



ISABEL CRISTINA NARANJO PRADO

Avaliação *ex-vivo* dos efeitos antimaláricos da violaceína em isolados Amazônicos de *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* e análise da sua atividade em camundongos infectados com cepas de *P. chabaudi* resistentes a antimaláricos

CAMPINAS

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ISABEL CRISTINA NARANJO PRADO

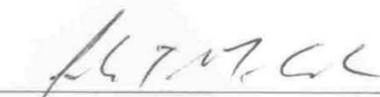
Avaliação ex-vivo dos efeitos antimaláricos da violaceína em isolados Amazônicos de *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* e análise da sua atividade em camundongos infectados com cepas de *P. chabaudi* resistentes a antimaláricos

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas Como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em de Genética e Biologia Molecular, na área de Imunologia

Orientador: Fabio Trindade Maranhão Costa

Co-orientadora: Stefanie Costa Pinto Lopes

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA ISABEL CRISTINA NARANJO PRADO, E ORIENTADA PELO PROF.DR. FABIO TRINDADE MANAHÃO COSTA.



ASSINATURA DO ORIENTADOR

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

N164a Naranjo Prado, Isabel Cristina, 1987-
Avaliação *ex-vivo* dos efeitos antimaláricos da violaceína em isolados amazônicos de *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* e análise da sua atividade em camundongos infectados com cepas de *P. chabaudi* resistentes a antimaláricos / Isabel Cristina Naranjo Prado. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Fabio Trindade Maranhão Costa.
Coorientador: Stefanie Costa Pinto Lopes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Violaceína. 2. *Plasmodium chabaudi*. 3. *Plasmodium falciparum*. 4. Artemisinina. I. Costa, Fabio Trindade Maranhão, 1972-. II. Lopes, Stefanie Costa Pinto, 1983-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: *Ex-vivo* evaluation of antimalarial effects of violacein in amazonian isolates of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* and analysis of its activity in mice infected with resistant strains of *P. chabaudi*

Palavras-chave em inglês:

Violacein

Plasmodium chabaudi

Plasmodium falciparum

Artemisinin

Área de concentração: Imunologia

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Fabio Trindade Maranhão Costa [Orientador]

Marcelo Brocchi

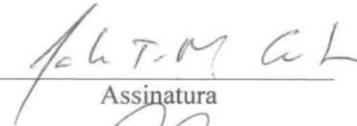
Pedro Vitor Lemos Cravo

Data de defesa: 21-03-2014

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa (orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi


Assinatura

Prof. Dr. Pedro Vitor Lemos Cravo


Assinatura

Dr. Alessandro Dos Santos Farias

Assinatura

Prof. Dr. Alejandro Miguel Katzin

Assinatura

RESUMO

A malária é responsável por cerca de 300 milhões de casos de infecção e 1 milhão de mortes por ano. No Brasil, em 2012, foram registrados cerca de 270 mil casos sendo a malária *vivax* responsável por 85% destes. Ainda, é frequentemente reportada falha terapêutica aos antimaláricos convencionais (como cloroquina e mefloquina) em infecções por *P. falciparum*, principalmente, mas também por *P. vivax*. Sendo assim, terapias combinadas com artemisinina e seus derivados (ACT) são atualmente recomendadas. No entanto, resistência aos derivados da artemisinina já é evidente e a busca por novos compostos com atividade antimalárica é urgente. A violaceína, pigmento violeta extraído de bactérias Gram negativas, demonstrou apresentar elevada atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo* em trabalho anterior de nosso grupo. Neste sentido, este projeto tem como objetivo aprofundar a investigação a respeito da atividade antimalárica da violaceína avaliando seu papel em isolados amazônicos de *P. falciparum* adaptados recentemente em cultura, e em *P. vivax* após imediata coleta de sangue de pacientes infectados. Além disso, investigamos o potencial da violaceína como terapia combinada junto ao artesunato no tratamento de parasitas murinos resistentes a este e a outros antimaláricos como a cloroquina. Inicialmente foram testadas dois diferentes tipos de violaceína *in vitro* contra *P. falciparum* 3D7: uma comercial extraída de *Janthinobacterium lividum* (vJl- IC₅₀: 227 nM) e outra extraída de *Chromobacterium violaceum* (vCv- IC₅₀: 390 nM). Apesar de não termos encontrado uma diferença na atividade antimalárica entre as duas violaceínas, a extraída de *C. violaceum* teve uma baixa toxicidade em eritrócitos (<400 nM) e em células de hepatoma humano (<800 nM). Devido a esta baixa toxicidade, somente vCv foi avaliada quanto sua atividade antimalárica. Demonstramos que vCv apresentou IC₅₀ similar ao encontrado para *P. falciparum* 3D7 (IC₅₀ média= 419,8 nM) em 7 isolados de campo de *P. falciparum*. Ainda, em ensaios *in vivo*, utilizando cepas murinas de *P. chabaudi*, vCv conseguiu diminuir significativamente (P<0,05) a parasitemia no dia pico da infecção em cepas resistentes à cloroquina (30CQ) e a artesunato e mefloquina (ATNMF1). Adicionalmente, nos testes realizados em *P. vivax* a vCv parece evitar o amadurecimento parasitário nos quatro isolados testados. Coletivamente, podemos concluir que a vCv apresentou um efeito antimalárico em cepas de *P. falciparum* e pode ser especialmente útil quando usada em combinação com artesunato no tratamento de camundongos infectados com cepas resistentes. Finalmente, ensaios adicionais de amadurecimento com isolados de *P. vivax* necessitam ser conduzidos para a comprovação do efeito da vCv nesta espécie.

ABSTRACT

Malaria is responsible for about 300 million infections and one million deaths per year. In Brazil in 2012, about 270 thousand were reported and malaria *vivax* accounts for 85% of these. Still, it is frequently reported treatment failure with conventional antimalarials (as chloroquine and mefloquine) mainly in infections with *P. falciparum* but also by *P. vivax* parasite. Because of that combination therapies with artemisinin and its derivatives (ACT) are now currently recommended. In a previous work, our group demonstrated that violacein was able to inhibit the *in vitro* growth of laboratory strains of *P. falciparum* and also to strongly control the parasitemia of mice infected with *P. chabaudi*. This project aims to investigate further the antimalarial activity of violacein by evaluating its activity in Amazonian isolates of *P. falciparum* recently adapted in culture, and in *P. vivax* isolates immediately after blood collection from infected patients. Furthermore, we investigate the potential of violacein as combination therapy with artesunate in the treatment of murine strains which are resistant in different levels to artesunate, mefloquine and chloroquine. The antimalarial activity of violacein was initially investigated *in vitro* against *P. falciparum* 3D7 using two different types of violacein, one commercial, extracted from *Janthinobacterium lividum* (vJl-IC₅₀: 227 nM), and another extracted from *Chromobacterium violaceum* (vCv-IC₅₀: 390 nM) by our collaborators. In spite of no difference in the antimalarial activity between the two violaceins, the one extracted from *C. violaceum* had the lowest toxicity in erythrocytes (<400 nM) and in human hepatoma cells (<800 nM). Because of this, the antimalarial activity only of vCv was evaluated against 7 field isolates of *P. falciparum* showing a similar IC₅₀ to that found for *P. falciparum* 3D7 (IC₅₀= 419.8 nM). The antimalarial activity was also evaluated in murine strains of *P. chabaudi* showing a significant ($P < 0.05$) parasitemia decrease in the peak day in the two clones of *P. chabaudi* tested, one resistant to chloroquine (30CQ) and another resistant to artesunate and mefloquine (ATNMF1). Additionally, in *P. vivax* vCv was capable to reduce the parasite maturation in the four isolates tested. Therefore we can conclude that the vCv has an antimalarial effect on field isolates of *P. falciparum* and can be especially usefulvaluable when used in combination with artesunate in the treatment of mice infected with resistant strains. Moreover, more assays should be conducted using blood infected with *P. vivax* to corroborate its effect in inhibiting the maturation of trophozoites.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. Malária: agente etiológico e vetor	2
1.2. Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	3
1.3. Antimaláricos e resistência	6
1.4. Modelos murinos resistentes a antimaláricos	12
1.5. Violaceína	14
2. Objetivos.....	19
3. Metodologia.....	21
3.1. Violaceína	22
3.2. Cultura de formas sanguíneas de <i>P. falciparum</i>	22
3.3. Ensaio de citotoxicidade.....	23
3.3.1. Ensaio de toxicidade em eritrócitos não infectados.....	23
3.3.2. Ensaio de citotoxicidade em células HepG2, CHO 745 e MCF-7	23
3.4. Atividade antimalárica em <i>P. falciparum</i>	24
3.5. Atividade antimalárica em <i>Plasmodium vivax</i>	25
3.6. Análise da atividade <i>in vivo</i> em parasitas murinos resistentes	27
3.7. Análise estatística	28
4. Resultados e discussão	29
4.1. IC_{50} das drogas antimaláricas convencionais	30
4.2. Violaceína <i>Jantibacterium lividum</i> (vJI).....	32
4.2.1. Toxicidade	32
4.2.2. Atividade antimalárica.....	34
4.3. Violaceína <i>Chromobacterium violaceum</i> (vCv)	35
4.3.1. Toxicidade	35
4.3.2. Atividade antimalárica <i>in vitro</i>	37
4.4. Atividade <i>in vivo</i> da violaceína.....	39
4.4.1. Testes com <i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i> AS-30CQ	39
4.4.2. Testes com <i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i> AS-ATNMF1	42
4.5. Atividade da vCv em amostras de pacientes infectados com <i>P. vivax</i>	47
5. Conclusões.....	51
6. Referências bibliográficas	53

Dedico este trabajo a mi amada madre *Clide Prado Manrique* y a mi hermanita *Lina Marcela Maranjo Prado*, pero especialmente dedico este trabajo a mi adorado padre *Mario Maranjo Maranjo*, un hombre que me ha hecho lo que soy hoy, que siempre me ha apoyado y siempre está dispuesto a escucharme y brindarme un buen consejo. Me enseñó el valor de la familia del amor y del perdón; y especialmente me enseñó que las mujeres somos fuertes y podemos llegar a donde nos propongamos.

¡Te amo papi, eres mi vida!

AGRADECIMENTOS

Agradezco inmensamente todo el apoyo, la paciencia y especialmente el amor inmenso e incondicional de mi madre, una mujer fuerte y plena, que siempre me impulsó a estudiar y a ser mejor, nunca me dejó desistir y cada día me acompaña y me cuida como su niña. Igualmente agradezco a mi hermanita por la camaradería, la compañía, el apoyo y especialmente la paciencia pues sé que ha necesitado bastante. En general agradezco a mi hermosa familia porque este nuevo peldaño que alcanzo no hubiera sido posible sin su soporte, espero estar retribuyendo un poco todo lo que hacen por mi cada día.

Agradezco también a Juan Andrés por su compañía, por desvelarse conmigo en el lab, por la ayuda en los cálculos pero especialmente por brindarme su amor y su amistad. A mis amigos Meli, Tere, Migue, Cintia, Carola, Stephane, Jhonny, Javi, Cheo y tantos otros que no cabrían en estas pocas líneas por su amistad inolvidable.

A mis hermanos Moni, Leo y Sandro, a su madre Rubelly y a mis sobrinos, porque siempre me apoyaron y se alegraron por mis logros; a mis tíos, primos y en general a toda mi familia. A mi mejor amiga Maria Isabel, a Andreita, Samantha, Natalia V y a todas mis amigas.

A la Univalle, porque cuando salí de Colombia percibí que nuestra educación es buena y de alto nivel.

Agradeço muito ao Fabio por me permitir vir e formar parte de sua equipe de trabalho, pela compreensão e apoio quando as coisas não saíram como esperávamos. A Stefy pela imensa ajuda que foi para mim, por me acolher como a sua orientada e pelas discussões, as vezes necessárias, nunca vou esquecer você.

Agradeço a todas as meninas do lab, a Marcele, Ana, Ju, Catarina e Carol por me acolher e me aceitar com todos os meus defeitos e erros, por me ensinar com paciência e carinho, por me abrir as portas das suas casas e estar abertas a me escutar e consolar quando foi preciso, vocês foram a minha família aqui e sempre vou levar vocês no meu coração.

Muito obrigada a todos meus amigos da Colômbia, Espanha, Argentina, Chile, França e especialmente aos brasileiros, porque fizeram que estes 2 anos fossem os melhores anos da minha vida, conheci costumes diferentes, comidas novas, línguas diferentes, viajei e fui feliz.

Finalmente não existem palavras para descrever o quão agradecida que estou com o Brasil, por me dar a oportunidade de vir, me acolher e me dar uma bolsa que tristemente na Colômbia não é possível ter. São um exemplo para América Latina inteira. MUCHO OBRIGADA BRASIL!

**ESSE TRABALHO FOI REALIZADO COM
FINANÇAMENTO DA FUNDAÇÃO DE AMPARO À
PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP)**

ÍNDICE DE TABELAS

Figura 1: Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> spp.....	4
Figura 2: Estrutura molecular da violaceína.....	14
Figura 3: Atividade antimalárica das drogas convencionais contra formas sanguíneas de <i>P. falciparum</i> 3D7.....	31
Figura 4: Toxicidade da vJl.	33
Figura 5: Atividade antimalárica da vJl.	34
Figura 6: Toxicidade da vCv.	36
Figura 7: Atividade antimalárica da vCv..	37
Figura 8: Atividade da vCv em camundongos infectados com <i>P. chabaudi chabaudi</i> AS-30CQ.....	39
Figura 9: Parasitemia no dia 8 da infecção por <i>P. chabaudi chabaudi</i> AS-30CQ.....	41
Figura 10: Comparação entre os dias pico das parasitemias.....	42
Figura 11: Atividade da vCv em camundongos infectados com <i>P. chabaudi chabaudi</i> AS-ATNMF1	43
Figura 12: Parasitemia no dia 8 da infecção por <i>P. chabaudi chabaudi</i> AS-ATNMF1.	44
Figura 13: Parasitemia nos dias pico por <i>P. chabaudi chabaudi</i> AS-ATNMF1.....	45
Figura 14: Área embaixo da curva	46
Figura 15: Concentração de <i>P. vivax</i> com Percoll®.	49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Antimaláricos e sua família química.	7
Tabela 2: IC ₅₀ da vCv, CQ e ATN em isolados de campo de <i>P. falciparum</i>	38
Tabela 3: Parasitemia após 40h de cultivo <i>ex vivo</i> de <i>P. vivax</i> na presença ou não de vCv.	48

1. INTRODUÇÃO

1.1. MALÁRIA: AGENTE ETIOLÓGICO E VETOR

A malária é a doença parasitária mais importante no mundo, causadora de mortalidade e morbidade em países localizados em regiões tropicais e subtropicais, e continua sendo um grande desafio em saúde pública em todo planeta (1). Os parasitas que causam a malária pertencem ao filo Apicomplexa, ordem Coccidia, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*. Atualmente são conhecidas cerca de 100 espécies de parasitas pertencentes a este gênero que infectam diversos vertebrados, entre aves, répteis, peixes e mamíferos. Somente cinco espécies são capazes de infectar o homem e esta alta especificidade entre hospedeiro e parasita indica uma longa associação entre estas espécies e uma possível coevolução (1).

As espécies capazes de infectar o homem são *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi*. *P. falciparum* é a espécie responsável pelo maior número de mortes por malária e é encontrada predominantemente na África (1). *P. vivax* apesar de não ser tão letal quanto *P. falciparum*, é a espécie de distribuição geográfica mais ampla, causando elevada morbidade (2). *P. ovale* e *P. malariae* causam um número mais reduzido de infecções (3, 4), enquanto *P. knowlesi* é considerado uma zoonose pois sua transmissão ocorre predominantemente em primatas não humanos, que acabam funcionando como um reservatório para infecções em humanos (5).

