

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BIOMEDICINA**

ANA LUÍZA FRANCO SALZER

**AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA DAS LIGNANAS EM
MODELO DE *Plasmodium falciparum***

NATAL
JUNHO/2019

AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA DAS LIGNANAS EM
MODELO DE *Plasmodium falciparum*

por

Ana Luíza Franco Salzer

Monografia apresentada à
coordenação do Curso de
Biomedicina da Universidade Federal
do Rio Grande do Norte como
requisito parcial à obtenção do título
de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Valter Ferreira de Andrade Neto

Co-orientação: Brenna Marceliane de Melo Marcelino

NATAL
JUNHO/2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BIOMEDICINA

Trabalho de Conclusão de Curso:

Avaliação *in vitro* da Atividade Antiplasmódica das Lignanas Em Modelo De *Plasmodium falciparum*, elaborado por Ana Luiza Franco Salzer e aprovada por todos os membros da Banca examinadora, foi aceito pelo Curso de Biomedicina e homologada pelos membros da banca, como requisito parcial à obtenção do título de BACHAREL EM BIOMEDICINA.

Natal, 07 de Junho de 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valter Ferreira de Andrade Neto
(Departamento de Microbiologia e Parasitologia – DMP, UFRN)

Profa. Dra. Adriana Ferreira Uchôa
(Departamento de Biologia Celular e Genética – DBG, UFRN)

Profa. Dra. Maria de Fátima de Souza
(Departamento de Microbiologia e Parasitologia – DMP, UFRN)

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Central Zila Mamede

Salzer, Ana Luiza Franco.

Avaliação in vitro da atividade antiplasmódica das lignanas em modelo de plasmodium falciparum / Ana Luiza Franco Salzer. - 2019.

30 f.: il.

Monografia (graduação) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Curso de Biomedicina. Natal, RN, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Valter Ferreira de Andrade Neto.

1. Malária - Monografia. 2. Plasmodium falciparum - Monografia. 3. Lignana - Monografia. 4. Atividade antimalárica - Monografia. I. Andrade Neto, Valter Ferreira de. II. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 616.936

Elaborado por Kalline Bezerra da Silva - CRB-15 / 327

AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos aos meus pais, Flávio e Lídia, pelo apoio e amor incondicional, por aturar meus momentos de estresse. Ao meu irmão, August, pelas palavras de incentivo e amor mesmo longe. Ao meu grande companheiro de vida e meu melhor amigo, Marcello Renyer, por me amar e dar forças mesmo nos momentos mais difíceis. Ao HI-5, por todos os momentos bons e ruins que passamos juntas, apoiando umas as outras.

Ao meu orientador, Prof. Dr Valter Ferreira de Andrade Neto, por todo conhecimento científico e crescimento pessoal que proporcionou a mim. A minha menstranda, Brenna Melo, por toda atenção nos momentos em que mais precisei, me ensinar tudo e responder meus áudios nas madrugadas da vida. A todos os professores do curso de Biomedicina, que foram essenciais para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Por fim, gostaria de agradecer ao ser supremo, Deus, aos espíritos de luz e a minha mentora espiritual, por sempre me guiar.

RESUMO

A malária é uma doença infecciosa, de transmissão vetorial, causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e caracterizada por febre alta, calafrios, dor de cabeça, anemia hemolítica e icterícia. Com o agravamento do quadro clínico e ausência de tratamento, a malária pode evoluir para sua forma mais grave, causando danos sistêmicos e cerebrais, causando elevada morbimortalidade. No Brasil, a maioria dos casos de malária encontra-se no norte do país (região amazônica), onde o clima favorece a reprodução do mosquito transmissor e sobrevivência do protozoário. Entretanto, em estados da região extra-amazônica a ocorrência da malária importada representa uma grande preocupação devido aos elevados índices de letalidade e riscos de surtos. As espécies de interesse clínico e científico causadoras da malária humana são *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi* e *Plasmodium simium*. O tratamento medicamentoso ainda é a principal estratégia para o controle da malária, contudo o *P. falciparum*, vem adquirindo resistência aos antimaláricos usuais de maneira muito mais rápida que o desenvolvimento e implementação de novos fármacos utilizados contra a malária; sendo uma das prioridades da OMS o desenvolvimento de novos antimaláricos, que sejam eficazes, de baixo custo e que tenham novos alvos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* a atividade antiplasmodica de Lignanas contra o estágio intraeritrocítico assexuado de *Plasmodium falciparum* (cepa 3D7) e observamos uma redução expressiva no crescimento da cultura tratada com o composto. Sendo as LIG-C1, LIG-C2 e LIG-E1 as que tiveram melhores resultados na inibição do crescimento do *Plasmodium falciparum*.

Palavras-chaves: Malária. *Plasmodium falciparum*. Lignana. Atividade antimalárica

ABSTRACT

Malaria is an infectious, vector-borne disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium* and characterized by high fever, chills, headache, hemolytic anemia, and jaundice. With the aggravation of the clinical picture and absence of treatment, malaria can evolve to its most severe form, causing systemic and cerebral damages, causing high morbidity and mortality. In Brazil, the majority of cases of malaria are found in the north of the country (Amazon region), where the climate favors the reproduction of the transmitting mosquito and the survival of the protozoan. However, in states of the extra-Amazon region, the occurrence of imported malaria is a major concern due to high rates of lethality and risk of outbreaks. The species of clinical and scientific interest that cause human malaria are *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi* and *Plasmodium simium*. Drug treatment is still the main strategy for malaria control; however, *P. falciparum* has acquired resistance to the usual antimalarials much more rapidly than the development and implementation of new drugs used against malaria; one of WHO's priorities is the development of new antimalarials that are effective, inexpensive and have new targets. The aim of the present work was to evaluate in vitro the antiplasmodic activity of Lignans against the asexual intra - erythrocytic stage of *Plasmodium falciparum* (strain 3D7) and observed an expressive reduction in the growth of the culture treated with the compound. LIG-C1, LIG-C2 and LIG-E1 were the ones that had the best inhibition of *Plasmodium falciparum* growth.

Key-words: Malária. *Plasmodium falciparum*. Lignana. Antimalarial activity

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACT	Artemisinin-based combination therapy
CQ	Cloroquina
DMSO	Dimetilsulfóxido (sulfóxido de dimetilo)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
LABMAT	Laboratório de Biologia da Malária e Toxoplasmose
LIG	Lignana
OMS	Organização Mundial de Saúde
RPM	Rotações por minuto
RPMI-1640	Meio de cultura, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Ciclo de Vida do <i>Plasmodium</i>	13
Figura 2: Estrutura das lignanas	17
Figura 3: Hemácia poli parasitada com <i>Plasmodium falciparum</i>	19
Figura 4: <i>Plasmodium falciparum</i> em forma de esquizonte.....	20
Figura 5: Cabine de segurança biológica classe II.....	21
Figura 6: Exemplificação da microplaca teste.....	23

LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

Tabela 1: Antimaláricos atualmente disponíveis.....	16
Gráfico 1: Ação inibitória da cloroquina no teste in vitro.....	24
Gráfico 2: Ação inibitória da lignana-C1 no teste in vitro.....	24
Gráfico 3: Ação inibitória da lignana-C2 no teste in vitro.....	25
Gráfico 4: Ação inibitória da lignana-E1 no teste in vitro.....	26
Gráfico 5: Ação inibitória da lignana-E2 no teste in vitro.....	26
Gráfico 6: Ação inibitória da lignana-L1 no teste in vitro.....	27

