(2):e38.
- Hänscheid T, Egan TJ, Grobusch MP. Haemozoin: from melatonin pigment to drug target, diagnostic tool, and immune modulator. *Lancet Infect Dis.* 2007;7:675-85.
- Hänscheid T, Längin M, Codices V, Luty AJ, Adegnika AA, Kremsner PG, Grobusch MP. Automated detection of haemozoin-containing monocytes for the diagnosis of malaria in microscopically negative cases during pregnancy. *Acta Trop.* 2008 Dec 13.
- Hänscheid T, Längin M, Lell B, Pötschke M, Oyakhirome S, Kremsner PG, Grobusch MP. Full blood count and haemozoin-containing leukocytes in children with malaria: diagnostic value and association with disease severity. *Malar J.* 2008 Jun 12;7:109.
- Hänscheid T, Melo-Cristino J, Pinto BG. Automated detection of malaria pigment in white blood cells for the diagnosis of malaria in Portugal. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 64 :290-2.

- Hänscheid T, Pinto BG, Cristino JM, Grobusch MP. Malaria diagnosis with the haematology analyser Cell-Dyn 3500: What does the instrument detect? Clin Lab Haematol. 2000a; 22:259-61.
- Hänscheid T, Valadas E, Grobusch MP. Automated malaria diagnosis using pigment detection. Parasitol Today. 2000b; 16: 549-51.
- Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. Lancet Infect Dis 2004; 4:327-336.
- Hempelmann E, Egan TJ. Pigment biocrystallization in *Plasmodium falciparum*. Trends Parasitol 2002; 18: 11.
- Hyde, JE. Drug resistant malaria- an insight. FEBS J. 2007; 274(18):4688-4698.
- Izumiyama S, Omura M, Takasaki T, Ohmae H, Asahi H. *Plasmodium falciparum*: Development and validation of a measure of intraerythrocytic growth using SUBR Green I in a flow cytometer. Experimental Parasitology. 2009; 121: 144-150.
- Jamjoom GA. Dark-field microscopy for detection of malaria in unstained blood films. J Clin Microbiol. 1983; 17: 717–21.
- Jamjoom GA. Improvement in dark-field microscopy for the rapid detection of malaria parasites and its adaptation to field conditions. Trans R Soc Trop Med Hyg 1991; 85: 38–39.
- Jamjoom GA. Patterns of pigment accumulation in *Plasmodium falciparum* trophozoites in peripheral blood samples. Am J Trop Med Hyg 1988; 39: 21–25.

- Johnson JD, Denuall RA, Gerena L, Lopez-Sanchez M, Roncal NE, Waters NC. Assessment and continued validation of the malaria SYBR green I-based fluorescence assay for use in malaria drug screening. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51: 1926-33.
- Kaddouri H, Nakache S, Houzé S, Mentré F, Le Bras J. Assessment of the drug susceptibility of *Plasmodium falciparum* clinical isolates from africa by using a *Plasmodium* lactate dehydrogenase immunodetection assay and an inhibitory maximum effect model for precise measurement of the 50-percent inhibitory concentration. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:3343-9.
- Krugliak M, Zhang F, Ginsburg H. Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins. *Mol BiochemParasitol* 2002;119:249–56.
- Laufer MK, Djimdé AA, Plowe CV. Monitoring and deterring drug-resistant malaria in the era of combination therapy. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77 (6 Suppl): 160-9.
- Lauwrence C, Olson JA. Birefrigent hemozoin identifies malaria. *Am J Clin Pathol* 1986; 86:360-363.
- Lawrence C. Laveran remembered: malaria haemozoin in leucocytes. *Lancet* 2002; 353: 1852.
- Mackintosh C.L., Beeson, J.G. and Marsh, K. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends Parasitol.* 2004; 20, (12): 597-603.
- May J., and C. G. Meyer. Chemoresistance in *falciparum* malaria. *Trends Parasitol.* 2003; 19: 432– 435.