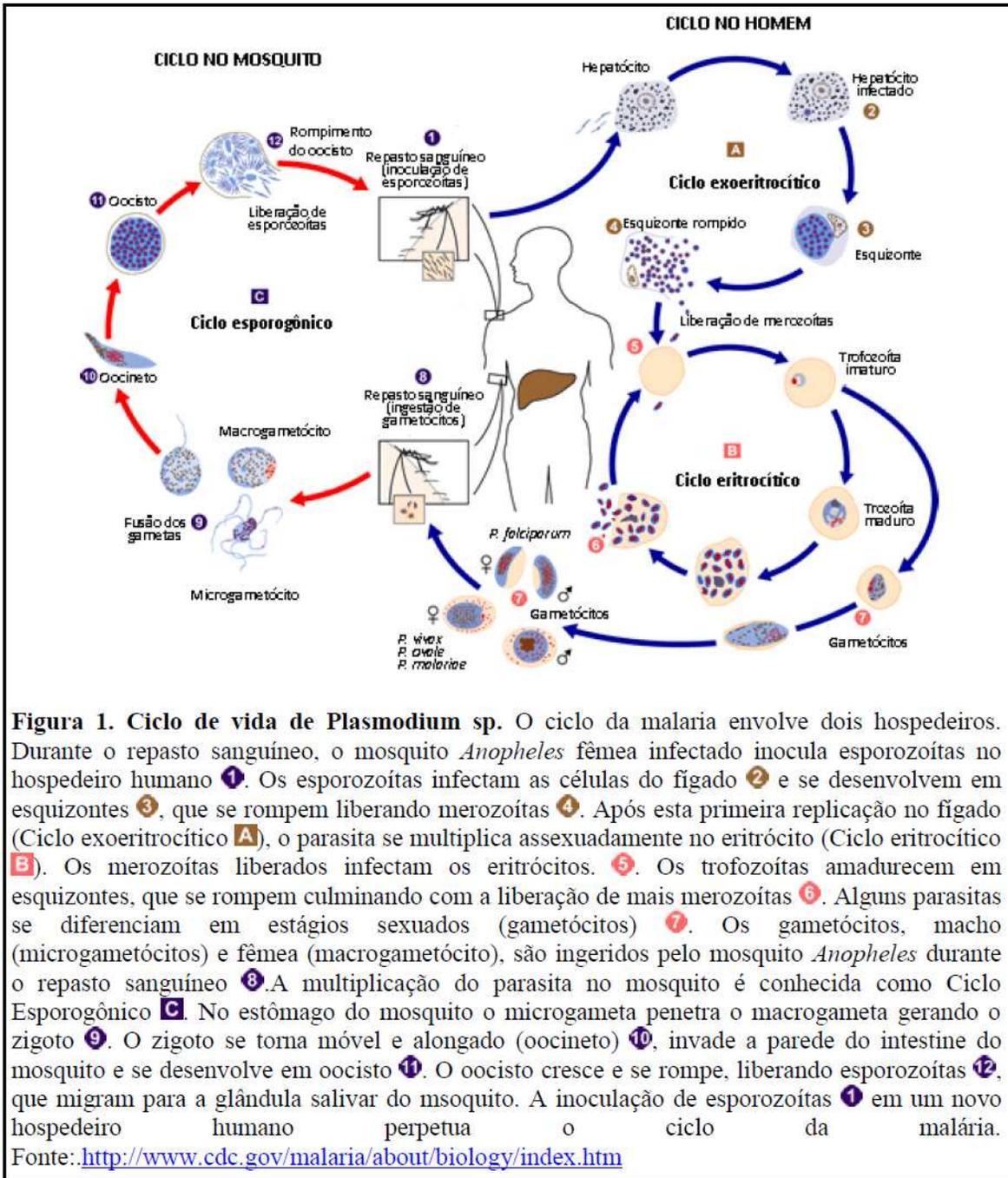
A transmissão da malária no homem acontece por meio da picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles*. Este gênero pertence a ordem Diptera, família Culicidae. Como todos os membros desta família, as fêmeas dos anofelinos necessitam de sangue para a maturação dos ovos, e portanto durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado

ingere o parasita em seu sangue. Depois de alguns dias ao picar um novo hospedeiro para se alimentar, este pode através de sua saliva inocular parasitas e portanto transmiti-lo a este novo hospedeiro(6).

Existem mais de 400 espécies de anofelinos, no entanto somente cerca de 60 foram descritas como vetores de malária. No Brasil a principal espécie transmissora é *An. darlingi*, no entanto outras espécies como *An. aquasalis* e *An. albitarsis* podem atuar como importantes vetores (7). Já na África o principal vetor é o *An. gambiae*.

1.2.CICLO DE VIDA DO *Plasmodium*

O ciclo de vida dos plasmódios que infectam o homem é bastante similar entre as espécies, e pode ser dividido basicamente em duas fases: o ciclo no hospedeiro vertebrado (homem) e o ciclo no hospedeiro invertebrado (anofelinos) (Figura 1). No hospedeiro vertebrado ocorre unicamente reprodução assexuada do parasita e portanto é chamado de hospedeiro intermediário, enquanto no hospedeiro invertebrado ocorre reprodução assexuada e sexuada e portanto este é o hospedeiro definitivo (6).



O ciclo no homem tem início com a picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* infectado, que ao fazer o repasto sanguíneo inocula juntamente com sua saliva esporozoítas. Estes esporozoítas que foram inoculados junto a saliva irão realizar movimentos circulares

chamado *glidding* e irão penetrar ativamente nos capilares sanguíneos e vasos linfáticos (8, 9). Aqueles que atingirem a corrente sanguínea, irão então alcançar o fígado e invadir os hepatócitos através da interação da proteína parasitária circunsporozoíta e do receptor da célula do hospedeiro heparan-sulfato (10, 11). Após a invasão, o parasita irá passar por uma divisão assexuada chamada esquizogonia hepática e através desta gerar várias células filhas idênticas, chamadas merozoítas. A esquizogonia hepática pode durar de 6 a 15 dias dependendo da espécie de *Plasmodium*. Após esta divisão, as células filhas serão liberadas nos capilares sanguíneos hepáticos em vesículas denominadas merossomas (12). Nas espécies *P. vivax* e *P. ovale*, formam-se também nos hepatócitos formas quiescentes do parasita chamadas hipnozoítas. Estes hipnozoítas são formas menores, metabolicamente pouco ativas e permanecem latentes por dias até meses e quem sabe anos. Quando estas formas são reativadas, por fatores ainda não elucidados, se multiplicam reiniciando o ciclo e são responsáveis pelas chamadas recaídas da infecção.

Quando os merossomas atingem a corrente sanguínea são liberados os merozoítas que então penetram nos eritrócitos, dando início ao ciclo intraeritrocítico. Nos eritrócitos, os merozoítas se localizam dentro de um vacúolo parasitóforo e passam por alguns estágios denominados anel ou trofozoíta jovem, trofozoíta maduro e esquizonte. Dentro do eritrócito são geradas várias células filhas idênticas (merozoítas) que são liberadas na corrente sanguínea após o rompimento do vacúolo parasitóforo e do eritrócito infectado. Esses merozoítas invadem novos eritrócitos e assim, se repete o ciclo eritrocítico. O ciclo no eritrócito se repete, aproximadamente, a cada 48 h nas espécies *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* e a cada 72h em *P. malariae*. Esse sincronismo é o que causa o cenário de febres intermitentes em infecções estabelecidas (13).

Alguns merozoítos diferenciam-se em formas sexuais masculinas e femininas (gametócitos), que são ingeridas pelo mosquito durante o repasto sanguíneo. No trato digestivo do mosquito, os gametócitos feminino e masculino se diferenciam em macrogameta e 8 microgametas, respectivamente. A fusão do macrogameta ao microgameta forma o zigoto, que se desenvolve em um oocineto. O zigoto é a única etapa diploide do ciclo parasita. Este penetra na parede do intestino do inseto formando os oocistos entre o epitélio intestinal e a lâmina basal. Então, muitos esporozoítos são formados assexuadamente dentro do oocisto, e são liberados ao amadurecer. Esses esporozoítos migram para a glândula salivar do mosquito, onde podem ser transmitidos para o hospedeiro intermediário durante o repasto sanguíneo, dando continuidade ao ciclo.

1.3. ANTIMALÁRICOS E RESISTÊNCIA

Diversos compostos pertencentes a diferentes famílias químicas já foram ou ainda são utilizados no tratamento da malária (Tabela 1). O tratamento da malária tem como objetivo impedir o desenvolvimento parasitário nas diferentes fases ciclo biológico do patógeno. Neste sentido, as drogas chamadas esquizonticidas sanguíneas atuam no estágio eritrocítico assexuado do *Plasmodium*, impedindo a esquizogonia eritrocítica, responsável pela manifestação dos sintomas da doença. A maioria dos medicamentos antimaláricos apresenta atividade contra as formas eritrocíticas do parasita. A cloroquina, o quinino e seus derivados, bem como os derivados da artemisinina são exemplos de fármacos dessa classe. Os gametocidas atuam contra as forma sexuadas do parasita, impedindo a transmissão (14). Existem também os medicamentos que atuam nas formas latentes

teciduais, os hipnozoitas, e são utilizados para evitar as recaídas propiciadas por esta forma, estes medicamentos são importantes por exemplo em infecciones por *P. vivax*. É importante mencionar que os fármacos antimaláricos podem atuar contra mais de um estágio do protozoário e serem efetivos contra uma espécie, mas ineficazes contra outras.

Tabela 1: Antimaláricos e sua família química. Adaptado de WHO. Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance 2000-2010.

Família química	Drogas
4-aminoquinolinas	Cloroquina, amodiaquina, piperaquina
Amino-alcoois	Quinino, quinidina, mefloquina, halofantrina, lumefantrina
Sulfonamidas e sulfonas	Sulfadoxina, sulfalena, dapsona
Biguanidas	Proguanil, cloroproguanil
Diamopirimidina	Pirimetamina
8-aminoquinolina	Primaquina
Lactonas sesquiterpênica	Artemisinina. Artemetér, artesunato, dihidroartemisinina
Naftoquinona	Atovaquona
Antibióticos	Azitromicina, clindamicina, doxiciclina, tetraciclina

O quinino foi o primeiro agente antimalárico utilizado (15). Ele é um alcaloide extraído da casca da *Cinchona*, uma planta nativa da América do Sul. Índios sul americanos já usavam a casca da *Cinchona* como um remédio tradicional para a malária. No entanto, somente em 1820 químicos franceses identificaram o quinino como o ingrediente ativo da casca da *Cinchona* no tratamento antimalárico (16). Até o século 19, o quinino foi o único antimalárico conhecido, mas após a Primeira Guerra Mundial, sua estrutura serviu de base para o desenvolvimento de fármacos que continham quinolinas sintéticas, tais como a

cloroquina (CQ), amodiaquina (AQ) e mefloquina (MQ) (17) que foram substituindo o quinino devido sua alta toxicidade e baixa eficácia em comparação com os sintéticos.

A CQ foi sintetizada pela primeira vez em 1934 (17) e, desde então, tem sido a droga antimalárica mais amplamente usada. Ela age exclusivamente nos estágios sanguíneos assexuados do parasita e parece interferir no processo de metabolização da hemoglobina pelo parasita (18). Historicamente, a CQ foi a droga de escolha para o tratamento de malária não-grave ou malária não complicada, sendo que em 1950 junto com a primaquina converteu-se no tratamento de escolha para infecções por *P. Vivax*, entretanto a resistência do parasita a este composto reduziu drasticamente sua utilidade em poucos anos (14) .

A resistência de *P. falciparum* à CQ, o antimalárico mais promissor do século XX, foi relatada pela primeira vez menos de vinte anos após a sua introdução, com os primeiros relatos de resistência originários da América do Sul, do leste da África e do sudeste asiático no final dos anos 1950 (19-21). Desde então, a propagação da resistência à CQ tem sido implacável, e, é encontrada na maioria dos países onde há infecções por *P. falciparum* com exceção de alguns países da América Central e Caribe (1). Enquanto a resistência em *P. vivax*, foi reportada em 1989, quase 40 anos depois do reportado em *P. falciparum*, isto pode se dever ao fato de que *P. vivax* desenvolve mais rapidamente gametócitos (1 a 3 dias) do que *P. falciparum* (12 a 15 dias), o que evita que as formas sexuadas de *vivax* entrem em contato com a droga.

A MQ, primariamente foi desenvolvida para ser utilizada como medicamento profilático pelos soldados americanos devido sua elevada meia vida (22). No entanto, posteriormente foi extensamente utilizada no tratamento de *P. falciparum* resistentes à CQ (23). Entretanto, nos anos 90, casos de resistência à MQ começaram a ser constatados na Tailândia, principalmente nas áreas de fronteira com o Camboja e o Vietnã (24).

A combinação Sulfadoxina – Pirimetamina (SP) foi inicialmente utilizada na Tailândia no final de 1960 como um tratamento de primeira linha de infecção por *P. falciparum*. Na década de 1970, tratamento com SP em monoterapia ou em combinação com outros antimaláricos foi amplamente introduzido em muitas regiões endêmicas do Sudeste Asiático e América do Sul, e posteriormente com algum atraso na África (25). Essa combinação de medicamentos interfere com a síntese do folato pelo parasita ao inibir a síntese de duas enzimas a diidrofolato redutase (DHFR) pela pirimetamina e a diidropteroato sintase (DHS) pela sulfadoxina (26). A resistência surgiu primeiro à pirimetamina, uma vez que esta droga era utilizada anteriormente como profilática, enquanto resistência à sulfadoxina surgiu alguns anos depois da pirimetamina.

A falha terapêutica no tratamento de *P. falciparum* resultante da resistência do parasita a todas as drogas antimaláricas, colocou a nova geração de drogas, chamada de terapias baseada em artemisinina (ACT) em primeiro plano dos programas de controle de malária (27).

Utilizada extensamente na Tradicional Medicina Chinesa como antimalárico (28), a descoberta da artemisinina foi rapidamente seguida de sua identificação química, como peróxido sesquiterpeno, e do desenvolvimento de métodos para a produção de seus derivados (artesanato, arteméter e dihidroartemisinina). Como antimalárico, os derivados de artemisinina apresentam a habilidade de rapidamente diminuir o número de formas sanguíneas, além de um amplo espectro de ação sendo eficaz contra formas extremamente jovens e também contra trofozoítos maduros, além de sua ação gametocida e sua baixa toxicidade (29, 30). No entanto, devido a uma curta meia-vida dos derivados de artemisinina (31) a monoterapia só é curativa quando administrada por 7 dias e a recrudescência é frequente (32), levando a uma mudança para o uso combinado de

derivados da artemisinina. O racional para ACTs é combinar uma droga de ação rápida sem resistência, um derivado de artemisinina (ART), com um medicamento associado com meia-vida longa, como a mefloquina, amodiaquina, piperaquina, pirimetamina / sulfadoxina ou lumefantrina, a fim de atingir rápida e eficazmente o *clearance* parasitário (33, 34). Contudo, já é observada resistência ao medicamento associado, e diminuição da eficácia de derivados ART (35).

Apesar de aparentemente menos adaptado ao desenvolvimento de estratégias de proteção a antimaláricos, resistência à CQ tem sido também observada para *P. vivax* desde 1989 na Papua Nova Guiné (36). Estudos posteriores avaliando os índices de resistência à cloroquina em *P. vivax* mostram claramente que a Indonésia Oriental apresenta o problema da resistência mais avançado, com somente 50% de sucesso terapêutico em média (37-41). Pesquisas na América do Sul mostraram evidências que vão desde ausência até um baixo nível de resistência (5%) (42, 43). No entanto, um recente estudo realizado na cidade de Manaus (Amazonas) com 109 pacientes mostrou 10% de falha terapêutica, mesmo tendo estes pacientes níveis adequados de cloroquina no plasma no momento da parasitemia recorrente (44). Atualmente, alguns países já adotaram o uso de ACTs no tratamento de *P. vivax* como Indonésia e Papua Nova Guiné (45). No Brasil, o tratamento de escolha em infecções por *P. vivax* se dá através da combinação cloroquina-primaquina, mas em alguns casos graves e onde a cloroquina se mostre ineficiente o tratamento pode ser efetuado com ACTs (46).

A resistência de *Plasmodium* spp. às drogas parece ocorrer por meio da seleção de mutações. O desenvolvimento de resistência pode ser uma ocorrência rara; uma mutação espontânea pode ocorrer apenas uma vez em vários milhões de parasitas. No entanto, uma vez que tenha ocorrido, podem ser selecionadas e disseminadas.