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	11
1.1 <i>Plasmodium</i> e malária humana.....	11
1.1.1 Ciclo biológico	12
1.1.2 Terapêutica e medicamentos antimaláricos	14
1.1.3 Lignanas	16
2- OBJETIVOS	18
2.1 Objetivos gerais	18
2.2 Objetivos específicos	18
3- MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Ensaio antimalárico	18
3.2 Ensaio antimalárico in vitro	20
3.2.1 Lavagem de sangue.....	20
3.2.2 Cultura de <i>Plasmodium falciparum</i>	21
3.2.3 Microteste	22
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5- CONCLUSÃO	28
6- REFERÊNCIAS	29

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Plasmodium* e malária humana

A malária é uma doença infecciosa parasitária, causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. Pertencem ao grupo dos Apicomplexa, inseridos no táxon Alveolata, sendo caracterizados pela presença de um complexo apical que exerce função essencial na invasão do parasito na célula do hospedeiro. Apresenta como vetor a fêmea infectada do mosquito *Anopheles*. (ADL et al., 2005; 2012).

Até o momento, são conhecidas mais de 150 espécies de *Plasmodium*, porém, as espécies de interesse clínico e científico causadoras da malária humana são *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. lasmodium ovale* e *P. knowlesi*. Mais recentemente, *P. simium*, que até então era conhecida apenas por parasitar macacos, teve sua capacidade de infecção em humanos comprovada no ano de 2017 (BRASIL et al., 2017), sendo ainda considerada uma espécie de caráter zoonótico. O *P. falciparum* é a espécie mais letal, sendo o mais prevalente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, responsável pela maioria das mortes ocorridas na doença. Apesar do *P. falciparum* existir no Brasil, o *Plasmodium vivax* é a espécie mais frequente em nosso meio (ALENCAR FILHO et al., 2014; PEDROSA; MARTINS, 2016).

Entre os sintomas mais comuns da infecção estão febre alta, calafrio, dor de cabeça, posteriormente causando anemia hemolítica e icterícia. Com o agravamento do quadro clínico e ausência de tratamento, a malária pode evoluir para a sua forma grave, causando danos cerebrais (malária cerebral) e podendo levar a óbito. A forma grave da doença é prevalente em crianças pequenas e primíparas que vivem em área endêmica, podendo causar sequelas neurocognitivas, como comportamentais e de aprendizagem (PEREIRA, L.; ALMEIDA, R; LIMA, F., 2018).

Com altos índices de mortalidade, a malária é uma das principais doenças infecciosas do mundo, sendo endêmica nas regiões tropicais. Em regiões não tropicais o número de casos vem crescendo devido ao diagnóstico tardio e pelo aumento da resistência aos antimaláricos. No Brasil, a maioria dos casos de malária encontra-se no norte do país (região amazônica), onde o clima favorece a reprodução do mosquito e sobrevivência do protozoário. Em 2017, foram registrados

219 milhões de casos no mundo e 435 mil mortes por malária, sendo a maioria delas de crianças com menos de cinco anos (OMS, 2019). No Brasil, para o mesmo ano, foram reportados 173.035 casos da doença (BRASIL, 2019).

Desde 2010, a quantidade de pessoas que contraíram malária no mundo vinha caindo: de 239 milhões, naquele ano, para 214 milhões, em 2015. A África é a mais afetada pela doença. Um aumento de 3,5 milhões de casos de malária de 2016 para 2017 foi observado em dez países do africano unidos, Burkina Faso, Camarões, Congo, Gana, Mali, Moçambique, Níger, Nigéria, Uganda e Tanzânia. Ao todo, o continente africano registrou cerca de 200 milhões dos casos da doença em 2017 (OMS, 2019).

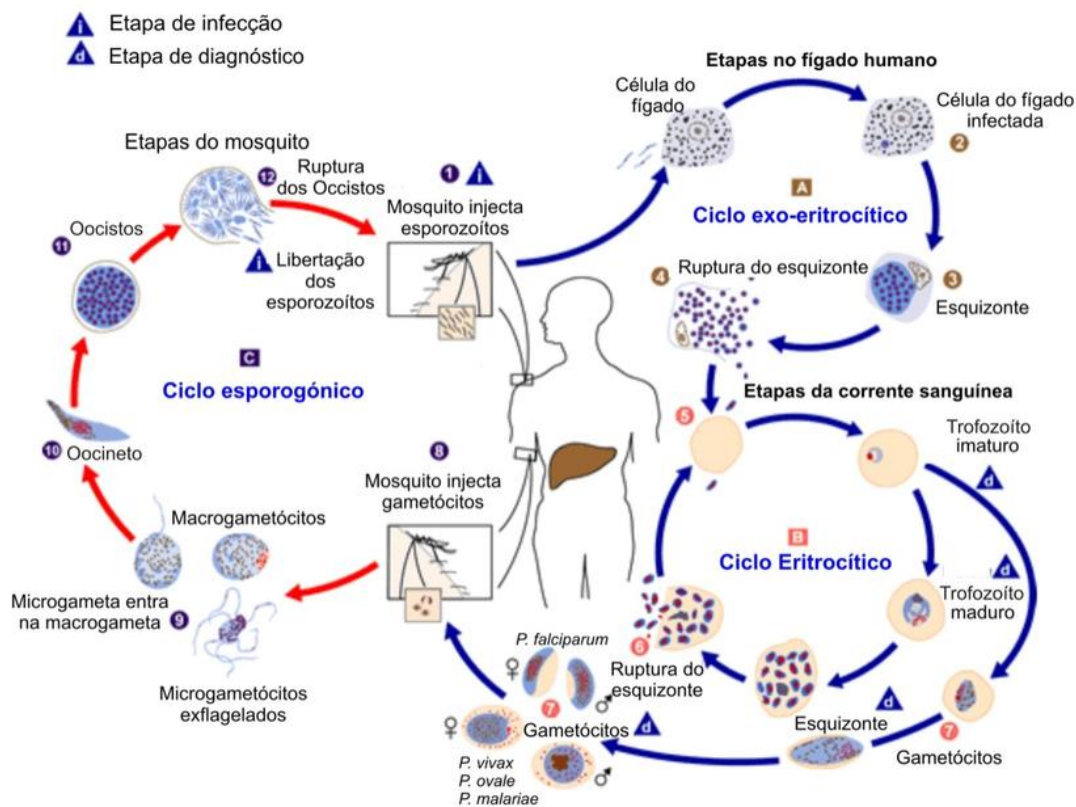
Apesar do número de casos ter aumentado a nível mundial, a taxa de mortalidade diminuiu. Em 2017, 435 mil pessoas morreram de malária, número que representa uma queda em relação a 2016. Dessas, 403 mil morreram no continente africano, quase 93%. A maioria dos casos brasileiros se concentra na região Amazônica, nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (OMS, 2019).

