



**FIOCRUZ**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina  
Investigativa**

**Tese de Doutorado**

Uso combinado da curcumina com o dissulfiram e seu metabólito, DETC  
na quimioterapia antimalárica experimental: novos rumos terapêuticos

**ALENE VANESSA AZEVEDO DOS SANTOS**

**Salvador – Brasil**  
**2013**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina  
Investigativa**

**Uso combinado da curcumina com o dissulfiram e seu metabólito, DETC, na quimioterapia  
antimalárica experimental: novos rumos terapêuticos**

**ALENE VANESSA AZEVEDO DOS SANTOS**

Professor-orientador: **Dr. Marcos André Vannier dos Santos**  
Professora-orientadora: **Dra. Milena Botelho Pereira Soares**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de  
Pós-graduação em Biotecnologia em  
Saúde e Medicina Investigativa para  
a obtenção do grau de Doutor.

Salvador – Brasil  
2013

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S237u Santos, Alene Vanessa Azevedo  
    Uso combinado da curcumina com o dissulfiram e seu metabólito, DETC na  
    quimioterapia antimalárica experimental: novos rumos terapêuticos / Alene Vanessa  
    Azevedo Santos - 2013.  
    134 f.; 30 cm.

    Datilografado (fotocópia).  
    Tese (doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo  
    Moniz, 2013.  
    Orientador: Prof. Dr. Marcos André Vannier dos Santos, Laboratório de Laboratório  
    de Biologia Parasitária.

    1. *Plasmodium falciparum*. 2. Quimioterapia. 3. Dietilditiocarbamato. 4.  
    Curcumina. 4. Antimaláricos. I.Título.

CDU 616.936:615.285

*Ando devagar  
Porque já tive pressa  
E levo esse sorriso  
Porque já chorei demais  
Hoje me sinto mais forte,  
Mais feliz, quem sabe  
Só levo a certeza  
De que muito pouco sei,  
Ou nada sei  
É preciso amor  
Pra poder pulsar  
É preciso paz pra poder sorrir  
É preciso a chuva para florir  
Penso que cumprir a vida  
Seja simplesmente  
Compreender a marcha  
E ir tocando em frente  
Todo mundo ama um dia,  
Todo mundo chora  
Um dia a gente chega  
E no outro vai embora  
Cada um de nós compõe a sua história  
Cada ser em si  
Carrega o dom de ser capaz  
E ser feliz*

*Almir Sater*

## *Dedicatória*

*Aos meus pais (Agostinho e Iaci) por serem o meu alicerce  
E ao Meu Esposo Jeferson Lelis por me apoiar sempre e ser o meu  
refúgio e porto seguro.*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por estar presente em todos os momentos da minha vida e nunca me deixar desistir e por me fazer acreditar sempre que tudo é possível.

Aos **meus pais**, por terem me ensinado o respeito à vida, a dar valor ao que realmente importa, a respeitar o ser humano independente de qualquer coisa e por me apoiarem e estarem sempre ao meu lado. Por serem pais MARAVILHOSOS! Os melhores pais do mundo!

Aos **meus irmãos (Alã e Alane) e minha cunhada (Simone)** pelas risadas, pelo apoio, conversas e discussões, afinal toda polêmica é sempre bem discutida! rrsr

Ao **meu eposo, Jeferson**, por me amar, respeitar e ser um verdadeiro companheiro. Por chamar atenção nos momentos importantes. Eu te amo!

Aos **meus sogros (Zélia e Fafá)** por cuidarem de mim como uma filha.

A **Lucas, Lico, Bia, Matheus, Ayla** por todos os momentos de distração que vocês me proporcionaram, por me fazerem esquecer os problemas com apenas um sorriso.

A **todos os meus amigos**, em especial a **Ane, Maísa, Si, Niu, Carol, Luce** que perto ou longe sempre apostaram e acreditaram muito em mim. E por me amarem incondicionalmente!

A **Dr. Marcos e Dra. Milena**, por terem aceitado esse desafio, pelo incentivo, pela orientação que me ofereceram, pela paciência, pelo apoio e por permitirem que esse sonho se realizasse.

A **Dr. Alberto Noronha-Dutra e a Dr. Marcus Oliveira** pelo incentivo e por me enriquecerem com seu conhecimento tão vasto sobre estresse oxidativo. Por serem sempre tão dispostos a ajudar e interessados em compreender e resolver os problemas.

A **Dra. Patrícia Veras, a Dra. Antoniana Krettli, a Dra. Silva Costa e a Dr. Eudes Veloso**, pelas contribuições que melhoraram consideravelmente o trabalho.

A **equipe do LETI**, pelos momentos maravilhosos que passamos juntos, por serem sempre tão dispostos a me ajudar.