Em 1989 foi sugerido que a resistência à cloroquina em *P. falciparum* poderia ser conferida pelo gene *Pfmdr1*, que é um gene similar ao *multi drug resistant gene* de mamíferos. A MDR1, que é uma glicoproteína que pertence à superfamília das ATP-binding Cassette (ABC) (47), tem sido muito estudada porque é a responsável pelo efluxo de drogas que se acumulam no interior celular e desta forma tem sido associada à resistência de células tumorais, por exemplo, a diferentes quimioterápicos.

Entretanto, estudos posteriores mostraram que o gene *Pfmdr1* nem sempre estava presente em isolados resistentes (48, 49) e que parasitas que adquiriram o gene não se tornavam resistentes à cloroquina (50). Dessa forma então questionou-se a relação entre *Pfmdr1* e a resistência à cloroquina.

Outro gene envolvido na resistência à cloroquina é o gene *pfcr1* que codifica para uma proteína transmembrana dos vacúolos digestivos de *P. falciparum*. Neste gene mutações pontuais foram associadas à resistência *in vitro* de *P. falciparum*; especialmente a substituição da treonina por lisina na posição 76 (K76T), que estava presente em todos os isolados resistentes e ausente em todos os isolados sensíveis. Além disso, a transformação genética com plasmídeos contendo formas mutantes do *pfcr1* conferiram resistência à cloroquina em clones de *P. falciparum* que antes eram sensíveis a droga demonstrando assim uma forte ligação entre a mutação do *pfcr1* T76 e o fenótipo de resistência à cloroquina *in vitro* (51).

Atualmente sabe-se que o gene *pfmdr1* apesar de não ser essencial para a resistência à cloroquina, modula os níveis de resistência a este e tem um papel importante na resistência a drogas estruturalmente similares ao quinino (52). Recentes estudos tem mostrado que em isolados de *P. falciparum* resistentes à cloroquina ou mefloquina o *pfmdr1* tem aumentado o

número de cópias, o que confere também uma vantagem seletiva quando o parasita é exposto a derivados do artesunato (53-55).

Pouco se conhece sobre a resistência em *P. vivax* devido à falta de métodos de cultivo no laboratório, mas em 2004 foi identificado o *pvmdr1*, gene ortólogo do *pfmdr1* que também confere resistência a múltiplas drogas em *P. vivax* (56). Também em experimentos *ex vivo* com sangue de pacientes infectados por *P. vivax* em Papua Nova Guiné demonstrou-se uma correlação entre a resistência à CQ e polimorfismos de *pvmdr1*(57), mas como a resistência à CQ também acontece em isolados com o gene selvagem de *pvmdr1* (58), só pode-se concluir que as mutações neste gene provavelmente são só determinantes menores da resistência à CQ.

Sendo assim, diante da resistência de *Plasmodium* spp. a maioria dos antimaláricos disponíveis e a iminência da resistência deste parasita aos derivados de artemisinina, a descoberta e desenvolvimento de novas entidades químicas eficazes no combate às espécies de *Plasmodium* e/ou que possam superar os mecanismos de resistência às drogas antimaláricas usadas atualmente são extremamente necessárias.

1.4. MODELOS MURINOS RESISTENTES A ANTIMALÁRICOS

Existem muitas razões para utilizar modelos murinos para estudar a malária humana, o mais importante deles é que o ciclo de vida do camundongo pode ser monitorado no laboratório e sua reprodução é simples e rápida. Além disso, a similaridade na biologia básica de *Plasmodium* humano e murino é muito grande, pois compartilham a mesma organização genética, os mesmos genes de manutenção e os mesmos processos

bioquímicos; este último é importante quando se quer comparar a sensibilidade ou resistência a diferentes drogas (59, 60).

Os estudos com *P. falciparum* podem dar informação mais consistente quando são pesquisadas as vias que implicam resistência a antimaláricos e os genes que estão envolvidos nessa resistência (61), mas as limitações éticas, o alto custo de manter primatas não humanos e a facilidade para selecionar clones resistentes a múltiplas drogas, faz com que o modelo murino tenha sido bem aceito para fazer comparações com a malária humana. Outra grande vantagem de trabalhar com modelo murino é a facilidade para estudar todos os ciclos do parasita: o ciclo sexual no mosquito, o ciclo hepático e o ciclo eritrocítico no camundongo, além dos aspectos imunológicos da malária (62).

O modelo murino mais utilizado para estudar resistência a drogas é *P. chabaudi*, pois é o parasita que apresenta maior similaridade a *P. falciparum*, pois preferencialmente invade eritrócitos maduros e a esquizogonia é sincrônica (62, 63). Sendo assim, recentemente foram desenvolvidas elegantemente diversas cepas de *P. chabaudi* (3CQ, 30CQ e ATNMF1, entre outras) que são resistentes em diferentes graus à cloroquina ou ao artesunato e mefloquina.

O parasita 3CQ desenvolvido em 1976 (64) deu origem em 1981 ao clone 30CQ após ter sido submetido a tratamentos de 30 mg de cloroquina durante 6 dias, e posterior repasse pelo mosquito *An. stephensi* (65), finalmente a progênie foi clonada por diluição. Este parasita tem sido utilizado em muitos trabalhos posteriores para originar parasitas com diferentes graus de resistência a artesunato, mefloquina e pirimetamina (62, 66).

Da mesma maneira que foi selecionado o clone 30CQ, selecionou-se a partir do 3CQ exposto a diferentes concentrações de artesunato e mefloquina, e posterior repasse pelo mosquito *An. Stephensi* o clone ATNMF1, que é resistente a 40mg e 3mg por quilo por 3 dias de artesunato e mefloquina, respectivamente (54).

Assim como os clones anteriores, tem sido desenvolvida uma grande variedade de clones de *P. chabaudi* devido à uma relativa facilidade de se monitorar e selecionar mutações estáveis que conferem resistência a antimaláricos.

1.5. VIOLACEÍNA

A violaceína (Figura 2) é o principal pigmento violeta produzido por diferentes tipos de bactérias, como *Chromobacterium violaceum*, *Jantynobacterium lividum* ou *Alteromonas luteoviolacea*. A primeira descrição documentada sobre a bactéria e seu pigmento foi feita pelo italiano Curzio Bergonzini em 1881, porém a fórmula química e a estrutura exata da violaceína só foram determinadas entre 1958-1960 (67). A violaceína é um derivado indólico caracterizado como 3(1,2- dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona.

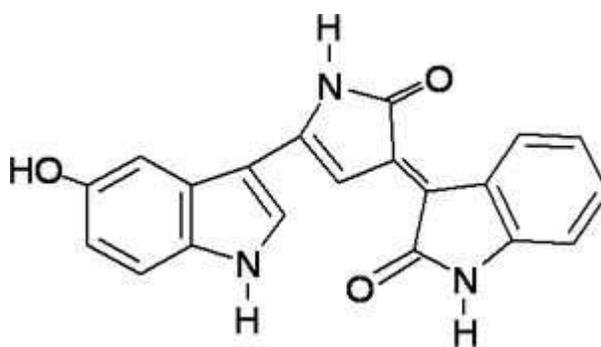


Figura 2: Estrutura molecular da violaceína.

Chromobacterium violaceum é uma bactéria Gram-negativa pertencente à família Neisseriaceae e à classe das β -proteobactérias, é anaeróbia facultativa em forma de bastonetes (68). Trata-se de uma bactéria saprófita amplamente distribuída, podendo ser encontrada em águas e solos de regiões tropicais e subtropicais do Brasil onde constitui um componente minoritário da microbiota total. Seu genoma foi sequenciado por um Consórcio Brasileiro em 2003, e revelou diversas vias alternativas para a geração de energia, complexos e extensivos sistemas de adaptação ao estresse, amplo uso de *quorum sensing* a fim de aumentar a versatilidade e adaptabilidade do organismo (69).

A partir do estabelecimento da cepa CCT 3496 da *C. violaceum*, isolada de Rio Negro-Brasil, a produção, extração e purificação do pigmento foram otimizadas e estudos de sua biossíntese, bem como reações de biotransformação foram realizadas (70-73).

Diversos trabalhos atribuíram à violaceína diferentes atividades biológicas tais como bacteriostática (74, 75), antiviral (76, 77), antioxidante (70), antimicobacteriana (78), fungicida (79, 80), antiulcerogênica (81), antitumoral (82-85) e também contra protozoários patogênicos (68, 86-88).

Seu potencial antibiótico foi sugerido ao notar-se que nas lesões na pele causadas por essa bactéria, nenhum outro organismo contaminante era encontrado. Um estudo com 51 linhagens de bactérias, totalizando 21 espécies, mostrou que a violaceína apresenta um notável efeito inibitório no crescimento de bactérias Gram positivas, e menor efeito em Gram negativas (74). Posteriormente foi demonstrada atividade antibacteriana *in vitro* em ambos os grupos (75).

Diversos trabalhos mostraram o potencial citotóxico da violaceína (89). Em ensaios de citotoxicidade utilizando fibroblastos V79 de pulmão de hamster chinês, a violaceína demonstrou um potencial citotóxico com valores de IC_{50} de 5-12 μ M e essa citotoxicidade

deve-se a apoptose e não necrose (82, 88, 90). A citotoxicidade da violaceína também foi avaliada em linfócitos humanos normais e o ensaio de MTT mostrou $IC_{50} > 10 \mu M$. Apesar dessa toxicidade a linfócitos normais, a violaceína foi capaz de inibir o crescimento de células leucêmicas em concentrações bem abaixo ($IC_{50} < 1 \mu M$) da encontrada para linfócitos normais (91). Entretanto, em algumas linhagens celulares, como FRhK-4 (células embrionárias de rim de macaco *Rhesus*) e Vero (células epiteliais de rim de macaco), concentrações baixas de violaceína ($IC_{50} < 1,5 \mu M$) foram capazes de provocar danos no DNA (77).

A maioria dos estudos de atividade biológica da violaceína tem foco na sua atividade antitumoral e sua habilidade de induzir apoptose nessas células, assim como as vias moleculares para atingir esse efeito. Nesse sentido, o primeiro trabalho demonstrando a atividade antitumoral da violaceína utilizou um painel de células tumorais provenientes do NCI (*National Cancer Institute*) e obteve boas taxas de inibição do crescimento das células nas linhagens MOLT-4 (células leucêmicas), NCI-H460 (células de câncer de pulmão) e KM12 (células de câncer de cólon) (90). Com base nesses resultados, diversos trabalhos vêm investigando não só a atividade citotóxica da violaceína em diferentes linhagens tumorais (como células de câncer de cólon Caco-2, DLD-1, SW480 e HCT116; células leucêmicas HL60; Tumor ascítico de *Ehrlich*; fibrosarcoma 2237; células de melanoma B16F10, 92.1 e OCM-1), mas também buscando o mecanismo de ação nessas diferentes linhagens (84, 85, 92-94).

A fim de melhor investigar o mecanismo envolvido na citotoxicidade da violaceína em células leucêmicas, estudo conduzido em células de leucemia mielóide humana (HL60) demonstrou que o composto é capaz de mediar a apoptose via ativação específica do receptor do fator de necrose tumoral 1 (TNFR1), e que sua citotoxicidade é precedida pela

ativação da caspase-8, da transcrição de NFκB (fator nuclear κB) e da ativação da p38 MAP quinase (92). Além dos estudos em células leucêmicas, o mecanismo de ação da violaceína também foi investigado em linhagens de células de câncer de cólon (84, 85). Neste sentido, (84) demonstraram que o estresse oxidativo induzido pela violaceína é um dos mediadores dos níveis de apoptose em células Caco-2 do cólon intestinal. Entretanto, a violaceína foi incapaz de aumentar os níveis de EROs (Espécies reativas de oxigênio) em outra linhagem de câncer de cólon (HT29), sugerindo a existência de mecanismos célula-específico do composto (84).

Nas células HCT116, o tratamento com a violaceína causou bloqueio no ciclo celular em G1, devido ao aumento nos níveis das proteínas p27 e p21, diminuição nos níveis da ciclina D1 e bloqueio da fosforilação da proteína Rb (Retinoblastoma). Além disso, a violaceína levou à inibição de Akt (proteína quinase B) com subsequente ativação da via apoptótica (caspases) e inibição da sinalização por NF-κB (85). O papel das caspases na apoptose mediada pela violaceína também foi demonstrado no carcinoma murino renal (RENCA) (94) e no tumor de *Ehrlich* (94). Além da habilidade da violaceína em inibir o crescimento do tumor de *Ehrlich in vitro*, seu potencial também foi avaliado *in vivo*. Os estudos *in vivo* mostraram que tratamentos com 0.1 e 1 mg/kg diários por via i.p. foram capazes de reduzir o tamanho do tumor nos animais e mais aumentou a sobrevida nesses animais (93, 94), sendo esse o primeiro trabalho a mostrar a atividade antitumoral *in vivo* da violaceína.

Efeitos moderados da violaceína também foram observados contra protozoários patogênicos. Em ensaios para medir sua atividade contra *Trypanosoma cruzi* a violaceína apresentou ação similar ao *Nifurtimox*, um importante quimioterápico utilizado no tratamento da doença de Chagas (68, 87). No entanto, seu potencial quimioterápico *in vivo*

foi extremamente baixo (88). Além de atividade tripanossomicida, estudos demonstraram que a violaceína também apresenta atividade contra promastigotas de *Leishmania amazonensis*, apesar de apresentar-se dez vezes menos ativa que a pentamidina, uma das drogas mais utilizadas no tratamento de leishmanioses (86). Além disto, não foi avaliado o potencial deste composto na célula hospedeira (macrófagos) alvo do parasita, e nem nos modelos murinos das leishmanioses (86).

Pelo fato da violaceína apresentar baixa solubilidade em água, deve ser solubilizada em DMSO o que aumenta a citotoxicidade. De tal modo, tem sido sintetizados derivados da violaceína com grupos glicosídicos e também tenta-se a sua biotransformação por enzimas oxidativas que permitam maior solubilidade e aumento da atividade biológica (71). Em trabalhos anteriores também descrevem que a atividade da violaceína é potencializada pela complexação com β -ciclodextrina quando usada em tratamentos de úlcera gástrica em camundongos (81).

Um dos objetivos da terapia utilizando nano-partículas biocompatíveis é aumentar a taxa de entrega do composto, com menores efeitos adversos, e nesse marco conceitual, a violaceína foi encapsulada em microesferas de PCL (poli- ϵ -caprolactona) (89) e em PLGA (copolímero de ácido láctico e glicólico) (90) e foi testada em diferentes linhagens tumorais, encontrando-se que por exemplo em células HL60 (Human Leukemia) a violaceína foi liberada em tempos controlados e reduziu a citotoxicidade quando comparada com a violaceína livre (82). Recentemente, nosso grupo comprovou a atividade antimalárica da violaceína *in vitro* contra *P. falciparum* 3D7 e S20; e *in vivo* contra *P. chabaudi chabaudi* (95). Este foi o primeiro trabalho a demonstrar atividade *in vivo* da violaceína e também sua atividade antimalárica. No entanto, neste trabalho não foi abordada sua atividade contra cepas de parasitas resistentes.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar o potencial antimalárico da violaceína em isolados amazônicos de *P. falciparum* e *P. vivax*, além da sua atividade em camundongos infectados com clones de *P. chabaudi* AS resistentes a diferentes antimaláricos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1. Análise do efeito antimalárico da violaceína *in vitro* em isolados brasileiros de *P. falciparum* adaptados recentemente à cultura
- 2.2.2. Análise do efeito antimalárico da violaceína *ex vivo* no sangue de pacientes infectados com *P. vivax*
- 2.2.3. Análise do efeito antimalárico da violaceína sozinha e combinada com artesunato em camundongos infectados com clones de *P. chabaudi* AS (30CQ e ATNMF1) resistentes a antimaláricos

3. METODOLOGIA

3.1.. VIOLACEÍNA

Foram testados dois tipos de violaceína, uma extraída de *Janthinobacterium lividum* (vJl) fornecida pela Sigma-Aldrich (V9389-1MG), e uma violaceína extraída de *Chromobacterium violaceum* (CCT3496) (vCv); a segunda foi extraída por meio da técnica descrita anteriormente (70) pelo grupo do Prof. Dr. Nelson Duran (Instituto de Química, Unicamp) e cedida gentilmente pelo laboratório do Prof. Dr. Marcelo Brocchi (Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Unicamp).