1.1.1 Ciclo Biológico

O ciclo de vida do *Plasmodium* é heteroxênico e depende de um hospedeiro invertebrado, fêmea do mosquito *Anopheles* (vetor biológico/hospedeiro definitivo), e um hospedeiro vertebrado (hospedeiro intermediário) (Figura 1) (WHITE et al., 2014). A forma infectante do *Plasmodium*, o esporozoíto, é inoculado no hospedeiro por meio do repasto sanguíneo. Os esporozoítos, através da corrente sanguínea, infectam as células hepáticas pela interação entre a proteína circunsporozoíta (CSP) e a proteína anônima relacionada à trombospondina (TRAP) do *P. falciparum*, e o heparan sulfato dos hepatócitos (FREVERT et al., 1993; ALY et al., 2009) e se diferenciam em trofozoítos exo-eritrocíticos (ciclo hepático). Posteriormente, por meio de esquizogonia exo-eritrocítica, se multiplicam, e origina os esquizontes teciduais. Estes esquizontes, rompem-se e liberam os merozoítos (envolvidos em vesícula merossomal) (STURM et al., 2006), os quais invadem os eritrócitos. A partir deste momento inicia-se o ciclo eritrocítico. Os merozoítos dentro dos eritrócitos, se transformam em trofozoítos jovens, vistos por microscopia

possuem forma de anel. Adiante, esta forma jovem se transforma em trofozoítos maduros, os quais vão originar os esquizontes. Por fim, os esquizontes se rompem e liberam os merozoítos, que irão infectar outros eritrócitos e recomeçar a fase eritrocitária (COWMAN; CRABB 2006).

Figura 1: Ciclo de vida do *Plasmodium*



Fonte: CDC, adaptado.

Alguns dos merozoítos sanguíneos se diferenciam em estágios eritrocíticos sexuais, os gametócitos. Somente os gametócitos são capazes de evoluir no inseto vetor, dando origem ao ciclo sexuado ou esporogônico. As formas evolutivas sexuais machos (microgametócitos) e fêmeas (macrogametócitos) são ingeridas por um mosquito fêmea de *Anopheles* durante o repasto sanguíneo. Por um processo denominado exflagelação, o microgametócito dá origem a oito microgametas, ao passo que, o macrogametócito transforma-se em um macrogameta. Durante o tempo de permanência no estômago do mosquito, um microgameta começa a penetrar em um macrogameta fecundando-o e gerando um zigoto que logo torna-se móvel (oocineto). No intestino médio, os oocineto

invadem a camada epitelial do órgão e se encistam, passando a serem chamados de oocistos (CIRIMOTICH et al., 2010).

Tem-se início ao processo de divisão esporogônica em que há crescimento do oocisto seguido de seu rompimento e liberação de esporozoítos. Estes esporozoítos dirigem-se às glândulas salivares do mosquito onde estarão prontos e aptos a infectar um novo hospedeiro humano perpetuando o ciclo de vida do *Plasmodium* e preservando a malária no mundo (ALY et al 2009).

1.1.2 Terapêutica e medicamentos antimaláricos

Para prevenir uma maior propagação da infecção na comunidade, a malária deve ser prontamente reconhecida e tratada. Para isso, deve-se suspeitar da doença sempre que o paciente possuir histórico de viagens para áreas endêmicas e apresentar os sintomas clínicos clássicos como febre e dores de cabeça. Devido a sintomatologia geral ser semelhante a de outras doenças, muitas vezes a malária é confundida atrasando o diagnóstico uma vez que os profissionais da saúde não estão familiarizados com a doença, principalmente em áreas não endêmicas, não solicitando os exames necessários. Para um diagnóstico preciso, testes laboratoriais devem detectar a presença do parasita seja por identificação em distensões sanguíneas ou testes de imunocromatografia (BRASIL, 2010).

Para o tratamento da malária, é de extrema importância a identificação do *Plasmodium* para um melhor planejamento de terapêutica. Geralmente, é realizada a associação de dois ou mais antimaláricos diferentes, com intuito de atuar em pelo menos duas formas do parasito. São utilizados esquizotocidas, gametocitocidas e, para *Plasmodium vivax*, hipnozoitocidas (FREITAS, L. ; CHAVES, G.;WANNMACHER, L.; GARCIA. C., 2007; BRASIL 2010).

Os medicamentos utilizados no tratamento da malária, têm as funções de: prevenir a progressão para a doença grave e limitar o desenvolvimento de gametócitos, impedindo a transmissão aos mosquitos e também, prevenir a malária nas áreas endêmicas através de estratégias de quimioprofilaxia. A maioria das drogas utilizados na terapêutica da malária são ativas contra as formas sanguíneas (responsáveis pela sintomatologia da doença) tais como a cloroquina (não utilizada para *P. falciparum*), mefloquina, quinina, quinidina, doxiciclina (usada em

combinação com quinina), clindamicina (usada em combinação com quinina), artesunato (artemisinina) entre outros (CDC, 2017).

Com a crescente resistência a medicamentos mais antigos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a terapia combinada com base em artemisinina (artemisinin-based combination therapy – ACT) para o tratamento da malária, uma vez que a terapia de combinação se torna uma alternativa ao “atrasar” a resistência do parasita aos antimaláricos, já que a probabilidade de desenvolvimento de resistência simultânea a dois agentes quimioterápicos com independentes mecanismos de ação é relativamente baixa. A utilização de derivados de artemisinina de forma isolada não é recomendada pela OMS como forma de evitar a seleção de uma resistência a essa importante classe de drogas. Desse modo, a utilização de combinação de fármacos que possuam diferentes mecanismos de ação e meia-vidas mais longas, para o tratamento de primeira linha contra a malária causada por *P. falciparum* (CUI & SU, 2009) é a estratégia utilizada na quimioterapia antimalárica. No entanto, a cloroquina e a primaquina ainda continuam sendo os fármacos de primeira escolha para o tratamento da malária causada por *P. vivax* na maioria das regiões (BLOLAND; ETTLING; MEEK, 2000; CUI et al., 2015). A tabela 1 mostra os medicamentos antimaláricos atualmente disponíveis.

Apesar da tentativa de usar a associação de fármacos como uma estratégia terapêutica eficaz contra a resistência, tem-se percebido o aparecimento de casos de falência terapêutica à artemisinina desde 2004 (BUTLER, 2010). Nos últimos anos, estudos tem mostrado a associação entre mutações no gene *kelch* de *Plasmodium falciparum* (K13) e falhas terapêuticas para a dihidroartemisinina no sudeste asiático (ARIEY et al., 2014; ASHLEY et al., 2014; TUN et al., 2015). A cloroquina (CQ) sempre foi o fármaco de preferência, por ser eficaz no combate de todas as formas do parasito, entretanto o *P. falciparum* (uma das espécies com maior letalidade) se tornou resistente. Atualmente o tratamento é realizado com a cloroquina em combinação com outros fármacos, como a primaquina apenas para a malária-*vivax* (BORGES, T. ; MIRANDA, E.; FREITAS, L., 2013).