A **Taís, Clarissa, Maria e Matheus**, equipe malária! Pelo apoio nos experimentos, discussões, risadas no fluxo, trevo de quatro folhas na garrafa. Pelos finais de semana trabalhando e permitindo que meu trabalho acontecesse.

A **Diego Menezes**, pela amizade e respeito. Por aceitar as nossas diferenças e por todos os momentos de diversão que me proporcionou.

A **Nanda, Aninha, Rafael Costa e Ciro**, por estarem sempre presentes, por toda ajuda, pela amizade e pelas conversas científicas e não científicas.

A **Rafinha Gomes** pela amizade, auxílio na execução de experimentos e pelas trocas de idéias e opinião.

A **Karla**, por sempre ter disponibilidade em ajudar, pelos 11 anos de convivência e por tudo que passamos juntas, tanto nos momentos de alegria como nos momentos não tão alegres.

A **todos os estudantes do LBP** por dividirmos um sonho em comum.

A **equipe Ciência na Estrada**, pelos momentos de conversas, principalmente na sala 157, distração e discussão que me proporcionaram.

A **Edson e Cris**, pelo apoio administrativo, pela amizade, competência e profissionalismo que sempre tiveram

A **Táise Caires** pela paciência e competência profissional à frente da Coordenação de Ensino de Biotecnologia.

A **Eliete**, por todos os momentos felizes que me proporcionou, por mostrar como ser uma profissional exemplar e pelo apoio técnico.

A **Dona Edna e Seu Flávio** pela apoio na organização e limpeza do laboratório.

Às **minhas células** que me ensinaram que nem sempre as coisas acontecem como e quando queremos.

Agências financiadoras: **FIOCRUZ, CAPES, FAPESB, CNPq, PDTIS.**

Azevedo-Santos, Alene Vanessa. Uso combinado da curcumina com o dissulfiram e seu metabólito, DETC, na quimioterapia antimalárica experimental: novos rumos terapêuticos. 139f. II. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

## Resumo

A malária é uma doença que acomete milhões de pessoas no mundo e está relacionada a países subdesenvolvidos. O uso de medicamentos continua sendo a forma mais eficaz de tratamento e controle da doença. Entretanto, vários parasitos vêm apresentando resistência contra os quimioterápicos disponíveis. O uso clínico frequente destes fármacos, por muitas décadas, em extensas áreas endêmicas favorecem a seleção de cepas resistentes, responsáveis pelos casos refratários, cada vez mais comuns. A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza que o tratamento da malária seja feito através da combinação de fármacos na tentativa de diminuir a seleção de cepas resistentes. No presente estudo, apresentamos a combinação de dois compostos que demonstraram efeito promissor na quimioterapia da malária, *in vitro* e *in vivo*. Estudos mostraram que um dos compostos, o dietilditiocarbamato de sódio (DETC) e o seu precursor, o dissulfiram foram capazes de reverter o fenótipo de resistência, inibindo a atividade de glicoproteínas P. Outra propriedade importante é a capacidade destes fármacos inibirem a atividade superóxido dismutase. As células infectadas, o protozoário *per se* e o plasma dos pacientes apresentam esta enzima, a qual constitui um fator de virulência e marcador de quadros graves de malária. Outro composto empregado, produto natural curcumina, testado em *Plasmodium* sp., demonstrou atividade antimalárica. Objetivamos avaliar se a combinação entre os dois compostos poderia ser uma alternativa na quimioterapia antimalárica. A curcumina, o DETC e o dissulfiram demonstraram ação antimalárica *in vitro* com IC<sub>50</sub> de 9,22, 35,5 e 20,2 µM, respectivamente. As combinações destes fármacos mostraram efeito antimalárico altamente sinérgico, com valor de Concentração Inibitória Fracionada (FIC) de 0,000175 entre o DETC e a curcumina e 0,00028 entre o dissulfiram e a curcumina, bem como nos isobogramas. As medidas de citotoxicidade revelaram a IC<sub>50</sub> do DETC na combinação de 63,10 µM, enquanto que na proliferação de *P. falciparum* *in vitro* a combinação com Curcumina a IC<sub>50</sub> do DETC obtido foi de 0,00621 µM, demonstrando que a combinação é cerca de 10.000 vezes mais tóxica para os parasitos do que para as células de mamífero, sem apresentar atividade hemolítica. O índice de seletividade calculado para a combinação foi de 10.161,03. A citotoxicidade do dissulfiram na combinação não apresentou um efeito dose-resposta, o que impossibilitou a determinação da IC<sub>50</sub> bem como o cálculo do índice de seletividade. A curcumina inibiu a formação de hemozoína na mesma faixa de concentração que a cloroquina e induziu a formação de espécies reativas de oxigênio, detectáveis por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo, nos parasitos. A análise ultraestrutural demonstrou alterações de compartimentos da via endocítica e de formação de hemozoína, corroborando as dosagens bioquímicas. Os experimentos em camundongos (*Mus musculus*) com *Plasmodium berghei* demonstraram que os dois fármacos tiveram atividade antimalárica inferior a da cloroquina, mas a combinação Curcumina-DETC teve atividade aumentada (mais de 40% de promoção da sobrevivência), aproximando-se da atividade da cloroquina. Estes resultados sugerem que combinações de curcumina com DETC podem constituir promissoras alternativas terapêuticas na malária humana.