3.2.. CULTURA DE FORMAS SANGUÍNEAS DE *P. falciparum*

P. falciparum 3D7 e sete isolados recentes da Amazônia brasileira foram cultivados através do método de *candle jar* em meio RPMI completo (RPMI 1640, Sigma, USA), suplementado com 10% de plasma humano de complementado. O hematócrito final foi ajustado a 4% com eritrócitos sadios O⁺ fornecidos pelo banco de sangue da UNICAMP. Os isolados 99 e 134 utilizados foram coletados em Porto Velho, Rondônia, entre os anos de 2003 e 2004 e foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Gerhard Wunderlich (Departamento de Parasitologia, USP). Os demais isolados foram coletados entre 2008 e 2009 em um raio de cerca de 50 km em torno do Ramal do Granada, em áreas adjacentes pertencentes aos municípios de Plácido de Castro (Acre) e Lábrea (Amazonas) pelo grupo do Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira (Departamento de Parasitologia, USP).

3.3. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

3.3.1. Ensaio de toxicidade em eritrócitos não infectados

A toxicidade das violaceínas foi determinada em eritrócitos não infectados (niE) nas concentrações de 12.800; 3.200; 800; 200; 50 e 12,5 nM de cada composto. Incubou-se os eritrócitos na presença ou não das drogas em meio RPMI a 37 ° C e após 48 horas de incubação determinou-se a densidade de células com ajuda do espectrofotômetro de placas (A590) (Asys-Expertplus, UK) (96). A porcentagem de toxicidade em niE, foi calculada comparando-se a absorbância nos poços com violaceína *versus* a absorbância no grupo controle (0,25% DMSO).

3.3.2. Ensaio de citotoxicidade em células HepG2, CHO 745 e MCF-7

A citotoxicidade dos compostos utilizados foi avaliada através do ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio] para medir a redução metabólica do brometo nas enzimas mitocondriais de três linhagens celulares: HepG2 (células de hepatocarcinoma humano), CHO 745 (células epiteliais de ovário de hamster chinês) e MCF7 (células de câncer de mama humano).

As células foram cultivadas em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C, em meio RPMI com gentamicina (40 mg/L), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor. As células foram colocadas em placas de 96 poços numa densidade de 2x10⁴ células por poço e incubadas nas concentrações de 1.600; 800; 400; 200 e 100 nM de violaceína. Após 48 horas, foram adicionados 15 µL por poço de uma solução de MTT (5

mg/mL). Após 4 horas de incubação, a placa foi centrifugada a 1.500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, o pellet foi lavado com PBS e ressuspendido em 50 µL de isopropanol.

A quantidade de formazan (de cor violáceo) produzida é proporcional à quantidade de células vivas. A leitura da absorbância (A590) das células com meio contendo 0,25% DMSO (controle) e das células na presença das diferentes concentrações de violaceína (testes) foi feita utilizando um espectrofotômetro de placas (Asys-Expertplus, UK). Importante, como a violaceína é um composto violáceo, para evitar a interferência desta coloração foi subtraída da densidade óptica dos poços testes, a densidade óptica da violaceína na mesma concentração e volume, no entanto na ausência das células. Os resultados da leitura foram calculados como a porcentagem da inibição usando a seguinte fórmula: % de inibição = $[1 - (At/Ac)] \times 100$. At e Ac fazem referência à absorbância do teste e a absorbância do controle respectivamente.

3.4.ATIVIDADE ANTIMALÁRICA EM *P. falciparum*

A atividade antimalárica das drogas foi determinada como descrito anteriormente (97), sendo que o crescimento parasitário foi medido através da incorporação da [³H] Hipoxantina (GE; Healthcare), essencial na replicação parasitária. Os ensaios foram feitos em placas de cultura de 96 poços com o volume final de 200 µL sendo 100 µL de meio RPMI completo com diferentes concentrações da droga testada ou sem droga (controle) e 100 µL de suspensão de eritrócitos infectados por *P. falciparum* (1% hematócrito final e 1% parasitemia) em meio completo suplementado com 20% de plasma humano A⁺ e 0,05

de μCi H^3 hipoxantina/ml. Como a violaceína está dissolvida em DMSO, na concentração máxima de 0,25%, essa quantidade de DMSO (Sigma, USA) foi adicionada ao meio completo nos respectivos controles. No caso dos ensaios com as outras drogas, não foi utilizado DMSO para diluí-las, portanto nos poços controle foi adicionado somente meio completo. Após 40 horas de incubação em *candle jar*, as placas foram congeladas e descongeladas para a lises dos eritrócitos e expor o parasita. A leitura da radioatividade foi feita utilizando-se Microcintilador Beta 1450 (Perkin Elmer).

Também se incubaram eritrócitos sadios nas mesmas condições anteriores e a radioatividade foi determinada e utilizada como branco. Cada concentração da droga foi testada em quadruplicata. O crescimento parasitário foi comparado com o controle (ausência de droga), representando 100% de crescimento parasitário. A inibição do crescimento parasitário foi calculada de acordo com a fórmula: % Inibição = $100 - [(CPM \text{ amostra} - CPM \text{ Eritrócitos sadios} / CPM \text{ Controle} - CPM \text{ Eritrócitos sadios}) \times 100]$. A IC_{50} foi calculada através de um gráfico do Log da dose *versus* inibição (expresso em porcentagem em relação ao controle).

3.5.ATIVIDADE ANTIMALÁRICA EM *Plasmodium vivax*

Uma vez que não existe o cultivo a longo prazo de *P. vivax*, para a realização dos ensaios de determinação da atividade da violaceína neste parasita, foi necessário o deslocamento até área endêmica de malária e coleta de sangue de pacientes com malária *vivax*. O recrutamento e coleta de sangue foram realizados na Fundação de Medicina

Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FTM) na cidade de Manaus, estado do Amazonas, unidade de saúde referência no diagnóstico e tratamento de pacientes com malária da região.

Os pacientes que obedeceram aos critérios de inclusão foram convidados a participar do estudo e aqueles que aceitaram participar assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e então foi realizada a coleta de 10 ml de sangue por punção venosa em tubos de citrato de sódio. Foi coletado sangue de sete pacientes, dos quais só foram utilizados cinco no estudo, pois apresentavam a maioria dos parasitas no estágio de trofozoíta jovem.

Imediatamente após a coleta de sangue do paciente foi feito um hemograma e separado o soro e plasma dos componentes celular. As células foram, então, ressuspensas em PBS (50% hematócrito) e a suspensão foi passada por duas colunas de celulose CF11 (seringa de 10 ml com 1 cm³ de lã de vidro e 5 cm³ de celulose CF11) sucessivamente para a remoção de leucócitos (98). O obtido da coluna foi então lavado uma vez em meio e o *pellet* ressuspenso em meio McCoy 5A contendo 2,4g de D-glicose e 20% de Soro AB (hematócrito 2%). Esta suspensão de eritrócitos infectados (hematócrito 2%) foi incubada a 37°C em *candle jar* na presença ou não de diferentes concentrações da violaceína (8,0; 4,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,67 µM). No tempo 0, foi feito um esfregaço do poço sem droga para controle. A incubação seguiu até que pelo menos 50% dos parasitas amadurecessem em esquizontes (99). Para acompanhar a maturação, lâminas dos poços sem droga foram feitas após 24 e 32 horas e posteriormente em intervalos menores de 1 a 4h.

Ao término da incubação, foram feitos esfregaços de todos os poços que foram corados com Giemsa 5% em PBS. A parasitemia foi determinada através da contagem do n° de esquizontes nessas lâminas.

3.6. ANÁLISE DA ATIVIDADE *in vivo* EM PARASITAS MURINOS RESISTENTES

A atividade antimalárica da violaceína foi também avaliada *in vivo* em camundongos infectados com clones de *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS resistentes à cloroquina e a artesunato/mefloquina (100) que foram fornecidos pelo Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais/IHMT/UNL (Lisboa, Portugal) liderado pelo prof. Dr. Pedro Cravo. No primeiro ensaio os camundongos foram infectados com 10^6 parasitas de *P. chabaudi chabaudi* AS-30CQ (resistente a 30 mg de cloroquina por quilo durante 6 dias) e foram divididos em três grupos (n=6); o não tratado que foi inoculado com DMSO 3,5% em PBS, o grupo controle que foi tratado com 30mg de cloroquina por quilo durante 6 dias, um grupo tratado com 1mg/kg de violaceína por 10 dias. A dose de violaceína utilizada e o tempo de tratamento foi escolhido baseado em testes realizados por Lopes, S (95) com concentrações de 0,75 mg, 3,75 mg e 7,5 mg/kg durante 4 dias, encontrando que a menor dose não tinha atividade e a maior era letal para o animal. Finalmente foram feitos testes com doses intermediárias em concentrações de 0,8 mg, 1 mg e 4 mg/kg durante 4 dias monitorando o peso do animal, decidindo então utilizar a dose de 1mg/kg.

No segundo experimento, os camundongos foram infectados com 10^6 parasitas de *P. chabaudi chabaudi* AS-ATNMF1 (resistente a 40mg/kg/dia de artesunato e 3mg/kg/dia de mefloquina por 3 dias) e foi dividido em quatro grupos (n=7), um grupo não tratado que foi inoculado com PBS e DMSO, o grupo controle que foi tratado com 40mg/kg de artesunato durante 3 dias, um grupo tratado com 1mg/kg durante 10 dias com violaceína e um grupo tratado com 40mg/kg de Artesunato durante 3 dias e 1mg/kg de violaceína durante 10 dias.

Todos os tratamentos começaram no mesmo dia da inoculação (dia 0) e foram administrados intraperitonealmente, colocando 200 µl da solução das drogas em cada animal no mesmo horário e a parasitemia foi monitorada por esfregaços sanguíneos diários e por citometria de fluxo através da marcação dos eritrócitos infectados com Draq5 (0,08µL/3µL de sangue e 400 µL de staining buffer) ou DHE (1uL/1uL de sangue em 500 µL de Staining buffer).

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi feita com o auxílio do programa Graphpad Prism 6V. Foi utilizado ANOVA de uma via e o *post-test* de Tukey para comparação entre os grupos controle e tratado quanto a parasitemia, inibição de parasitemia *in vitro* e *in vivo*, densidade de glóbulos vermelhos e testes de toxicidade. Para o cálculo do IC₅₀ foi feita uma curva de regressão não linear com os dados das concentrações expressos em escala logarítmica. Com os dados *in vivo*, foi feito um gráfico de evolução temporal da parasitemia e a comparação do dia pico da parasitemia no controle (dia 8) *versus* os diferentes tratamentos com o teste Kruskal-Wallis e *post-test* de comparação de Dunns entre as colunas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. IC₅₀ DAS DROGAS ANTIMALÁRICAS CONVENCIONAIS

A atividade das drogas comumente utilizadas como antimaláricas (cloroquina, artesunato e mefloquina) foram avaliadas para a determinação da IC₅₀. A atividade da cloroquina na cepa de laboratório *P. falciparum* 3D7 foi avaliada para ser utilizada como um controle da reprodutibilidade dos ensaios. Como pode ser verificado na Figura 3A, o IC₅₀ da cloroquina foi de $53,8 \pm 12,4$ nM e nos três ensaios efetuados a curva foi bastante similar. Para o artesunato a IC₅₀ obtida foi de $3,4 \pm 0,3$ nM (Figura 3B) e para a mefloquina de $8,6 \pm 14,6$ nM (Figura 3C).

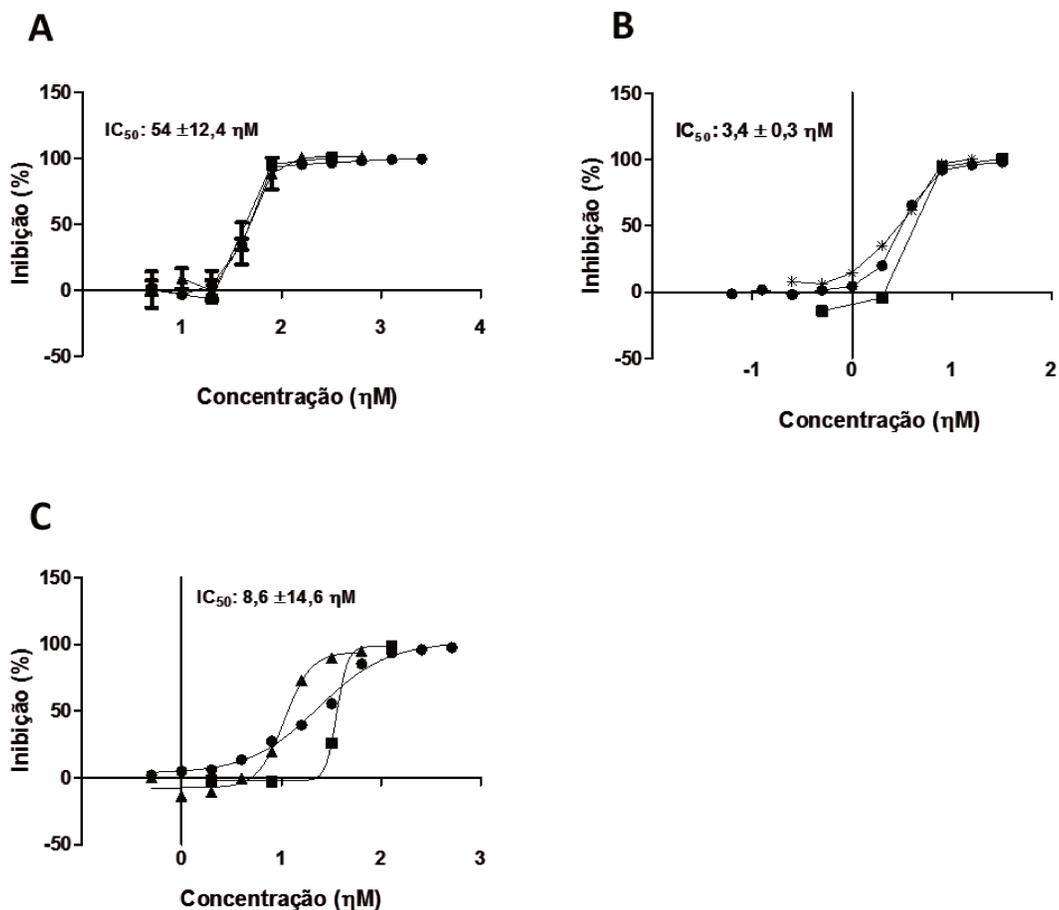


Figura 3: Atividade antimalárica das drogas convencionais contra formas sanguíneas de *P. falciparum* 3D7. Gráfico log da concentração de cloroquina (A), artesunato (B) e mefloquina (C) versus inibição do crescimento parasitário (%). Cada linha representa um ensaio realizado em quadruplicata.

No caso da cloroquina, o IC₅₀ reportado na literatura para 3D7 variam desde 8,3 nM até 74,87 nM (101, 102) e para o artesunato variou entre ~1 nM e 9,44 nM (86, 103). Essas variações encontradas na literatura provavelmente ocorrem devido a variações genéticas do parasita após ter sido mantido em cultura por mais de 30 anos ou diferenças nos lotes e marcas (por pureza) da cloroquina utilizada, estas diferenças nos valores reportados fazem com que seja importante fazer testes com as drogas utilizadas no nosso laboratório para fins

de ter um controle experimental. Desta forma os valores aqui encontrados estão entre àqueles reportados na literatura.

4.2.VIOLACEÍNA *Jantibacterium lividum* (vJI)

4.2.1. Toxicidade

Foi relatado previamente que a violaceína apresenta toxicidade a algumas variedades de células tumorais e não tumorais (74, 76, 84). Para verificar se a violaceína apresentava toxicidade a célula hospedeira do parasita (eritrócitos) e também o grau de toxicidade às células tumorais (HepG2) e não tumorais (CHO 745), foram conduzidos ensaios de toxicidade em eritrócitos não infectados (niE) através de ensaios de lise celular e testes de MTT em células HepG2 e CHO 745.

Como se observa na Figura 4A, a vJI mostrou-se significativamente tóxica ($p < 0,05$) aos niE em doses relativamente baixas (800 nM). O mesmo foi encontrado nos ensaios de MTT nas linhagens celulares tumorais (HepG2, tóxica em 400 nM) e não tumorais (CHO 745, tóxica em 400 nM) (Figura 4B e 4C, respectivamente).