Tabela 1: Antimaláricos atualmente disponíveis

Antimalárico	Uso	Alvo
Cloroquina	Tratamento de malária não falcipara	Formas sanguíneas
Amodiaquina	Usada em parceria com ACT	Esquizontes / Gametócitos <i>P. vivax</i> e <i>P. malariae</i>
Peperaquina	Usada em parceria com o ACT dihidroartemisinina	Formas sanguíneas
Primaquina	Cura radical e profilaxia para malária por <i>P. vivax</i> , <i>P. ovale</i> . Droga anti-gametócitos para <i>P. falciparum</i> .	Hipnozoítas / gametócitos
Quinina	Tratamento para malária severa e malária por <i>P. falciparum</i> .	Formas sanguíneas
Mefloquina	Profilaxia e droga parceira de ACT para tratamento de malária falcipara	Esquizontes sanguíneos
Artemeter	ACT	Esquizontes sanguíneos
Artesunato	ACT, Tratamento de malária severa	Esquizontes sanguíneos
Dihidroartemisinina	ACT, Combinação com piperquina	Esquizontes sanguíneos

Fonte: Adaptado de (CUI et al., 2015).

A resistência de cepas de *P. falciparum* aos antimaláricos é conhecida desde os anos 80, porém, ainda são empregados tratamentos com medicamentos de certa eficácia generalista. O ciclo de vida do *Plasmodium* é bastante complexo, o que dificulta as pesquisas para novos tratamentos e desenvolvimento de vacinas eficazes, entretanto, desde a descoberta de sua resistência o número de pesquisas com substâncias com ação antiplasmódica vem crescendo, incluindo compostos naturais como venenos de alguns animais e derivados de plantas (MUSA, A. 2018).

1.1.3 Lignanas

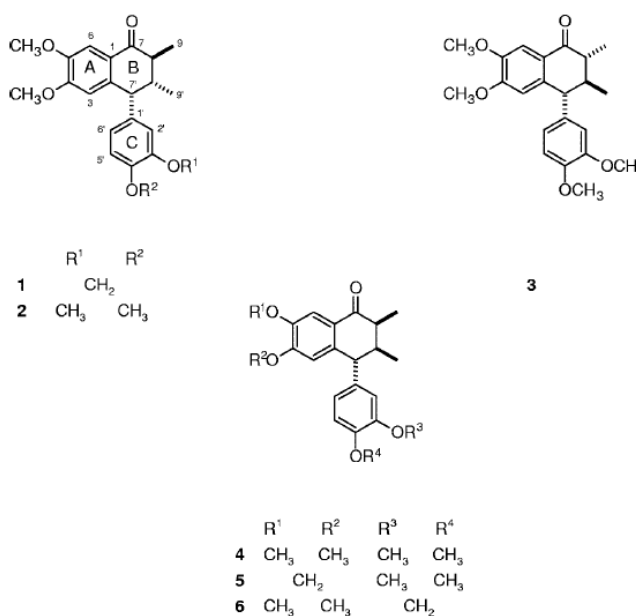
A utilização de produtos naturais como fontes potenciais de novos fármacos é realizada a décadas. Substâncias extraídas de plantas são utilizadas para diversos fins. Algumas possuem ação contra diferentes patógenos. O Brasil apresenta um enorme potencial para pesquisas de fármacos derivados de substâncias naturais, possui excelentes recursos naturais e uma grande biodiversidade vegetal. Na floresta amazônica existem mais de 50 mil espécies de plantas, as quais possuem compostos químicos de grande utilidade para pesquisas (LIMA, R.; BARROS, A.; ALMEIDA, K.; PANTOJA, T. 2018). A Piperaceae é uma família que inclui oito

gêneros e aproximadamente 2.000 espécies, onde quase todas estão incluídas em *Piper* e *Peperomia* (SOUZA; LORENZI, 2012). As plantas desta família possuem grande importância ecológica e medicinal, onde muitas espécies são utilizadas na alimentação e na medicina popular para tratamentos de diversas doenças respiratórias, inflamatórias, infecciosas e digestivas (LEAL, 2000).

As lignanas são metabólitos secundários produzidos por algumas espécies de plantas do gênero *Piper* que estão associados à defesa contra a ação de patógenos (LAURENTIZ, R.; BORGES, A.; LAURENTIZ, A.; SILVA, M., MARTINS, C. 2014). Pela sua diversidade de estruturas químicas e atividades farmacológicas, esta substância está sendo testada para algumas doenças infecciosas de grande importância médica e com relevância epidemiológica como tuberculose e doença de Chagas (SOUZA. V.; NAKAMURA. C.; CORRÊA. A. 2012).

Nesse sentido, as Lignanas têm sido utilizadas como compostos líderes no desenvolvimento de novos fármacos, principalmente pela baixa citotoxicidade e atividades antiangiogênicas, inclusive com ação antiplasmódica de lignanas ariltetralônicas estudadas pelo grupo de pesquisa do Labmat/UFRN (ANDRADE-NETO et al 2007)

Figura 2: Estrutura das lignanas



Fonte: ANDRADE-NETO et al 2007.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar a atividade antiplasmódica de lignanas contra o *Plasmodium falciparum* in vitro.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a susceptibilidade do *P. falciparum* (3D7) in vitro após tratamento com cinco derivados de Lignanas
- Determinar o percentual de redução de parasitemia in vitro para cada derivado de Lignanas;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Ensaio antimalárico

A análise de atividades antimaláricas de compostos é realizada por meio de testes *in vivo* e *in vitro*. Em sua maioria são complementares, tendo em vista que teste *in vitro* requerem confirmação em modelos vivos. Os testes *in vivo* estão associados a modelos animais, roedores em sua maioria, para avaliar a biologia básica do *Plasmodium*, de sua bioquímica, interações entre hospedeiros, evolução da virulência e resposta à terapia medicamentosa, como por exemplo o *Plasmodium berghei*. Sabemos que existem algumas diferenças entre as infecções no homem e em roedores, porém todas as espécies de *Plasmodium spp.* que infectam mamíferos possuem ciclos de vida comparáveis e são sensíveis às mesmas drogas. Fatores como a imunidade, as variações na absorção da droga e no metabolismo, são reduzidos devido ao uso de animais ainda não expostos (naïve), de linhagens reconhecidas, nos experimentos. No entanto, a atividade antimalárica medida em um

teste *in vivo* nem sempre leva em consideração efeitos colaterais, como o metabolismo e a genética do hospedeiro, o que pode influenciar no resultado do experimento.

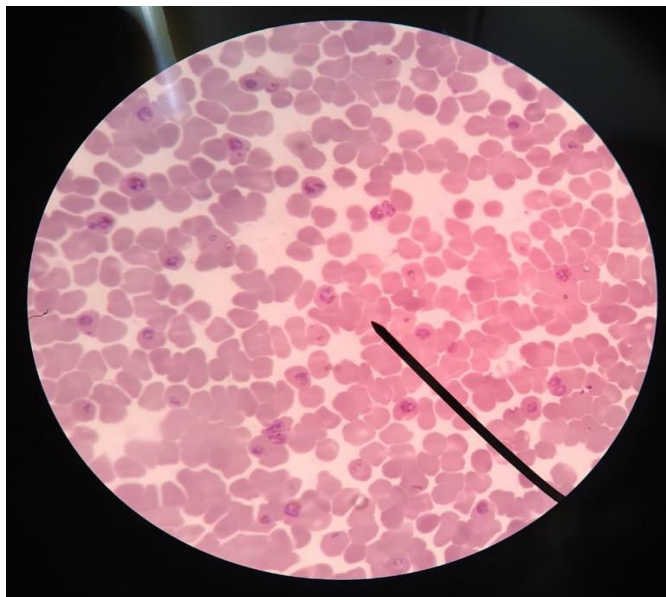
Os testes *in vitro* impedem que os fatores externos possam influenciar na leitura dos dados, pois os parasitas são retirados do hospedeiro e cultivados em um ambiente experimental controlado. O *Plasmodium falciparum* (Figuras 2 e 3) é bastante utilizado para este tipo de teste, no qual é obtido de cultura celular preexistente, congelamento ou de pacientes parasitados. Em testes *in vitro*, é possível expor os parasitas a concentrações específicas de um determinado composto ou medicamento para avaliação inibitória, por exemplo. Analisar em que fase do ciclo do parasito o fármaco age de forma eficaz e a dose necessária.