- Makler MT et al. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1993, 48:739–741.
- Mons B, Janse CJ, Croon JJAB, van der Kaay HJ. *In vitro* culture of *Plasmodium berghei* using a new suspension system. *Int. J. Parasitol.* 1983; 13:213:217.
- Nguyen-Dinh P, Trager W. Chloroquine resistance produced *in vitro* in an African strain of human malaria. *Science*, 1978, 200:1397–1398.
- Nguyen-Dinh P, Trager W. *Plasmodium falciparum* *in vitro*: determination of chloroquine sensitivity of three new strains by a modified 48-hour test. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1980, 29:339–342.
- Noedl H, Attlmayr B, Wernsdorfer W H, Kollaritsch H, Miller R S. A histidine-rich protein 2-based malaria drug sensitivity assay for field use. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2004; 71: 711–714.
- Noedl, H, Wongsrichanalai C, Wernsdorfer, W. Malaria drug-sensitivity testing: new assays, new perspectives. *Trends Parasitol.* 2003, 19(4): 175-181.
- Orfão A, González de Buitrago JM. La Citometria de flujo en el laboratorio clínico. *Monografías del Comité de Publicaciones de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología molecular.* Págs: 1-30.1995.
- Rieckmann KH. Determination of the drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. *Journal of the American Medical Association*, 1971, 217:573 – 578.
- Rieckmann KH. Visual *in-vitro* test for determining the drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. *Lancet.* 1982;1 (8285): 1333-5.

- Saito-Ito A et al. A rapid, simple and sensitive flow cytometric system for detection of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology International* 2001,50:249–257.
- Schuster FL. Cultivation of *Plasmodium* spp. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15: 355-364
- Shapiro HM, Perlmutter NG. Killer applications: toward affordable rapid cell-based diagnostics for malaria and tuberculosis. *Cytometry B Clin Cytom.* 2008; 74 Suppl 1: S152-64.
- Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry*, 4th Edition. Wiley Life Sciences. 2003 (faltam as págs)
- Singh, B., Sung, L., Matusop, A. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings, *Lancet* 2004; 363:1017.
- Stevenson, M.M. and Riley, E.M. Innate immunity to malaria. *Nature* 2004. *Immunology*, 4, 169-180.
- van Vianen PH, et al Automated flow cytometric analysis of drug susceptibility of malaria parasites. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1990, 43:602–607.
- Warhurst DC. Mode of action of chloroquine on *Plasmodium berghei* and *P. cynomolgi*. *Nature* 1967, 214 (5091): 935-936.
- Warhurst DC., Homewood CA, Peters W, Baggaley VC. Pigment changes in *Plasmodium berghei* as indicators of activity and mode of action of antimalarial drugs. *Proc. Helminthological Society of Washington* 1972; 39: 271-278.

- Weatherall, DJ, Miller, LH, Baruch, DI, Marsh, K., Ogobara, KD, Casals-Pascual, C., Roberts, DJ. Malaria and the red cell. Hematology 2002 (reprinted). Original paper: Nature 2002; 415 (6872): 673-9.
- Webster GT, Tilley L., Deed S, McNaughton D, Wood BR. Resonance Raman spectroscopy can detect structural changes in haemozoin (malaria pigment) following incubation with chloroquine in infected erythrocytes. FEBS Letters 2008; 582:1087-1092.
- Weissbuch I, Leiserowitz, L. Interplay between malaria, crystalline heozoin formation, and antimalarial drug action and design. Chem. Rev. 2008; 108 4899-4914.
- Wellems TE, Plowe, CV. Chloroquine-resistant malaria. Journal of Infectious Disease. 2001; 184: 770-6.
- White, NJ. The role of anti-malarial drugs in eliminating malaria. Malaria Journal 2008; 7 (Suppl 1):S8
- WHO. Advances in malaria chemotherapy. Report of a WHO Scientific Group. Geneva, World Health Organization, 1984 (WHO Technical Report Series No. 711)
- WHO. In vitro micro-test (MARK III) for the assessment of the response of Plasmodium falciparum to Chloroquine, mefloquine, quinine, amodiaquine, Sulfadoxine/pyrimethamine and artemisinin. Geneva, World Health Organization, 2001.
- WHO. Malaria Report 2008. Geneva, World Health Organization, 2008.

- WHO. The use of antimalarial drugs. Report of an informal consultation, 13–17 November 2001, Geneva, Switzerland. WHO/CDS/RBM/2001.33. Geneva: World Health Organization, 2001.
- Witkowski, B., Berry, A., Benoit-Vical, F. Resistance to antimalarial compounds: methods and applications. *Drug Resistance Updates* 2009; 12:42-50.
- Wongsrichanalai, C., Pickard AL, Wernsdorfer, WH, Meshnick. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 209-218.
- Ziegler J, Chang RT, Wright DW. Multiple-antigenic peptides of histidine-rich protein II of *Plasmodium falciparum*: dendrimeric biomineralization templates. *J Am Chem Soc* 1999; 121: 2395–400.