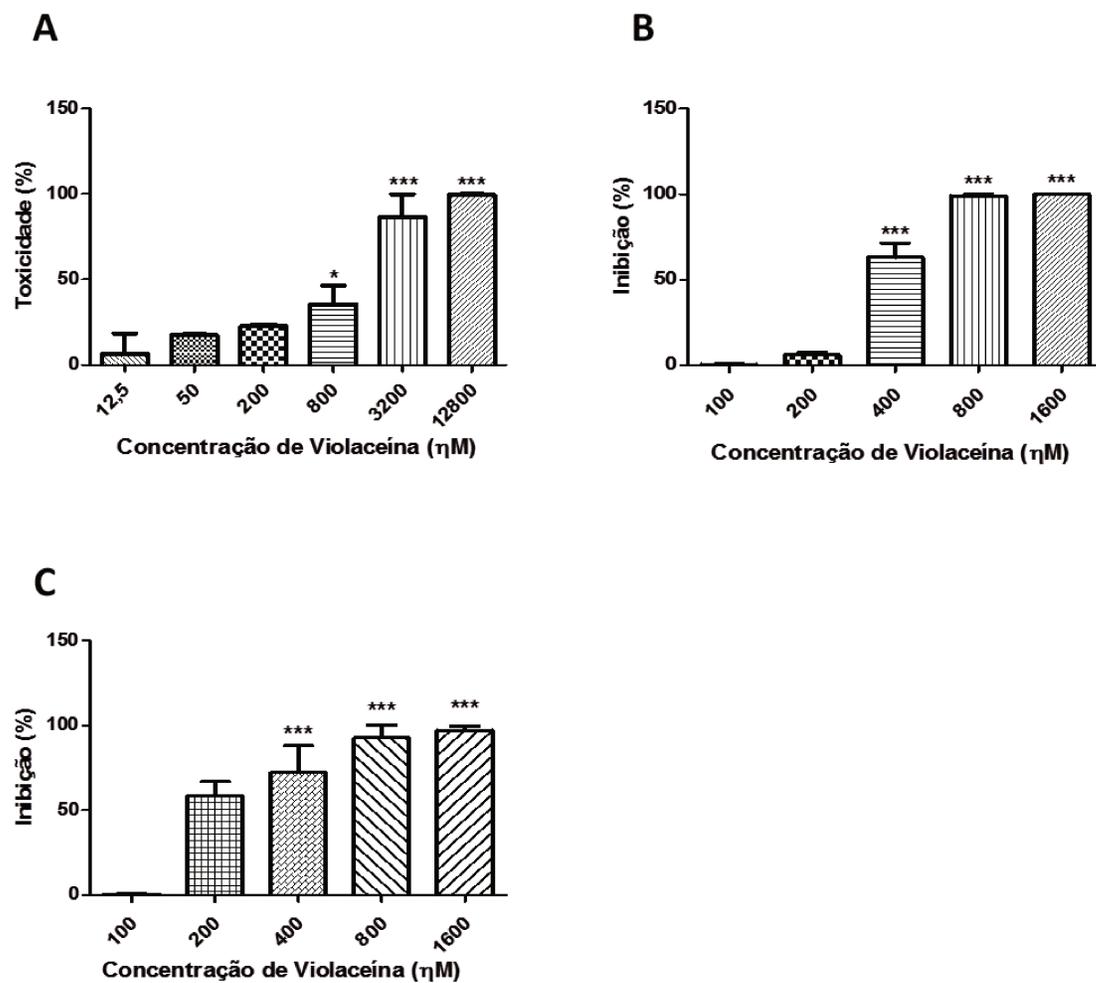


Figura 4: Toxicidade da vJI. Toxicidade a niE (A), células HepG2 (B) e CHO 745 (C). Os dados estão expressos em porcentagem em relação ao controle (sem violaceína) e referem-se a média de triplicata \pm desvio padrão. Teste ANOVA one-way, Turkey post test: * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

4.2.2. Atividade antimalárica

Para avaliar a atividade antimalárica da vJI foram realizados vários ensaios em quadruplicata medindo-se a incorporação de [³H] hipoxantina. A IC₅₀ obtida foi de 226,9 ± 62,42 nM (Figura 5).

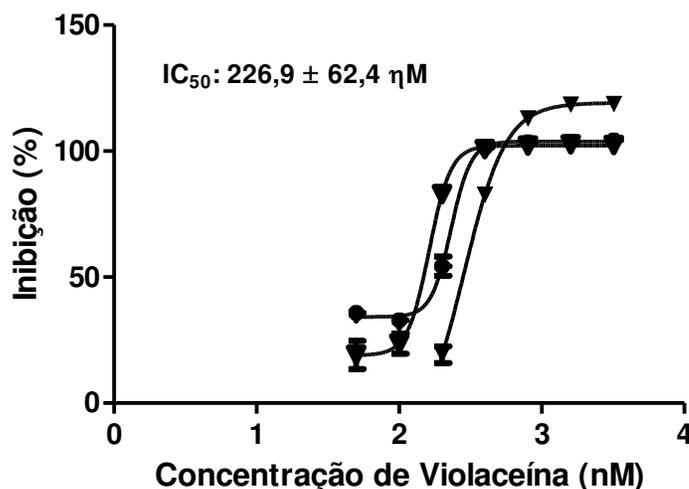


Figura 5: Atividade antimalárica da vJI. Gráfico log da concentração de violaceína (nM) versus inibição do crescimento parasitário (%). Cada linha representa um ensaio. O valor da IC₅₀ é a média de três ensaios.

Em concentrações de 400 nM a violaceína foi significativamente tóxica ($P < 0,01$) para as células CHO 745 e HepG2 (72% e 63% respectivamente) e em concentrações de 800 nM foi significativamente tóxica ($P < 0,05$) para os niE (35%). Importante, em niE na concentração de 200 nM a toxicidade foi elevada (23%), e apesar de não apresentar diferença estatística, era evidente a hemólise na placa. Devido ao fato da IC₅₀ da vJI sobre as formas sanguíneas de *P. falciparum* 3D7 estar próxima a este valor (226,9 nM), a atividade antimalárica encontrada poderia ser reflexo da toxicidade aos niE e não específica ao parasita e desta forma nos impediu de continuar a trabalhar com esta violaceína em teste utilizando animais. Passou-se a trabalhar então, com a violaceína extraída de

Chromobacterium violaceum (vCv), que havia sido utilizada anteriormente no trabalho de nosso grupo e neste demonstrada a baixa toxicidade em eritrócitos e elevada atividade antimalárica (95).

4.3.VIOLACEÍNA *Chromobacterium violaceum* (vCv)

4.3.1. Toxicidade

Por estar utilizando um novo lote de produção de violaceína extraída e purificada de *C. violaceum* pelo grupo do Prof. Nelson Durán, foi decidido repetir os ensaios de toxicidade e de atividade antimalárica contra *P. falciparum* 3D7.

Como pode ser observado na Figura 6A, a vCv demonstrou ser significativamente tóxica ($P < 0,05$) a niE somente em concentrações bastante elevadas de 12.800 nM. Nas linhagens celulares testadas, a violaceína apresentou toxicidade em concentrações menores do que em niE. Sendo tóxica na concentração de 200 nM às células MCF-7, 800 nM às células HepG2 (Figura 6B e 6C, respectivamente) e de 1.600 nM a CHO 745 (Figura 6D).

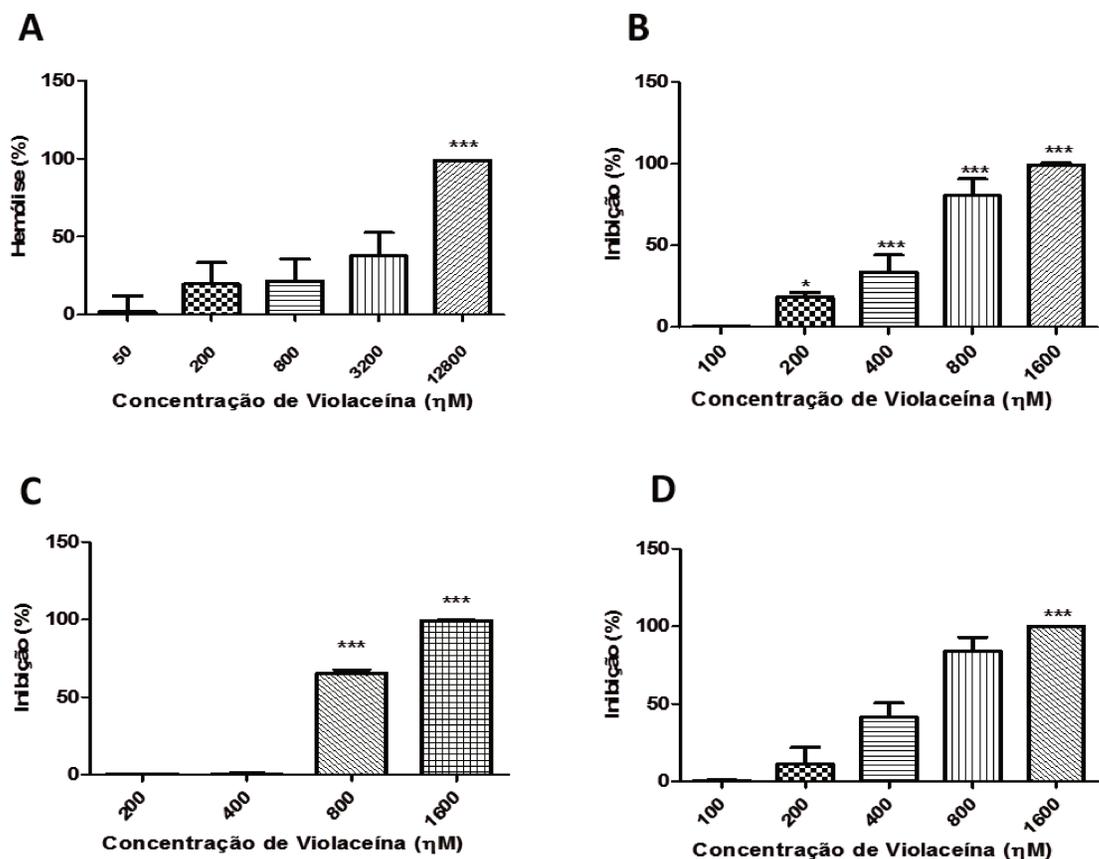


Figura 6: Toxicidade da vCv. Toxicidade a eritrócitos saudáveis (A), células MCF-7 (B), HepG2 (C) e CHO 745 (D). Os dados estão expressos em porcentagem em relação ao controle (sem violaceína) e referem-se a média de triplicata \pm desvio padrão. Teste ANOVA one-way, Turkey post test: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Como a violaceína já foi descrita como tendo atividade anticancerígena bastante acentuada (82, 84), alto índice de toxicidade era esperado nestas linhagens. A elevada toxicidade pode ter sido encontrada também na linhagem não tumoral (CHO 745), uma vez que células imortalizadas apresentam características similares às células tumorais e por isso podem responder às drogas de maneira similar (104).

4.3.2. Atividade antimalárica *in vitro*

Para a avaliar a atividade antimalárica de vCv, eritrócitos infectados por *P. falciparum* 3D7 foram cultivados por 48h na presença de diferentes concentrações de violaceína. Como pode ser verificado na Figura 7, a vCv inibiu o crescimento do parasita de maneira dose-dependente confirmando a atividade antimalárica da violaceína. O IC₅₀ da vCv obtido para *P. falciparum* 3D7 foi de $389,5 \pm 9,83$ nM (média de 2 ensaios).

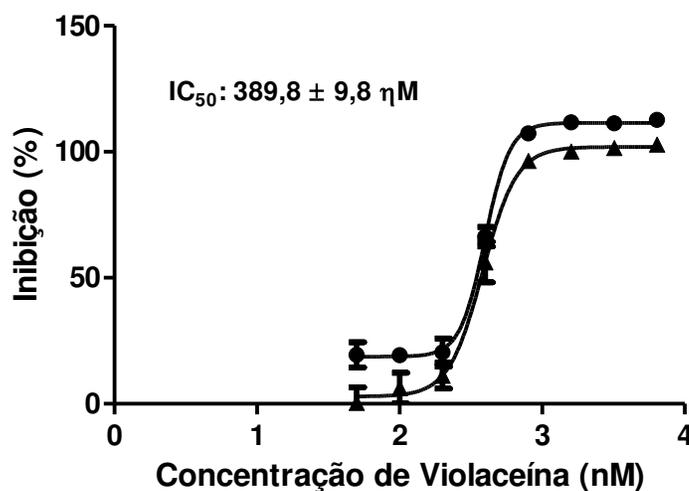


Figura 7: Atividade antimalárica da vCv. Gráfico log concentração da violaceína (nM) versus inibição do crescimento parasitário (%). Cada linha representa um ensaio \pm desvio padrão. O valor da IC₅₀ é a média de dois ensaios.

O valor do IC₅₀ encontrado para a vCv foi 33 vezes menor à concentração significativamente tóxica em niE (12.800 M), é portanto essa violaceína foi a utilizada para os testes posteriores em camundongos e em isolados de *P. falciparum*.

A atividade antimalárica da vCv foi determinada para sete isolados de *P. falciparum* da Amazônia brasileira. Como pode ser verificado na Tabela 2, a atividade da violaceína foi similar nos diferentes isolados e em 3D7 variando a IC₅₀ entre 374,6 e 471,2 nM.

Tabela 2: IC₅₀ da vCv, CQ e ATN em isolados de campo de *P. falciparum*.

ISOLADO	IC ₅₀ (nM)	CQ (nM)	ATN (nM)
3D7	389,8	54	3,4
99	374,6	60,62	0,2160
94A	387,3	56,31	ND*
38A	397,4	96,72	0,3899
Pf03	418,7	4,509	0,3655
KA	425,0	10,06	0,04358
134	464,9	8,369	0,7931
A17	471,2	ND*	0,5001

*ND: Não determinado.

A similaridade entre o IC₅₀ dos isolados e o parasita de laboratório mostra que a violaceína atua tanto em parasitas sensíveis como em parasitas que já foram submetidos à pressão de drogas e no caso do parasita 38A, o IC₅₀ encontrado para cloroquina foi 96 nM o que está no limite do que é considerado como resistência *in vitro* (IC₅₀ > 100 nM) (105).

4.4. ATIVIDADE *IN VIVO* DA VIOLACEÍNA

4.4.1. Testes com *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS-30CQ

A atividade antimalárica da violaceína foi também avaliada *in vivo* em camundongos Balb/C infectados com o clone 30CQ, que é altamente resistente à cloroquina (Figura 8). O clone utilizado foi desenvolvido por Padua, R.A em 1981 (65) e é derivado de uma menos resistente (3CQ). O 30CQ possui várias mutações estáveis em diferentes loci que conferem resistência a 6 doses diárias de 30 mg/kg de cloroquina (65).