Figura 3: Hemácia poli parasitada com trofozoíto de *Plasmodium falciparum*. Ensaio in vitro



Fonte: LABMAT

Figura 4: Diversos esquizontes de *Plasmodium falciparum*. Ensaio in vitro.



Fonte: LABMAT

3.2 Ensaio antimalárico in vitro

Este estudo foi conduzido a partir de pesquisa experimental realizada no Laboratório de Biologia da Malária e Toxoplasmose - LABMAT da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN. Usando cepa de *Plasmodium falciparum* 3D7 (sensível a cloroquina).

3.2.1 Lavagem de Sangue

Foi coletado em tubo com EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético) 10 mL de sangue de um doador voluntário (grupos sanguíneos A + ou O +), saudável e sem histórico de doenças crônicas. Foram, realizadas sucessivas a lavagens do sangue total com meio RPMI-1640 (meio com sais enriquecidos com aminoácidos e vitaminas utilizado para crescimento celular) centrifugado a 1800 rpm por 10 minutos. Após centrifugação, os tubos foram manipulados na cabine de segurança biológica de fluxo laminar com o auxílio de uma bomba de sucção e pipeta de pasteur para remover o plasma e a camada leucoplaquetária. Em seguida, foi

adicionado meio RPMI 1640 suplementado com 10% de plasma humano em uma proporção de 20% do volume do concentrado de hemácias.

Este concentrado de hemácias foi armazenado em geladeira a 4° C e retirado apenas minutos antes da manutenção da cultura.

3.2.2 Cultura de *Plasmodium falciparum*

Para cultura foi utilizado o *Plasmodium falciparum* cepa 3D7, cultivada usando o método de Trager e Jensen (1976) o qual estava inicialmente armazenado em nitrogênio líquido. Após o processo de descongelamento, a amostra com os parasitas foram mantidas a uma atmosfera com baixo nível de oxigênio (O₂) por meio de ventilação com mistura carbogênica na proporção de 5% de gás carbônico (CO₂), 3% de O₂ e 92% de nitrogênio (N₂), temperatura de 37 °C, hematócrito de 10% e meio de cultura RPMI1640 complementado. A manipulação da cultura foi realizada a cada 48 horas em cabine de segurança biológica com fluxo laminar de classe II (Figura 5), previamente higienizada com álcool 70% e com materiais esterilizados, antes da utilização da cabine a luz ultravioleta (UV) foi ligada e mantida por 25 minutos.

Figura 5: Cabine de segurança biológica classe II.



Fonte: Pachane equipamentos para laboratórios

3.2.3 Microteste

O teste foi realizado com diversas diluições do fármaco de interesse as Lignanas e diluições da Cloroquina como controle positivo. O fármaco utilizado, em forma de pó liofilizado, foi solubilizado com solução DMSO (Dimetilsulfóxido), um solvente que permite a penetração em membranas. Para dar início às diluições, foi necessário produzir uma “solução mãe” de 10mg/mL onde, a partir desta foram preparadas soluções de 1.000 µg/ml e 500µg/ml respectivamente.

A partir dessas soluções estoques, procedeu-se as diluições seriadas 1:2 (sete concentrações) variando de 50 µg/mL a 0,78 µg/mL em duplicata (Figura 6) para cada composto em meio RPMI complementado. Utilizou-se uma microplaca (96 poços) de polietileno de fundo chato, na qual 100 µL da cultura previamente sincronizada de *P. falciparum* 3D7 com predominância de anel e parasitemia de 1%

Para realização do controle positivo, foram realizadas também diluições seriadas usando a cloroquina. Foi suspenso 5mg de difosfato de cloroquina em 3 ml de água destilada, retirado 50µl da solução e diluído em 1,950 ml de RPMI, obtendo 2.500 mg/ml. Para o difosfato de cloroquina a diluição foi de 1:3 em duplicata.

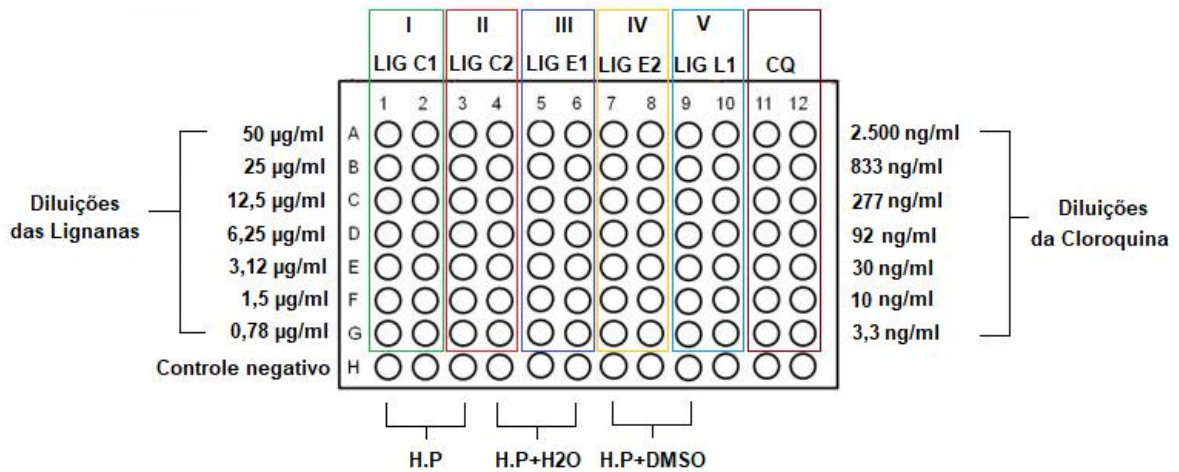
Para iniciar o teste foi colocado em um suporte plástico 19,5ml de meio completo, 100µl de sangue parasitado proveniente da cultura e 400µl de sangue lavado. Estes 100µl de sangue parasitado equivale a 1% das hemácias parasitadas na garrafa teste, a qual tinha 5% de parasitemia com plasmódios em forma de trofozoítos.

Na microplaca teste, após serem adicionados os parasitas, foram transferidas as soluções das placas de concentrações, tanto das lignanas como a da cloroquina. Como controle positivo temos as concentrações de cloroquina e como controle negativo, fila “H”, temos hemácias parasitadas em H1,H2 e H3, hemácias parasitadas com água destilada em H4,H5 e H6 e hemácias parasitadas com 1% DMSO em H7,H8 e H9 (Figura 6). Em seguida, a placa foi colocada na estufa à 37°C e armazenada por 48 horas para posterior leitura.