**Palavras-chave:** *Plasmodium falciparum*, quimioterapia, dietilditiocarbamato de sódio, curcumina

Azevedo-Santos, Alene Vanessa. Combined use of curcumin with disulfiram and DETC in experimental antimalarial chemotherapy: Therapeutic new paths. 139f. II. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

### **Abstract**

Malaria is a disease affecting millions of people worldwide and is associated to underdeveloped countries. The use of medication remains the most effective treatment and control of the disease. However, many parasites are showing resistance against the chemotherapeutic available. The frequent clinical use of these drugs for many decades, in large endemic areas has favored the selection of resistant strains, responsible for increasingly common refractory cases. The World Health Organization (WHO) recommends that malaria treatment to be carried out through a combination of drugs in order to reduce the selection of resistant strains. In this study, we employed a combination of two drugs already tested in humans for a long time, which showed promising effects in chemotherapy of malaria both *in vitro* and *in vivo*. One of the compounds, sodium diethyldithiocarbamate (DETC) was tested in models of malaria and has a property very relevant to this infection, as it is able to revert the resistance phenotype by inhibiting the activity of P-glycoproteins. Another property of major importance is the ability of the drug to inhibit superoxide dismutase activity. Cells infected with the protozoan *per se* and plasma of patients exhibit this enzyme, which is a virulence factor and marker of severe malaria. The other compound used is the natural product curcumin has been tested in *Plasmodium* sp. and has demonstrated considerable antimalarial activity. Curcumin, DETC and disulfiram showed antimalarial activity *in vitro* with IC<sub>50</sub> of 9,22, 35,5 and 20,2 µM, respectively. Combinations of these drugs showed highly synergistic antimalarial effect, as demonstrated by the value of Fractional Inhibitory Concentration (FIC) of 0.000175 and 0,00028 disulfiram with curcumin and isobolograms plotting. The measures of cytotoxicity, as measured via incorporation of [H<sup>3</sup>] thymidine by murine splenocytes revealed IC<sub>50</sub> of DETC the combination of 63,10 µM, whereas the proliferation of *P. falciparum in vitro* curcumin combination with the IC<sub>50</sub> of DETC obtained was 0,00621 µM, showing that the combination is over 10,000 times more toxic to the parasites than for mammalian cells without showing hemolytic activity. Disulfiram combined with curcumina does not present a dose response curve. The selectivity index was calculated for the combination of 10.161,03. Curcumin inhibited the formation of hemozoin in the same concentration range as chloroquine and induced the formation of reactive oxygen species in intracellular parasites, detectable by fluorescence microscopy and flow cytometry. The ultrastructural analysis showed changes in compartments of endocytic pathway and formation of hemozoin, corroborating the biochemical measurements. The experiments conducted *in vivo*, using the infection of mice (*Mus musculus*) by *Plasmodium berghei* showed that the two drugs had antimalarial activity below the positive control with chloroquine, but the combination Curcumin-DETC had increased activity (over 40% survival promotion), approaching the activity exerted by chloroquine. These results suggest that combinations of curcumin with DETC may comprise a promising therapeutic alternative for human malaria.

Key-words: *Plasmodium falciparum*, chemotherapy, sodium diethyldithiocarbamate, curcumin