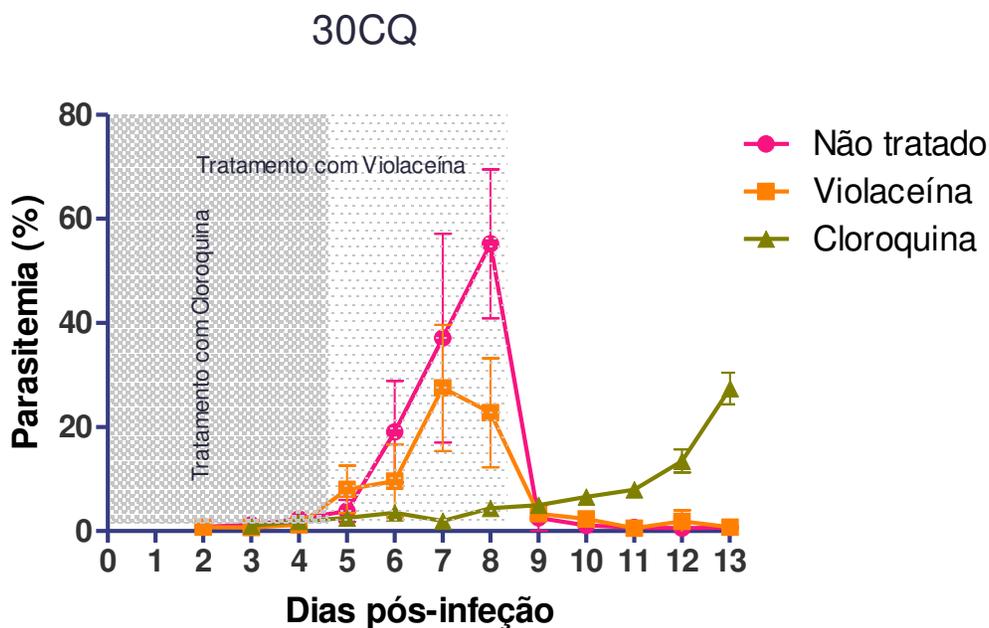


Figura 8: Atividade da vCv em camundongos infectados com *P. chabaudi chabaudi* AS-30CQ resistentes a 30mg kg/6 dias de tratamento com cloroquina. Camundongos Balb/C (n=6 para cada grupo) foram infectados i.p com 10^6 EI de PchAS-30CQ e tratados diariamente com violaceína 1mg/kg/dia (dia 0-10 pós-infecção) ou com cloroquina 30mg/kg/dia (dia 0-4 pós-infecção) ou com DMSO 12,5% (controle) via i.p. A parasitemia foi monitorada diariamente por esfregaço sanguíneo e os resultados estão expressos como a média do grupo \pm desvio padrão. A caixa em cinza escuro representa a duração do tratamento com cloroquina e a caixa cinza claro o tratamento com violaceína.

O tratamento com cloroquina foi feito para assegurar o fenótipo resistente e ter certeza da estabilidade da mutação. Na Figura 8, é evidente o crescimento tardio do parasita tratado com cloroquina, começando no dia 9 com parasitemia de 4% e chegando até uma parasitemia 27% no dia 13. Estes resultados concordam com o reportado por Padua, R.A em 1981 (65), onde eles mostraram que o parasita cresce exponencialmente desde o dia 9 até o dia 15 quando tratado com 30 mg/kg/6 dias de cloroquina.

Já no grupo dos animais tratados com 1mg/kg durante 10 dias de vCv, observa-se uma parasitemia mais baixa quando comparada ao do controle em todos os dias nos quais ela foi acompanhada. Podemos observar que entre os dias 6 e 7, a pente das duas curvas (controle e tratado com violaceína) é igual indicando um crescimento similar. No entanto no dia 8 pós-infecção (pico do grupo controle) encontrou-se uma diferença significativa ($P < 0,05$) no crescimento parasitário quando comparados o grupo não tratado com o grupo tratado com vCv (Figura 9).

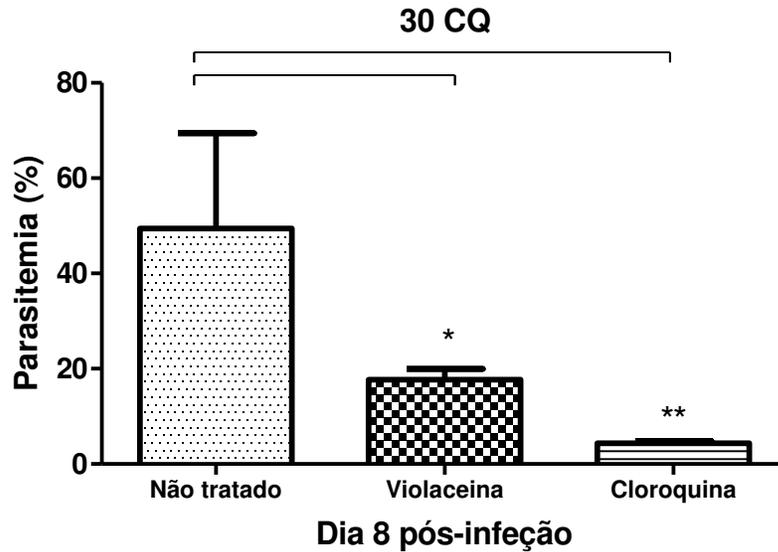


Figura 9: Parasitemia no dia 8 da infecção por *P. chabaudi chabaudi* AS-30CQ. Comparação das parasitemias observadas no dia pico da infecção no grupo Não tratado (55%) versus os grupos tratados com vCv (22,7%) e cloroquina (4,3%). Teste ANOVA one-way, Turkey post test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Na Figura 9, também se observa uma diferença significativa entre o grupo não tratado e o grupo tratado com cloroquina no dia 8, mas deve ser levado em conta que, o tratamento com cloroquina retarda o crescimento parasitário e somente depois do dia 9 apresenta parasitemia patente alcançando parasitemias mais elevadas (27%) no dia 13 pós-infecção, enquanto que a violaceína alcançou uma parasitemia máxima de 27% no dia 7 pós-infecção. Desta forma é importante realizar uma comparação estatística entre os picos de parasitemia em cada tratamento (Figura 10).

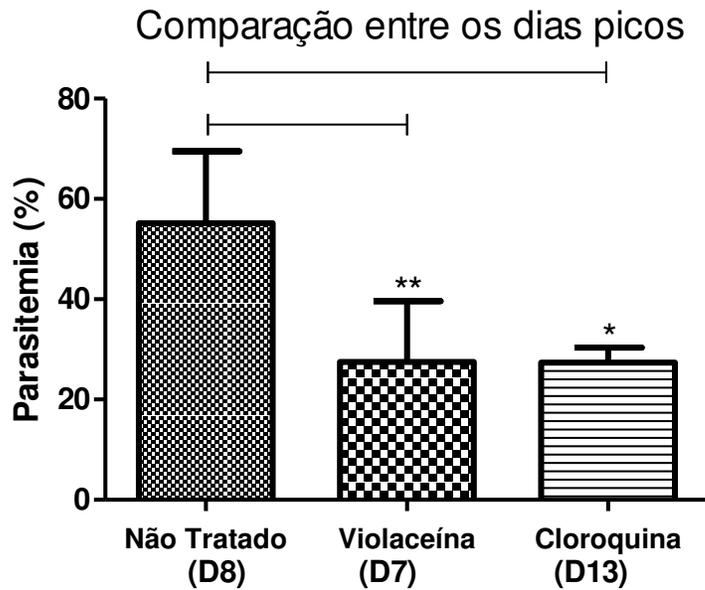


Figura 10: Comparação entre os dias pico das parasitemias. Comparação entre os dias pico da parasitemia nos grupos Não Tratado (dia 8, 55%), grupo tratado com 1mg/kg/dia de violaceína (dia 7, 27%) e o grupo tratado com 30 mg/kg/dia de cloroquina (dia 13, 27%). Teste ANOVA one-way, Turkey post test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Quando realizada a comparação entre os dias 8, 7 e 13 (dia de pico parasitêmico para os grupos não tratado, vCv e cloroquina, respectivamente) encontrou-se uma diminuição significativa da parasitemia nos grupos tratados com violaceína e cloroquina quando comparados ao grupo sem tratamento.

4.4.2. Testes com *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS-ATNMF1

Foram infectados camundongos Balb/C com o clone de *P. chabaudi* AS-ATNMF1 resistente a artesunato e mefloquina (Figura 11) e tratados com vCv, com artesunato ou com vCv mais artesunato. O clone utilizado, foi selecionado pelo grupo do prof. Cravo e derivado da AS-ATN que é resistente a 60 mg de artesunato (66, 100).

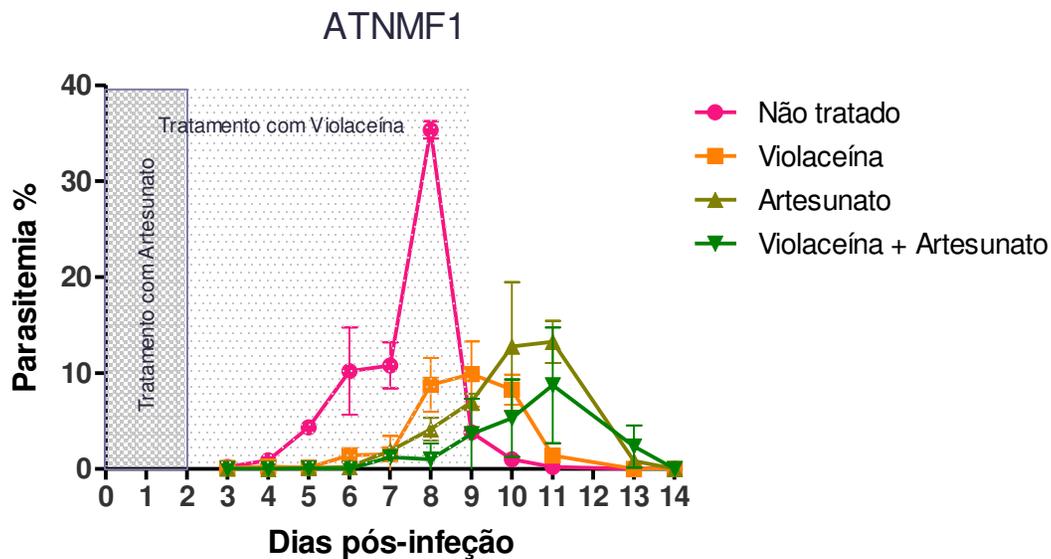


Figura 11: Atividade da vCv em camundongos infectados com *P. chabaudi chabaudi* AS-ATNMF1 Camundongos Balb/C (n=6 para cada grupo) foram infectados i.p com 10^6 EI de PcchAS-ATNMF1 e tratados diariamente com violaceína 1mg/kg/dia (dia 0-10 pós- infecção) e/ou artesunato 40 mg/kg durante 3 dias (dia 0-2 pós infecção) ou com DMSO 12,5% (controle) via i.p. A parasitemia foi monitorada diariamente por esfregaço sanguíneo e os resultados estão expressos como a média do grupo \pm desvio padrão. A caixa cinza escuro representa o tratamento com artesunato e a caixa cinza claro o tratamento com violaceína sozinha ou combinada com artesunato.

Como podemos ver na Figura 11, nos animais não tratados o parasita apresenta um pico no dia 8 pós infecção com 35% de parasitemia, enquanto o tratado com vCv teve um atraso do crescimento parasitário chegando a uma parasitemia de 10% no dia 9. Já os grupos tratados com artesunato tiveram pico no dia 11, e a parasitemia máxima foi de 8% e 13%, no grupo tratado com artesunato e vCv e no grupo tratado somente com artesunato, respectivamente. Como mencionado, a parasitemia entre os grupos tratados com artesunato e vCv não difere muito da encontrada para o grupo tratado só com artesunato o que indica que ambas drogas tem um efeito sinérgico-indiferente.

Em trabalhos anteriores, este clone de parasita em animais tratados, respectivamente, com 40 mg/kg e 3 mg/kg por 3 dias de artesunato e mefloquina,, apresentou dinâmica de crescimento similar àquela encontrada neste experimento, na qual a parasitemia se torna patente nos animais tratados com artesunato a partir do dia 8 e o pico de parasitemia se dá no dia 11 (100). Ainda, similar ao encontrado no experimento com o clone 30CQ, o pico da parasitemia não foi o mesmo nos grupos frente aos diferentes tratamentos, sendo desta forma importante saber qual foi a redução da parasitemia nos grupos tratados vs o controle no dia 8 (Figura 12) e quanto diferem as parasitemias nos dias pico em cada tratamento (Figura 13).

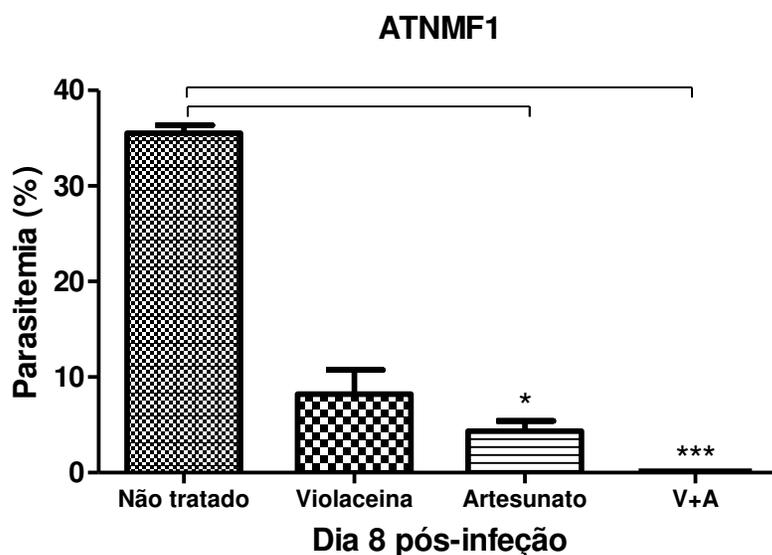


Figura 12: Parasitemia no dia 8 da infecção por *P. chabaudi chabaudi* AS-ATNMF1. Comparação entre as parasitemias observadas no dia pico da infecção no grupo Não tratado (35 %) versus os grupos tratados com vCv (8,7 %), artesunato (4,1 %) e vCv com artesunato (0,9 %). Teste ANOVA one-way, Turkey post test: * p < 0,05; ***p < 0,001.

Similar ao encontrado no experimento com o parasita 30CQ, observa-se na Figura 12 uma diferença significativa entre o grupo não tratado e os grupos tratados com artesunato e artesunato + vCv no dia 8 após infecção, mas como os picos de parasitemia aconteceram em dias diferentes é importante realizar uma comparação estatística entre os picos de parasitemia em cada tratamento (Figura 13).

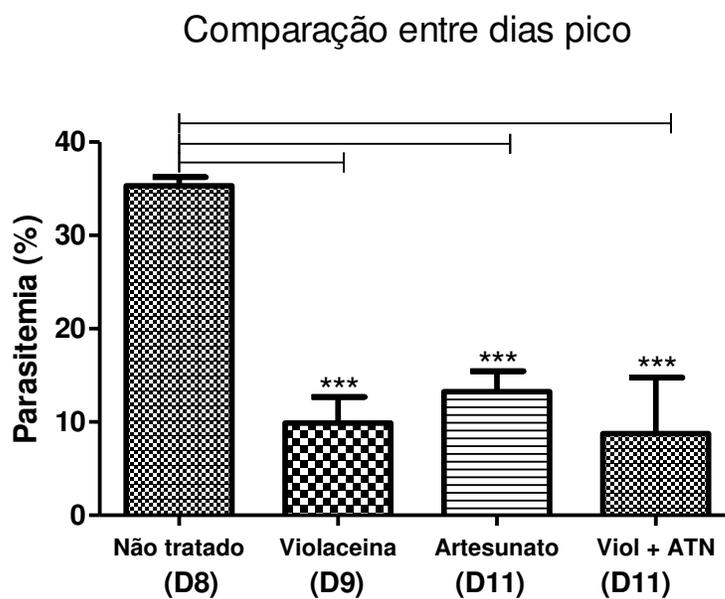


Figura 13: Parasitemia nos dias pico por *P. chabaudi chabaudi* AS-ATNMF1. Comparação entre os dias pico da parasitemia nos grupos não tratado (dia 8, 35%), grupo tratado com 1mg/kg de vCv (dia 9, 10%), grupo tratado com 40mg/kg de artesunato (dia 11, 13%) e o grupo tratado com 1mg e 40 mg por kilo de vCv e artesunato respectivamente (dia 11, 8,7%). Teste ANOVA one-way, Turkey post test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Com o intuito de se determinar se existe uma diferença no tratamento dos compostos utilizados ao longo do tempo, foi calculada a área embaixo da curva efetiva (AUEF) utilizando-se a seguinte equação:

$$(A = \sum_{i=0}^{13} (t_{i+1} - t_i) \left[\frac{f(t_i) + f(t_{i+1})}{2} \right])$$

Com a integral se achou a área embaixo da curva para todos os tratamentos, encontrando que a maior área era como se esperava, a área do grupo não tratado (66,81 % parasitemia/dias), seguida pelo grupo tratado com vCv (13,5% parasitemia/dias), depois o grupo tratado com artesunato (13,25% parasitemia/dias) e finalmente a menor área foi a do grupo tratado com violaceína e artesunato (8,7% parasitemia/dias), corroborando com os dados observados anteriormente.