Após o período de incubação, foram realizados esfregaços de cada poço da microplaca e corados com panótico. A leitura de cada esfregaço é realizada com as laminas codificadas contando 10 campos, contabilizando o total de hemácias e

hemácias parasitadas. A partir disso, temos a porcentagem da parasitemia de cada poço e podemos avaliar se houve ou não inibição do crescimento do *Plasmodium*.

Figura 6: Exemplificação da microplaca teste.



Fonte: A autora

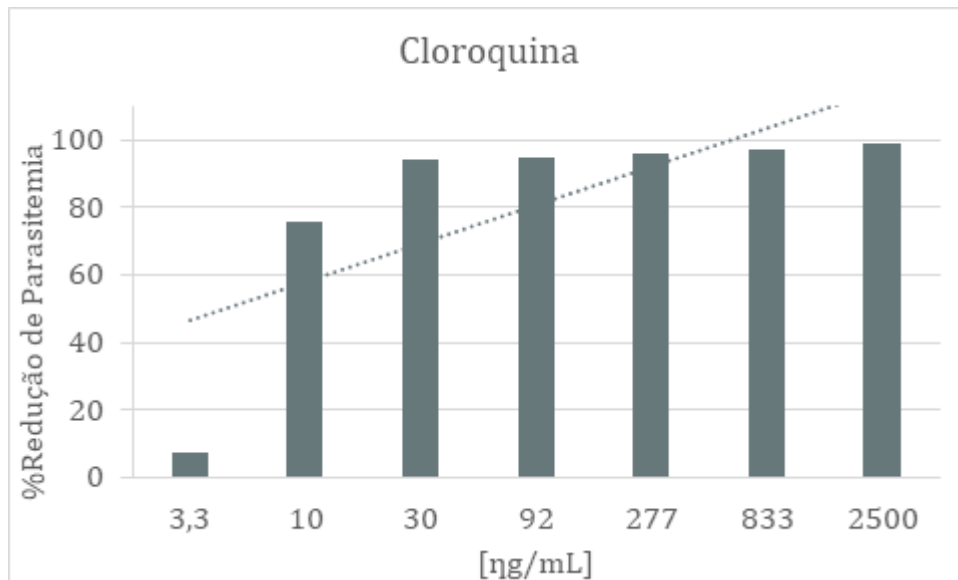
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a leitura das lâminas, foi avaliada a parasitemia de cada poço de acordo com as concentrações do fármaco em análise. O controle positivo, como já esperado, teve uma excelente ação antiplasmódica.

Como exemplificado no gráfico 1, a cloroquina é bastante eficaz mesmo em concentrações menores. Observamos que, com 10µg/ml de cloroquina, uma concentração baixa, houve redução de 76,6% da parasitemia e em sua maior concentração, 2.500ng/ml, houve 94,1% de redução.

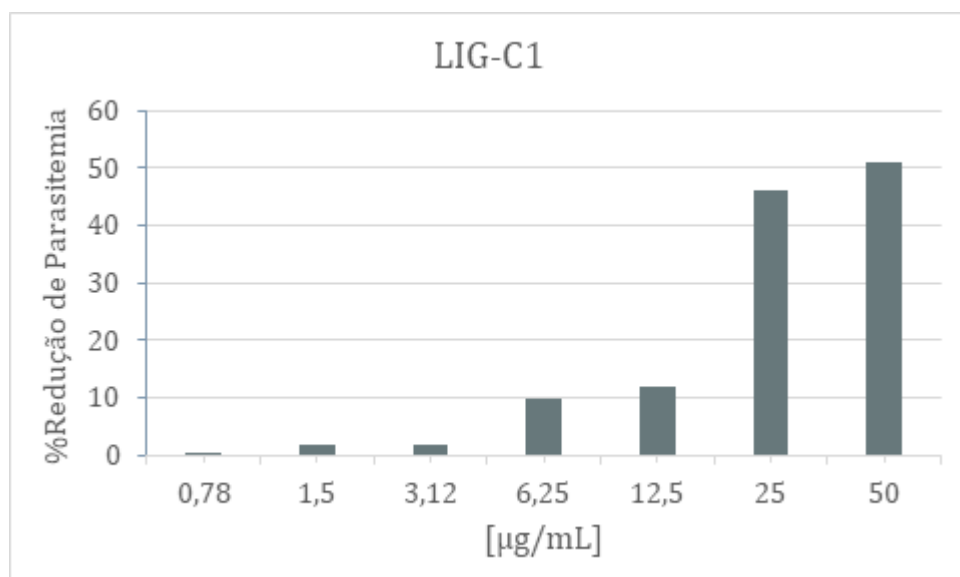
Porém, como citado anteriormente, a cloroquina, fármaco de escolha para o tratamento atualmente, não é 100% eficaz em todas as cepas de plasmodium, e com o passar do tempo a resistência de novas cepas será inevitável, o que ressalta a necessidade de pesquisas de novos agentes antimaláricos.

Gráfico 1: Ação inibitória da cloroquina no teste in vitro.



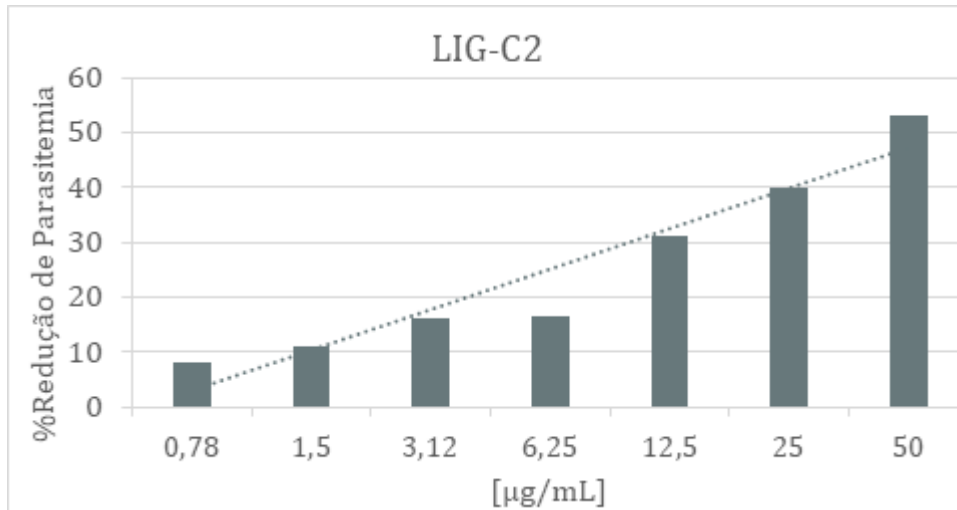
A LIG-C1, em concentrações menores, não houve inibição significativa. Em concentrações intermediárias já há uma redução leve da parasitemia, 6,25 μ g/ml do fármaco reduziu em 9,8%. Em sua maior concentração, 50 μ g/ml, podemos observar uma redução de 50,7%, o que evidencia uma real ação antiplasmódica.

Gráfico 2: Ação inibitória da lignana-C1 no teste in vitro.



No teste com LIG-C2, há uma linha crescente na sua atividade inibitória, com uma certa estabilização de redução nas concentrações 3,12µg/ml e 6,25µg/ml. Em sua concentração máxima houve inibição do crescimento da cultura em 53,2%.

Gráfico 3: Ação inibitória da lignana-C2 no teste in vitro.



Em LIG-E1 e E2, houve redução do crescimento da cultura desde concentrações baixas. Na E1, na concentração 3,12µg/ml houve redução de 36,5% e com o aumento da concentração foi reduzindo de forma linear a parasitemia, 39,0%, 39,1%, 42,3% e 53,2% na concentração mais alta, 50µg/ml.

LIG-E2 também apresentou ação inibitória em concentrações menores, de forma crescente, porém, em sua maior concentração não houve a redução desejada, de 50% da parasitemia. Na concentração 50µg/ml houve apenas redução de 39,8%.

Gráfico 4: Ação inibitória da lignana-E1 no teste in vitro.

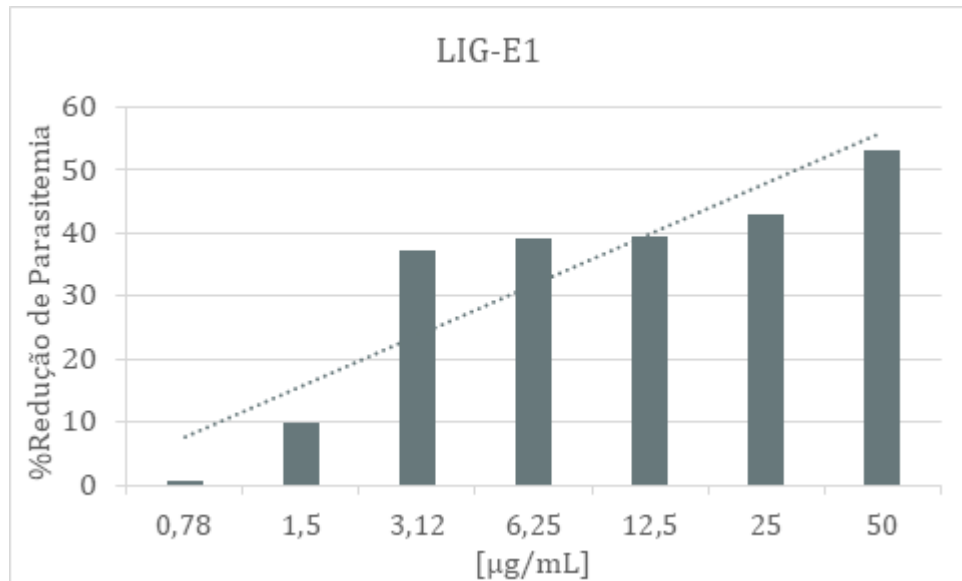
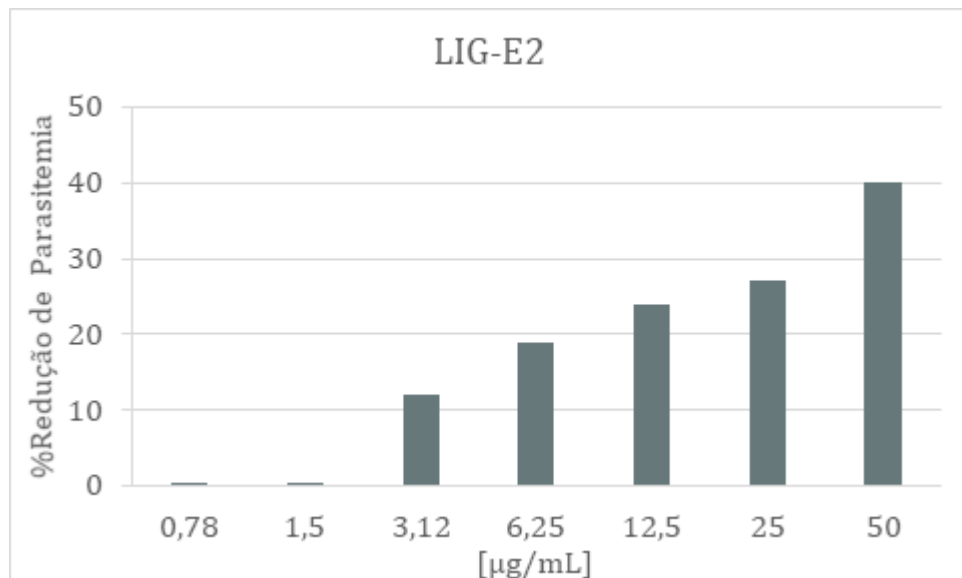
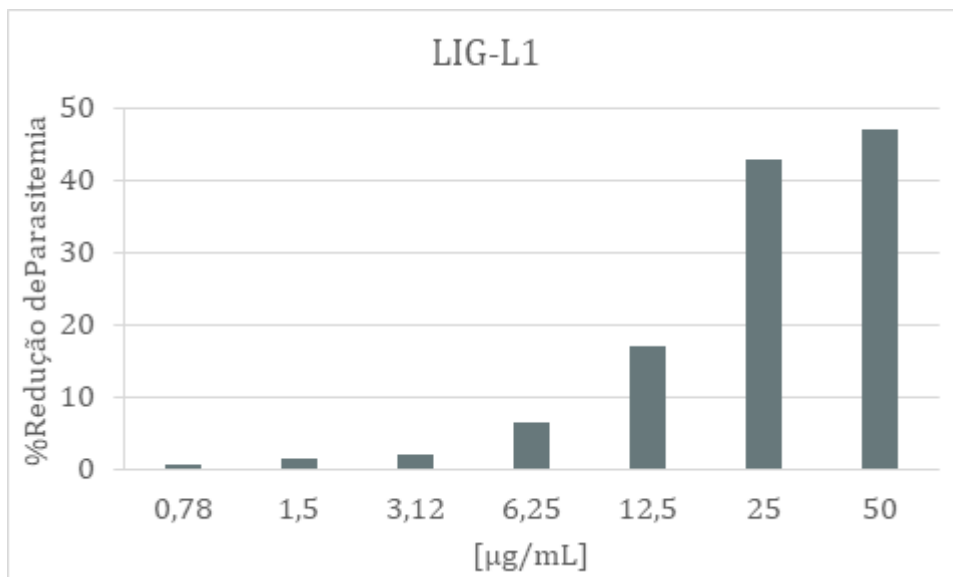


Gráfico 5: Ação inibitória da lignana-E2 no teste in vitro.



Nos testes com LIG-L1, em baixas e médias concentrações, não houve redução significativa da parasitemia, máximo de 6,4% em 12,5µg/ml. Nas duas concentrações mais elevadas, 25µg/ml e 50µg/ml, observamos ação inibitória, porém, nenhuma chegou a 50%, houve redução de 43,2% e 47,4%, respectivamente.

Gráfico 6: Ação inibitória da lignana-L1 no teste in vitro.



Dentre os compostos testados, alguns apresentaram atividade inibitória insuficiente, o que os desqualifica como compostos promissores para desenvolvimento de novos fármacos contra esta cepa específica. A cultura utilizada mostrou sensibilidade ao controle positivo cloroquina com valores de concentração inibitória muito baixa, 10µg/ml foram suficientes para reduzir a parasitemia em quase 80%. Entretanto, a LIG-E1 em concentração de 3,12µg/ml demonstrou excelente ação inibitória, reduzindo a parasitemia em mais de 40%, sendo excelente candidata à novas pesquisas.