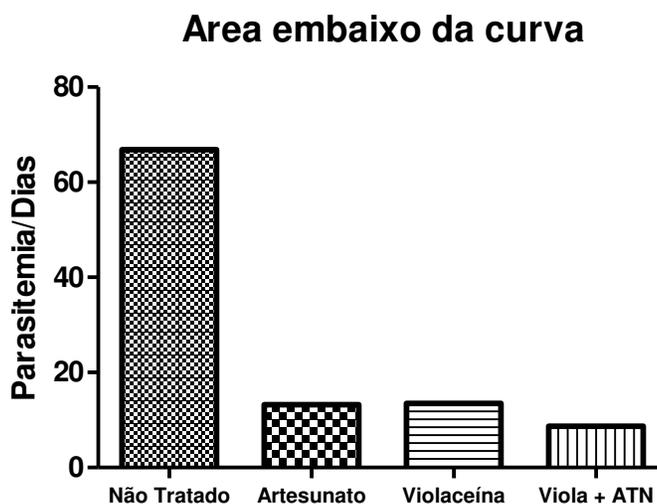


Figura 14: Área embaixo da curva. O cálculo da integral mostra a área do grupo Não tratado (66,81), o grupo tratado com Artesunato (13,25), o grupo tratado com violaceína (13,5%) e o grupo tratado com violaceína e artesunato (8,7). As áreas correspondem a parasitemia durante os dias da infecção.

4.5. ATIVIDADE DA vCv EM AMOSTRAS DE PACIENTES INFECTADOS COM

P. vivax

A atividade antimalárica da vCv também foi avaliada em isolados recém coletados de *P. vivax*. Como ainda não foi desenvolvido um método de cultivo de *P. vivax* a longo prazo, os ensaios utilizados para avaliar a atividade antimalárica de compostos contra este parasita são baseados em avaliação do amadurecimento dos parasitas jovens (trofozoítas/anel) em esquizontes (ensaio de maturação de esquizontes) através da contagem de esfregaços por microscopia óptica. A problemática nestes ensaios encontra-se no fato da parasitemia periférica nos pacientes ser muito baixa (em média 0,11%) e portanto a determinação da parasitemia pós-cultivo e na presença de drogas ser bastante complicada e laboriosa. Além disso os leucócitos no sangue devem ser removidos pois tem sido demonstrado que aumentam o IC₅₀ nos testes *ex-vivo* para *P. vivax* com artesunato e cloroquina pelo fato de reduzir a quantidade de medicamento que estaria disponível para atuar nos eritrócitos, uma vez que penetrariam nos leucócitos competindo com as hemácias parasitadas pela acumulação de antimalárico, também os leucócitos podem atuar como bioesponjas que absorvem o antimalárico, e CQ por exemplo, é preferencialmente acumulada em leucócitos e monócitos (106).

Através de ensaios preliminares conseguiu-se verificar que a violaceína apresentou capacidade em inibir o amadurecimento parasitário, uma vez que houve uma redução na parasitemia nos quatro isolados testados na presença de 400 nM (Tabela 2). Como houve dificuldade em se determinar a parasitemia nos poços tratados devido às baixas parasitemias periféricas encontradas, não foi possível determinar a IC₅₀ da vCv em isolados de *P. vivax*.

Tabela 3: Parasitemia após 40h de cultivo *ex vivo* de *P. vivax* na presença ou não de vCv.

Isolado	Não tratado (%)	400 nM vCv (%)
101	0,25	0
102	0,34	0
105	$4,1 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-4}$
108	$3,4 \times 10^{-4}$	2×10^{-4}

Foram contadas mais de 100 mil células por microscopia para os diferentes isolados, pois a parasitemia é muito baixa e mesmo sem ter conseguido achar o IC₅₀, observa-se uma tendência pela inibição do desenvolvimento desses parasitas na presença da droga. No entanto, a técnica de enriquecimento da parasitemia em *P. vivax* através de gradiente de Percoll[®] vem sendo aplicada pelo nosso grupo em outros trabalhos (107) e foi feito um ensaio preliminar para tentar concentrar os parasitas, obtendo parasitemias perto de 20% (ver figura 15). Mas devido à falta de amostras não foi possível realizar novos testes com a vCv para corroborar e melhorar os resultados obtidos inicialmente.

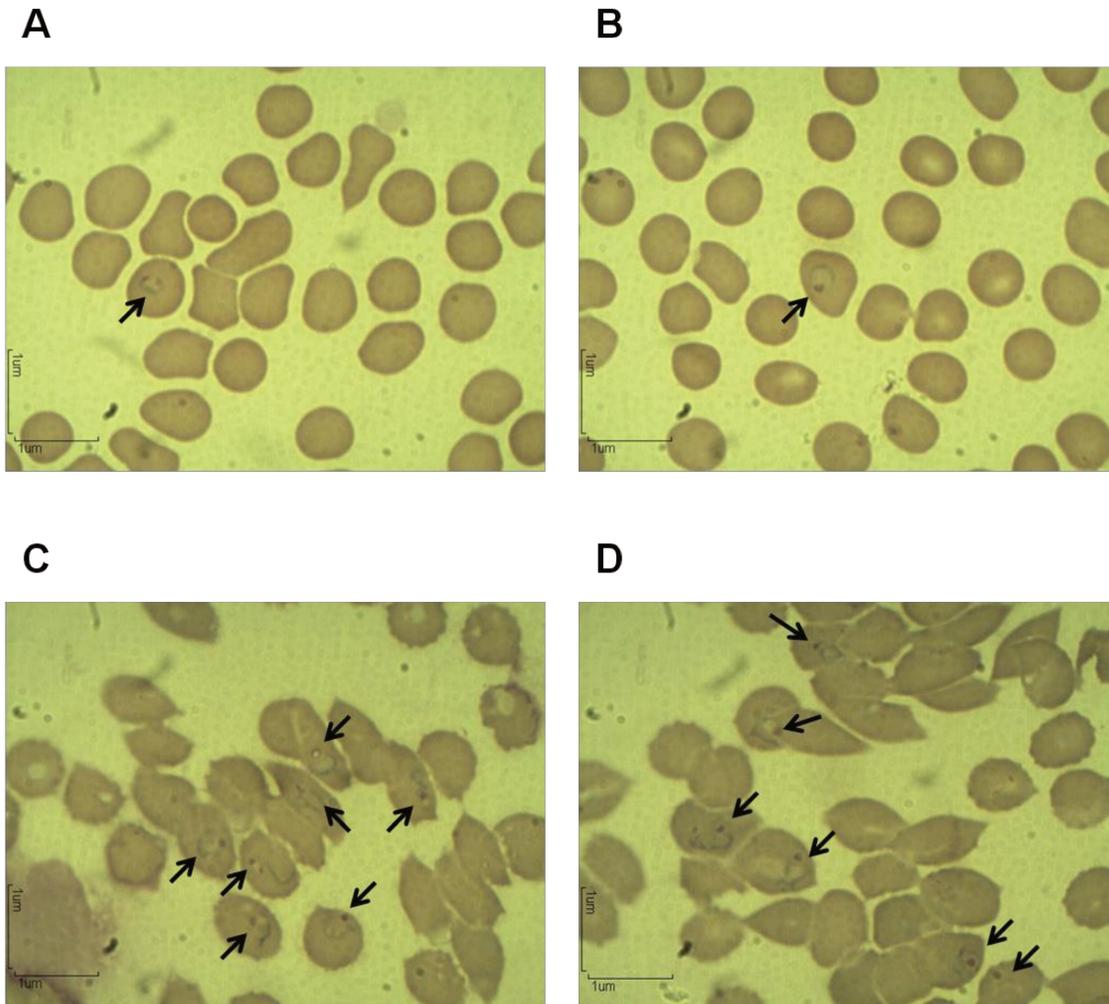


Figura 15: Concentração de *P. vivax* com Percoll®. Esfregaço de sangue total periférica de dois pacientes infectados com *P. vivax* com parasitemias <0,5% (A e B), em comparação com as mesmas amostras separadas por um gradiente de Percoll® obtendo uma parasitemia de \approx 20% (C e D).

Em trabalhos anteriores tem sido reportado grande dificuldade em se trabalhar com isolados brasileiros de *P. vivax* (108) devido à baixa parasitemia circulante nos pacientes que atinge um máximo de 1%. O recomendado para se começar os ensaios é entre 1 e 2% (109). Portanto, é necessário aprimorar a técnica para a determinação da parasitemia em *P.*

vivax, podendo ser por citometria, ELISA ou marcação com fluoróforos, sem deixar do lado contagem por microscopia que é o “*gold standard*” para a contagem de parasitemia.

Alguns dos limitantes para conseguir resultados mais confiáveis nos testes *ex vivo* para *P. vivax* são a falta de equipamentos especializados (citômetro de fluxo, cintilador, microscópio de fluorescência etc) nas regiões endêmicas, já que é muito difícil se deslocar com as amostras, mantendo-as viáveis.

5. CONCLUSÕES

1. Como antimalárico, a violaceína extraída de *C. violaceum* é tão efetiva quanto a extraída de *J. lividum* quando testada contra *P. falciparum* 3D7, mas com menor toxicidade celular.
2. A vCv é eficaz em isolados de campo de *P. falciparum* e o IC₅₀ achado nesses isolados não difere muito do encontrado para 3D7 o que pode indicar que o composto atua em diferente alvo do que o atingido com os antimaláricos conhecidos, mas é necessário fazer testes para identificar a via de ação da violaceína.
3. A vCv parece estar impedindo a maturação dos trofozoítos no sangue infectado com *P. vivax*, mas deve ser aumentado o número de amostras para corroborar essa afirmação.
4. A vCv é efetiva no tratamento de parasitas murinos resistentes à cloroquina, diminuindo significativamente a parasitemia no dia pico (dia 8) e acelerando o *clearence* parasitário.
5. A vCv também é efetiva no tratamento de parasitas murinos resistentes a artesunato e mefloquina, atrasando os picos em 1 ou 3 dias assim como controlando a carga parasitária.
6. Quando combinada com artesunato no tratamento de parasitas murinos resistente a artesunato e mefloquina, a vCv parece ter um efeito aditivo, pois observa-se o atraso do pico causado pelo artesunato e uma menor parasitemia causada pela vCv. Com o cálculo da AUEC foi possível determinar que ambos compostos em combinação têm um melhor efeito que quando testados cada um sozinho, o que torna a violaceína um possível candidato para ser utilizado como droga complementar aos derivados de artemisinina nos ACTs.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. World malaria report. Geneva: World Health Organization; 2011. Xii, 246 p. P.
2. WHO WHO. Cases: Estimated cases by region 2014. Available from: <http://apps.who.int/gho/data/view.main.14112?Lang=en>.
3. Calderaro A, Piccolo G, Gorrini C, Rossi S, Montecchini S, Dell'Anna ML, et al. Accurate identification of the six human *Plasmodium* spp. Causing imported malaria, including *Plasmodium* ovale wallikeri and *Plasmodium* knowlesi. Malaria Journal. 2013;12(1):321.
4. Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium* ovale: Parasite and Disease. 2005.
5. White NJ. *Plasmodium* knowlesi: The Fifth Human Malaria Parasite. 2008.
6. Diseases nnoiaai. Life Cycle of the Malaria Parasite. <Http://www.niaid.nih.gov/topics/malaria/pages/lifecycle.aspx2014>.
7. Da Rocha JA, de Oliveira SB, Povoá MM, Moreira LA, Krettli AU. Malaria vectors in areas of *Plasmodium falciparum* epidemic transmission in the Amazon region, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2008;78(6):872-7.
8. Kappe S, Bruderer T, Gantt S, Fujioka H, Nussenzweig V, Ménard R. Conservation of a Gliding Motility and Cell Invasion Machinery in Apicomplexan Parasites. JCB. 1999.
9. Ali A Sultan VT, Ute Frevert, Kathryn J.H Robson, Andrea Crisanti⁴, Victor Nussenzweig¹, Ruth S Nussenzweig² and Robert Ménard. TRAP Is Necessary for Gliding Motility and Infectivity of *Plasmodium* Sporozoites. Cell. 1997;90(3):511-22.
10. Ancsin JB, Kisilevsky R. A binding site for highly sulfated heparan sulfate is identified in the N terminus of the circumsporozoite protein: significance for malarial sporozoite attachment to hepatocytes. J Biol Chem. 2004;279(21):21824-32.
11. Coppi A, Natarajan R, Pradel G, Bennett BL, James ER, Roggero MA, et al. The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. The Journal of Experimental Medicine. 2011.
12. Sturm A, Amino R, Sand Cvd, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. Science. 2006.
13. Prevention C-cfdca. CDC - Malaria - About Malaria - Biology 2009 [updated 2009-02-08]. Available from: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>.
14. Global Partnership to Roll Back Malaria. Antimalarial drug combination therapy : report of a WHO technical consultation, 4-5 April 2001. Geneva: World Health Organization; 2001. 36 p. P.

15. Talisuna AO, Bloland P, D'Alessandro U. History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance. *Clinical microbiology reviews*. 2004;17(1):235-54.
16. Russell P. *Man's mastery of malaria*: Oxford University Press; 1955. 308 p.
17. Coatney GR. Pitfalls in a discovery: the chronicle of chloroquine. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1963;12:121-8.
18. Bray PG, Hawley SR, Mungthin M, Ward SA. Physicochemical properties correlated with drug resistance and the reversal of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol Pharmacol*. 1996;50(6):1559-66.
19. Harinasuta T, Suntharasamai P, Viravan C. Chloroquine-resistant *falciparum* malaria in Thailand. *Lancet*. 1965;2(7414):657-60.
20. Lasch EE, N'Guyen TL. Observations on an apparent chloroquine-resistant strain of *Plasmodium falciparum* in West Africa. *Br Med J*. 1965;2(5472):1219-22.
21. Box ED, Box QT, Young MD. Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* from porto velho, brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1963;12:300-4.
22. Croft AM. A lesson learnt: the rise and fall of Lariam and Halfan. *J R Soc Med*. 2007;100(4):170-4.
23. CDC. Malaria - Chapter 3 - 2014 Yellow Book | Travelers' Health | CDC: Centers for Disease Control and Prevention; 2013 [updated 2013-08-01]. Available from: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2014/chapter-3-infectious-diseases-related-to-travel/malaria>.
24. Nosten F, van Vugt M, Price R, Luxemburger C, Thway KL, Brockman A, et al. Effects of artesunate-mefloquine combination on incidence of *Plasmodium falciparum* malaria and mefloquine resistance in western Thailand: a prospective study. *Lancet*. 2000;356(9226):297-302.
25. Mita T, Tanabe K, Kita K. Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance. *Parasitol Int*. 2009;58(3):201-9.
26. Happi CT, Gbotosho GO, Folarin OA, Akinboye DO, Yusuf BO, Ebong OO, et al. Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* dhfr and dhps genes and age related in vivo sulfadoxine-pyrimethamine resistance in malaria-infected patients from Nigeria. *Acta Trop*. 2005;95(3):183-93.
27. Enserink M. *Malaria Treatment: ACT Two*. Science. 2007;318(5850).
28. White NJ. Qinghaosu (artemisinin): the price of success. *Science*. 2008;320(5874):330-4.

29. Kumar N, Zheng H. Stage-specific gametocytocidal effect in vitro of the antimalaria drug qinghaosu on *Plasmodium falciparum*. Parasitology research. 1990;76(3):214-8.
30. White NJ, Olliaro P. Artemisinin and derivatives in the treatment of uncomplicated malaria. Medecine tropicale : revue du Corps de sante colonial. 1998;58(3 Suppl):54-6.
31. Olliaro PL, Taylor WR. Antimalarial compounds: from bench to bedside. The Journal of experimental biology. 2003;206(Pt 21):3753-9.
32. Stepniewska K, Ashley E, Lee SJ, Anstey N, Barnes KI, Binh TQ, et al. In vivo parasitological measures of artemisinin susceptibility. The Journal of infectious diseases. 2010;201(4):570-9.
33. WHO WHO. Meeting on the production of artemisinin and acts. WHO; 2013-04-11 19:30:01; Tanzania: World Health Organization; 2005. P. 50.
34. WHO WHO. WHO | WHO briefing on malaria treatment guidelines and artemisinin monotherapies. WHO. 2013.
35. Phyto AP, Faculty of Tropical Medicine MU, Bangkok, Thailand, Shoklo Malaria Research Unit MS, Tak, Thailand, Nkhoma S, Texas Biomedical Research Institute SA, Texas, USA, Stepniewska K, et al. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. The Lancet. 2012;379(9830):1960-6.
36. Rieckmann KH, Davis DR, Hutton DC. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? Lancet. 1989;2(8673):1183-4.
37. Baird JK, Basri H, Subianto B, Fryauff DJ, mcelroy PD, Leksana B, et al. Treatment of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* with chloroquine and primaquine or halofantrine. The Journal of infectious diseases. 1995;171(6):1678-82.
38. Baird JK, Wiady I, Fryauff DJ, Sutanihardja MA, Leksana B, Widjaya H, et al. In vivo resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* at Nabire, Irian Jaya, Indonesia. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1997;56(6):627-31.
39. Sumawinata IW, Bernadeta, Leksana B, Sutanihardja A, Purnomo, Subianto B, et al. Very high risk of therapeutic failure with chloroquine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *P. Vivax* malaria in Indonesian Papua. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2003;68(4):416-20.
40. Sutanto I, Suprijanto S, Nurhayati, Manoempil P, Baird JK. Resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax* at Alor in the Lesser Sundas Archipelago in eastern Indonesia. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2009;81(2):338-42.
41. Ratcliff A, Siswanto H, Kenangalem E, Wuwung M, Brockman A, Edstein MD, et al. Therapeutic response of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* and *P. Vivax* to

chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine in southern Papua, Indonesia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2007;101(4):351-9.

42. Castillo CM, Osorio LE, Palma GI. Assessment of therapeutic response of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* to chloroquine in a Malaria transmission free area in Colombia. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2002;97(4):559-62.

43. Ruebush TK, 2nd, Zegarra J, Cairo J, Andersen EM, Green M, Pillai DR, et al. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* malaria in Peru. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2003;69(5):548-52.

44. De Santana Filho FS, Arcanjo AR, Chehuan YM, Costa MR, Martinez-Espinosa FE, Vieira JL, et al. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. Emerging infectious diseases. 2007;13(7):1125-6.

45. WHO WHO. World Malaria Report 2013. WHO. 2013.

46. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. Malar J. 2010;9:115.

47. Uniprot. Multidrug resistance protein 1, Homo sapiens <http://www.uniprot.org/uniprot/P08183>: 2002; 2014 [cited 2014 Feb 2014]. Proteins database].

48. Foote SJ, Kyle DE, Martin RK, Oduola AMJ, Forsyth K, Kemp DJ, et al. Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium-falciparum*. Nature. 1990;345(6272):255-8.

49. Wilson CM, Serrano AE, Wasley A, Bogenschutz MP, Shankar AH, Wirth DF. Amplification of a gene related to mammalian mdr genes in drug-resistant *Plasmodium-falciparum*. Science. 1989;244(4909):1184-6.

50. Ecker A, Lehane AM, Clain J, Fidock DA. Pfprt and its role in antimalarial drug resistance. Trends in Parasitology. 2012;28(11):504-14.

51. Duraisingh MT, Cowman AF. Contribution of the pfmdr1 gene to antimalarial drug-resistance. Acta Tropica. 2005;94(3):181-90.

52. Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, Cowman AF. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. Nature. 2000;403(6772):906-9.

53. Price RN, Uhlemann AC, Brockman A, mcgready R, Ashley E, Phaipun L, et al. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased pfmdr1 gene copy number. Lancet. 2004;364:438-47.

54. Rodrigues L, Henriques G, Cravo P. MDR1-associated resistance to artesunate+mefloquine does not impair blood-stage parasite fitness in a rodent malaria model. *Infect Genet Evol.* 2013;14:340-6.
55. Cravo PV, Carlton JM, Hunt P, Bisoni L, Padua RA, Walliker D. Genetics of mefloquine resistance in the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:709-18.
56. Brega S, Meslin B, de Monbrison F, Severini C, Gradoni L, Udomsangpetch R, et al. Identification of the *Plasmodium vivax* mdr-like gene (pvmdr1) and analysis of single-nucleotide polymorphisms among isolates from different areas of endemicity. *J Infect Dis.* 2005;191(2):272-7.
57. Suwanarusk R, Russell B, Chavchich M, Chalfein F, Kenangalem E, Kosaisavee V, et al. Chloroquine resistant *Plasmodium vivax*: in vitro characterisation and association with molecular polymorphisms. *Plos One.* 2007;2(10):e1089.
58. Sa JM, Nomura T, Neves J, Baird JK, Wellems TE, del Portillo HA. *Plasmodium vivax*: allele variants of the mdr1 gene do not associate with chloroquine resistance among isolates from Brazil, Papua, and monkey-adapted strains. *Exp Parasitol.* 2005;109(4):256-9.
59. Janse CJ, Carlton JM, Walliker D, Waters AP. Conserved location of genes on polymorphic chromosomes of four species of malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol.* 1994;68(2):285-96.
60. Pinto-Fonseca AJ. Studies on the genetics of artemisinin resistance in malaria. *Ana. Biblioteca Nacional de Portugal: Universidade Nova de Lisboa;* 2007.
61. Grech K, Martinelli A, Pathirana S, Walliker D, Hunt P, Carter R. Numerous, robust genetic markers for *Plasmodium chabaudi* by the method of amplified fragment length polymorphism. *Mol Biochem Parasitol.* 2002;123(2):95-104.
62. Carlton JMR, Hayton M, Cravo PVL, Walliker D. Of mice and malaria mutants: unravelling the genetics of drug resistance using rodent malaria models. *Trends in Parasitology.* 2001;17(5):236-42.
63. Hunt P, Cravo PVL, Donleavy P, Carlton JMR, Walliker D. Chloroquine resistance in *Plasmodium chabaudi*: are chloroquine-resistance transporter (crt) and multi-drug resistance (mdr1) orthologues involved? *Molecular and Biochemical Parasitology.* 2004;133(1):27-35.
64. ROSARIO VE. Genetics of chloroquine resistance in malaria parasites. 1976;261(5561):585-6.
65. Padua RA. *Plasmodium chabaudi*: genetics of resistance to chloroquine. *Exp Parasitol.* 1981;52(3):419-26.

66. Afonso A, Hunt P, Cheesman S, Alves AC, Cunha CV, do Rosario V, et al. Malaria parasites can develop stable resistance to artemisinin but lack mutations in candidate genes *atp6* (Encoding the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ atpase), *tctp*, *mdr1*, and *cg10*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006;50(2):480-9.
67. Ballantine JA, Beer RJS, Crutchley DJ, Dodd GM, Palmer DR. The Chemistry of Bacteria .8. The Synthesis of Violacein and Related Compounds. *J Chem Soc*. 1960(May):2292-9.
68. Duran N, Menck CF. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. *Critical reviews in microbiology*. 2001;27(3):201-22.
69. Brazilian National Genome Project C. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(20):11660-5.
70. Rettori D, Duran N. Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *World J Microb Biot*. 1998;14(5):685-8.
71. Bromberg N, Duran N. Violacein biotransformation by basidiomycetes and bacteria. *Letters in applied microbiology*. 2001;33(4):316-9.
72. Durán NHM, inventor production process of preparation and purification of antitumoral (3-(1,2-dihydro-5-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)-2-oxo-3H-pyrrol-3-ylidene)-1,3-dihydro-2H-indol-2-one). . Brazil 1997.
73. Bromberg N. Biotransformação da Violaceína [Dissertação de Mestrado]: Unicamp; 2000.
74. Lichstein HC, Van De Sand VF. The Antibiotic Activity of Violacein, Prodigiosin, and Phthiocol. *Journal of bacteriology*. 1946;52(1):145-6.
75. Duran N, Erazo S, Campos V. Bacterial Chemistry-Ii - Anti-Microbial Photoproduct from Pigment of *Chromobacterium-Violaceum*. *An Acad Bras Cienc*. 1983;55(3):231-4.
76. Andrighetti-Frohner CR, Antonio RV, Creczynski-Pasa TB, Barardi CR, Simoes CM. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003;98(6):843-8.
77. Andrighetti-Frohner CR, Kratz JM, Antonio RV, Creczynski-Pasa TB, Barardi CR, Simoes CM. In vitro testing for genotoxicity of violacein assessed by Comet and Micronucleus assays. *Mutation research*. 2006;603(1):97-103.
78. De Souza AOA, D.C.G.; Sato, D.N.; Durán, N. Atividade da violaceína in vitro sobre o *Mycobacterium tuberculosis H37RA*. *Revista do Insituto Adolfo Lutz*. 1999;58:59-62.

79. Shirata A, Tsukamoto T, Yasui H, Hata T, Hayasaka S, Kojima A, et al. Isolation of bacteria producing bluish-purple pigment and use for dyeing. *Jarq-Jpn Agr Res Q.* 2000;34(2):131-40.
80. Barreto ES, Torres AR, Barreto MR, Vasconcelos AT, Astolfi-Filho S, Hungria M. Diversity in antifungal activity of strains of *Chromobacterium violaceum* from the Brazilian Amazon. *Journal of industrial microbiology & biotechnology.* 2008;35(7):783-90.
81. Duran N, Justo GZ, Melo PS, De Azevedo MB, Brito AR, Almeida AB, et al. Evaluation of the antiulcerogenic activity of violacein and its modulation by the inclusion complexation with beta-cyclodextrin. *Canadian journal of physiology and pharmacology.* 2003;81(4):387-96.
82. Melo PS, Justo GZ, de Azevedo MB, Duran N, Haun M. Violacein and its beta-cyclodextrin complexes induce apoptosis and differentiation in HL60 cells. *Toxicology.* 2003;186(3):217-25.
83. Saraiva VS, Marshall JC, Cools-Lartigue J, Burnier MN, Jr. Cytotoxic effects of violacein in human uveal melanoma cell lines. *Melanoma research.* 2004;14(5):421-4.
84. De Carvalho DD, Costa FT, Duran N, Haun M. Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA.* 2006;20(8):1514-21.
85. Kodach LL, Bos CL, Duran N, Peppelenbosch MP, Ferreira CV, Hardwick JC. Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis.* 2006;27(3):508-16.
86. Leon LL, Miranda CC, De Souza AO, Duran N. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2001;48(3):449-50.
87. Duran N, Campos V, Riveros R, Joyas A, Pereira MF, Haun M. Bacterial chemistry-III: preliminary studies on trypanosomal activities of *Chromobacterium violaceum* products. *An Acad Bras Cienc.* 1989;61(1):31-6.
88. Haun M, Pereira MF, Hoffmann ME, Joyas A, Campos V, Filardi LD, et al. Bacterial chemistry. VI. Biological activities and cytotoxicity of 1,3-dihydro-2H-indol-2-one derivatives. *Biological research.* 1992;25(1):21-5.
89. Duran N, Justo GZ, Ferreira CV, Melo PS, Cordi L, Martins D. Violacein: properties and biological activities. *Biotechnology and applied biochemistry.* 2007;48(Pt 3):127-33.
90. Melo PS, Maria SS, Vidal BC, Haun M, Duran N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In vitro cellular & developmental biology Animal.* 2000;36(8):539-43.

91. Bromberg N, Justo GZ, Haun M, Duran N, Ferreira CV. Violacein cytotoxicity on human blood lymphocytes and effect on phosphatases. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2005;20(5):449-54.
92. Ferreira CV, Bos CL, Versteeg HH, Justo GZ, Duran N, Peppelenbosch MP. Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. *Blood*. 2004;104(5):1459-64.
93. Bromberg N, Dreyfuss JL, Regatieri CV, Palladino MV, Duran N, Nader HB, et al. Growth inhibition and pro-apoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor. *Chemico-biological interactions*. 2010;186(1):43-52.
94. Justo GZF, C. V.; Peppelenbosch, M. P.; Durán, N. . Cellular and molecular targets in the evaluation of the antitumor potential of biocompounds. *Annual Review Biomedical Science*. 2005;7 (Special Issue 1).
95. Lopes SCP, Blanco YC, Justo GZ, Nogueira PA, Rodrigues FLS, Goelnitz U, et al. Violacein Extracted from *Chromobacterium violaceum* Inhibits *Plasmodium* Growth In Vitro and In Vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;53(5):2149-52.
96. B. LAL, C. EAH, R. JAM, A. MCL. Validación intralaboratorio de una metodología analítica por espectrofotometría uv/vis para evaluar el potencial irritante ocular de tensoactivos en glóbulos rojos. *Vitae*. 2014;18(1):57-62.
97. Schmidt BA. 3H-hypoxanthine incorporation assay for the study of growth inhibition by drugs. In: In I. Ljungström HP, M. Schlichtherle, A. Scherf, and M. Wahlgren (ed.), editor. *Methods in Malaria Research*. 4 ed2004. P. 87-9.
98. Sriprawat K, Kaewpongsri S, Suwanarusk R, Leimanis ML, Lek-Uthai U, Phyto AP, et al. Effective and cheap removal of leukocytes and platelets from *Plasmodium vivax* infected blood. *Malaria journal*. 2009;8:115.
99. Leimanis ML, Jaidee A, Sriprawat K, Kaewpongsri S, Suwanarusk R, Barends M, et al. *Plasmodium vivax* susceptibility to ferroquine. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(5):2228-30.
100. Rodrigues LA, Henriques G, Borges ST, Hunt P, Sanchez CP, Martinelli A, et al. Identification of genetic markers of resistance to Artemisinin Combination Therapy in the rodent model *Plasmodium chabaudi*. *Malaria Journal*. 2010;9(Suppl 2).
101. Cheikna Zongo LPO, Aly Savadogo, Souleymane Sanon, Nicolas Barro, Jean Koudou, Issa Nebie & Alfred S. Traore. In vitro Antiplasmodial Activity of Some Medicinal Plants Used in Folk Medicine in Burkina Faso Against Malaria 2011. Available from: <http://maxwellsci.com/jp/abstract.php?Jid=CRJBS&no=111&abs=08>.
102. Vivas L, Rattray L, Stewart LB, Robinson BL, Fugmann B, Haynes RK, et al. Antimalarial efficacy and drug interactions of the novel semi-synthetic endoperoxide

artemisine in vitro and in vivo. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007;59(4):658-65.

103. Kreidenweiss A, Kremsner PG, Mordmuller B. Comprehensive study of proteasome inhibitors against *Plasmodium falciparum* laboratory strains and field isolates from Gabon. *Malaria Journal*. 2008;7.

104. Marx J. Tackling Cancer at the Telomeres. *Science*. 2002.

105. Ringwald P, Bickii J, Basco LK. In vitro activity of antimalarials against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in Yaounde, Cameroon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1996;55(3):254-8.

106. Kaewpongsri S, Sriprawat K, Suwanarusk R, Kyle DE, Lek-Uthai U, Leimanis M, et al. The Presence of Leukocytes in Ex Vivo Assays Significantly Increases the 50-Percent Inhibitory Concentrations of Artesunate and Chloroquine against *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011;55(3):1300-4.

107. Carvalho BO, Lopes SCP, Nogueira PA, Orlandi PP, Bargieri DY, Blanco YC, et al. On the Cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-Infected Erythrocytes. *Journal of Infectious Diseases*. 2010;202(4):638-47.

108. Lopes S. Desenvolvimento de drogas experimentais e imunopatogênese na malária. Biblioteca do instituto de biologia, UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); 2012.

109. Basco LK, Marquet F, Makler MM, Lebras J. *Plasmodium-falciparum* and *Plasmodium-vivax* - lactate-dehydrogenase activity and its application for in-vitro drug susceptibility assay. *Experimental Parasitology*. 1995;80(2):260-71.

ANEXOS



CEUA/Unicamp

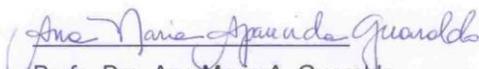
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

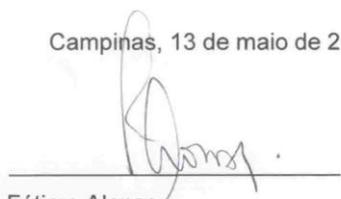
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Avaliação do efeito antimalárico da violaceína em camundongos infectados com cepas de *P. chabaudi* resistentes a antimaláricos" (protocolo nº 3072-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa / Isabel Cristina Naranjo Prado, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 13 de maio de 2013.

Campinas, 13 de maio de 2013.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>