Além da atividade antiplasmódica, as lignanas apresentam baixa atividade citotóxica (ANDRADE-NETO et al 2007), o que é excelente para posteriores estudos *in vivo* e de grande importância para desenvolvimento de novos fármacos.

As lignanas atualmente estão sendo testadas com diversos tipos de parasitos. Estudos com *Trypanosoma cruzi* sugerem que um dos mecanismos de ação do composto é alterar função mitocondrial e causar dano oxidativo, o que gera danos biológicos levando a morte do parasita (SOUZA, V.; NAKAMURA, C.; CORRÊA, A. 2012).

5 CONCLUSÃO

Podemos considerar que as lignanas testadas são parcialmente ativas nas maiores concentrações testadas. Sendo as LIG-C1, LIG-C2 e LIG-E1 as que tiveram melhores resultados na inibição do crescimento do *Plasmodium falciparum*.

Mudanças estruturais nas lignanas e associação com outros compostos poderão otimizar o seu efeito biológico.

6 REFERÊNCIAS

ADL, Sina M. et al. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. **The Journal Of Eukaryotic Microbiology**, [s.l.], v. 52, n. 5, p.399-451, out. 2005. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x>

ADL, Sina M. et al. The Revised Classification of Eukaryotes. **Journal Of Eukaryotic Microbiology**, [s.l.], v. 59, n. 5, p.429-514, set. 2012. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x>.

ALENCAR FILHO, Aristóteles Comte de et al. Malaria and Vascular Endothelium. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s.l.], p.165-169, 2014. <http://dx.doi.org/10.5935/abc.20140088>.

Aly, Ahmed S.I. ; Ashley M. Vaughan and Stefan H.I. Kappe. **Malaria Parasite Development in the mosquito and infection of the Mammalian host**. Annu Rev Microbiol. 2009; 63: 195–221.

ARIEY, F.; et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**, v. 505, p. 50–55, 2014.

ASHLEY, E. A.; et al. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. **The New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 5, p.411-23, 2014.

Brasil, Ministerio da Saude, **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**, 2010.

BRASIL, P.; ZALIS, M. G; PINA-COSTA, A.; SIQUEIRA, A. M. et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **The Lancet Global Health**, v. 5., 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS - SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO. (Org.). **Malária - Casos Confirmados Notificados No Sistema De Informação De Agravos De Notificação** - Brasil. 2015. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/malabr.def>

Brasil, ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE/OPS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE/OMS - **Doenças Transmissíveis e Análise de Situação de Saúde**. 2019.

BLOLAND, Peter B.; ETTLING, Mary; MEEK, Sylvia. Combination therapy for malaria in Africa: hype or hope? **Bull World Health Organ**, [s.l.], v. 12, n. 78, p.1378-1388,

jan. 2000. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2560651/pdf/11196485.pdf>

BUTLER, A. R.; KHAN, S.; FERGUSON, E. A **brief history of malaria chemotherapy**. J R Coll Physicians Edinb, [S.I.], v. 40, p. 172-177, 2010.

CDC, Centers For Disease Control And Prevention. **Malaria Diagnosis** (United States). 2015. Disponível em:
<https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/diagnosis.html>.

CDC, Centers For Disease Control And Prevention. **Malaria Treatment** (United States). 2017. Disponível em?
<http://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/treatment.html>.

CUI, Liwang et al. Antimalarial Drug Resistance: Literature Review and Activities and Findings of the ICEMR Network. The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene, [s.l.], v. 93, n. 3, p.57-68, 2 set. 2015. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.15-0007>. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4574275/>>.

CIRIMOTICH, C.M., et al . **Mosquito immune defenses against Plasmodium infection**. Dev. Comp. Immunol. [S.I.], v. 34,n. 4, p. 387-395, 2010

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 755-766, 2006

FREITAS, L.; CHAVES, G.; WANNMACHER, L.; OSORIO-DE-CASTRO, C. Malária não complicada por *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* no Brasil: evidências sobre fármacos isolados e associações medicamentosas empregados em esquemas terapêuticos recomendados pelo protocolo terapêutico oficial. **Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca**, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brasil. 2007

FREVERT, U. et al. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. **Journal Experimental Medicine**, v. 177, p. 1287–1298, 1993

LAURENTIZ, R.S.; BORGES, A.; LAURENTIZ, A.C.; SILVA, M.L.A., MARTINS, C.H.G. Avaliação da atividade antimicrobiana da lignana diidrocubebina extraída da Piper cubeba e de seus derivados semissintéticos. **Núcleo de Ciências Exatas e Tecnológicas**, Universidade de Franca. São Paulo. 2015

LIMA, R.; BARROS, A.; ALMEIDA, K.; PANTOJA, T. Prospecção fitoquímica do extrato vegetal de Piper tuberculatum (Piperaceae) e seu potencial antimicrobiano. **C&D-Revista Eletrônica da FAINOR**, Vitória da Conquista, v.11, n.2, p. 316-334, maio/ago. 2018

LEAL, L.F. Estudo químico e avaliação da atividade farmacológica e microbiológica de *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel. 2000. 158 f. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina. Dissertação de Mestrado em Química. 2000.

MUSA, Aniel Luna de Lima Chagas. Avaliação da atividade in vitro de frações do veneno de *Bothrops jararaca* contra *Plasmodium falciparum*. **Dissertação (Mestrado)** - Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental - PGBIOEXP da Universidade Federal de Rondônia - UNIR, 2018.

PACHANE EQUIPAMENTOS PARA LABORATÓRIOS (Org.). **CABINE DE SEGURANÇA BIOLÓGICA – CLASSE II A1 – LINHA 400**. Disponível em: <<http://pachane.com.br/site/product/linha400/>>. Acesso em: 01 jun. 2019.

SOUZA, V.; NAKAMURA, C.; CORRÊA. **Atividade Antichagásica de Lignanas e Neolignanas**. Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Química, São Carlos, São Paulo, Brasil. Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos. 2012

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, 2012. 768p.

Sturm, Angelika et al **Parasite for Delivery into Liver Sinusoids Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria** *Science* **313**, 1287 (2006)

TUN, K. M.; et al. Spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Myanmar: a cross-sectional survey of the K13 molecular marker. **Lancet Infect Diseases**, v. 15, p. 415–421, 2015

TRAGER, W; JENSEN, J.. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, [s.l.], v. 193, n. 4254, p.673-675, 20 ago. 1976. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.781840>. Disponível em: <http://science.sciencemag.org/content/193/4254/673.long>

Valter F. de Andrade-Neto,^{1,2} Tito da Silva,³ Lucia M. Xavier Lopes,^{3*} Virgílio E. do Rosário,⁴ Fernando de Pilla Varotti,¹ and Antoniana U. Krettli¹ **Antiplasmodial Activity of Aryltetralone Lignans from *Holostylis reniformis***. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, July 2007, p. 2346–2350

WHITE, N. J.; et al. Malaria. **Lancet**. v. 383, p. 723-735, 2014

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Observatory (GHO)** data. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/gho/malaria/en/>>.