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Evolução clínica da malária, fatores parasitários, do hospedeiro, geográficos e sociais	19
Figura 2	Maturação e replicação de esporozoítos de <i>Plasmodium falciparum</i> nos hepatócitos	20
Figura 3	Liberação dos merossomos na corrente sanguínea do hospedeiro	22
Figura 4	Ciclo da vida do <i>Plasmodium</i> sp	24
Figura 5	Revisão histórica da malária no Brasil, 1960 a 2008	26
Figura 6	Risco de Transmissão da malária no Brasil	27
Figura 7	Antimaláricos em uso e em desenvolvimento	28
Figura 8	Estrutura química da Curcumina	30
Figura 9	<i>Curcuma longa</i>	30
Figura 10	Atividades biológicas da curcumina	32
Figura 11	Estrutura química do dissulfiram e do dietilditiocarbamato de sódio (DETC)	33
Figura 12	Fontes de estresse oxidativo no <i>P. falciparum</i>	36
Figura 13	Determinação da IC <sub>50</sub> dos compostos em culturas de <i>Plasmodium falciparum</i>	48
Figura 14	Determinação das IC <sub>50</sub> dos compostos combinados em culturas de <i>P. falciparum</i>	50
Figura 15	Avaliação de efeitos sinérgico para variadas combinações entre os compostos	52
Figura 16	Determinação das IC <sub>50</sub> dos compostos sobre esplenócitos murinos	54
Figura 17	Determinação das IC <sub>50</sub> dos compostos combinados sobre esplenócitos murinos	56
Figura 18	Avaliação do efeito (citotóxico/citostático) produzido pelas drogas em culturas de <i>P. falciparum</i>	59
Figura 19	Avaliação do efeito hemolítico dos compostos	61
Figura 20	Efeito hemolítico da combinação dos compostos	62
Figura 21	Avaliação dos alvos celulares das drogas	64
Figura 22	Microscopia eletrônica de transmissão de hemácias infectadas por <i>Plasmodium falciparum</i> tratadas com dissulfiram	65
Figura 23	Microscopia eletrônica de transmissão de hemácias infectadas por <i>Plasmodium falciparum</i> tratadas com disulfiram	66
Figura 24	Hemácias infectadas por <i>P. falciparum</i> tratadas com a IC <sub>50</sub> do DETC por 24 horas	67
Figura 25	Hemácias infectadas por <i>P. falciparum</i> tratadas com a IC <sub>50</sub> da curcumina	68
Figura 26	Hemácias infectadas por <i>P. falciparum</i> tratadas com a IC <sub>50</sub> da curcumina	69
Figura 27	Hemácia infectada com <i>P. falciparum</i> tratada com a combinação das drogas dissulfiram e curcumina (IC <sub>50</sub> ) durante 24 horas	70

Figura 28	Microscopia eletrônica de transmissão de hemácia infectada por <i>Plasmodium falciparum</i> tratada com a IC <sub>50</sub> do DETC combinada com a IC <sub>50</sub> da curcumina, por 24 horas	71
Figura 29	Avaliação do efeito dos compostos sobre a inibição da hemozoína <i>in vitro</i>	73
Figura 30	Avaliação da inibição da formação de hemozoína com extrato do parasito	75
Figura 31	Avaliação da presença de espécies reativas ao oxigênio após o tratamento com as drogas	77
Figura 32	Deteção de espécies reativas ao oxigênio pela sonda DHE em hemácias infectadas com <i>P. falciparum</i> tratadas com DETC e com a curcumina	78
Figura 33	Deteção de espécies reativas ao oxigênio pela sonda DHE em hemácias infectadas com <i>P. falciparum</i> tratadas com DETC e com a curcumina co-incubadas com o NAC (N-acetil-cisteína)	79
Figura 34	Quantificação dos níveis de EROs pela sonda DHE através da citometria de fluxo	81
Figura 35	Deteção de superóxido mitocondrial em <i>P. falciparum</i>	83
Figura 36	Avaliação da peroxidação lipídica produzida pelo tratamento com as drogas	85
Figura 37	Avaliação do efeito protetor do antioxidante Urato	87
Figura 38	Avaliação do efeito das drogas sobre a sobrevivência de camundongos infectados com <i>P. berghei</i>	89
Figura 39	Avaliação da sobrevivência cumulativa de camundongos infectados com <i>P. berghei</i> tratados com curcumina (A), DETC (B) e a combinação delas (C)	90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Índice de seletividade dos compostos em combinação	57
----------	--	----

## LISTA DE ABREVIações

<b>ABC</b>	Transportadores dependentes de ATP
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>CQ</b>	Cloroquina
<b>CSP</b>	Proteína circun-esporozóita
<b>CURC</b>	Curcumina
<b>DHE</b>	Dihidroetidina
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DDT</b>	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
<b>DETC/DDC</b>	Dietilditiocarbamato de sódio
<b>DSS</b>	Dissulfiram
<b>ERO</b>	Espécies reativas ao oxigênio
<b>FAO/WHO</b>	Food and Agriculture Organization/World Health Organization
<b>FCCP</b>	Carbonil cianeto 4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FIC</b>	Concentração Inibitória Fracionada
<b>GSH</b>	Glutathiona reduzida
<b>HEMOBA</b>	Hemocentro da Bahia
<b>HEPES</b>	4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico ácido
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração Inibitória 50%
<b>IS</b>	Índice de Seletividade
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Fosfato de Potássio Bibásico
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato de Potássio Monobásico
<b>KCl</b>	Cloreto de Potássio
<b>MDR</b>	Resistência múltipla a drogas

<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>MS</b>	Ministerio da Saúde
<b>N</b>	Núcleo
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Fosfato de Sódio bibásico
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato de Sódio Monobásico
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de sódio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sódio
<b>NHPD</b>	Natural Health Products directorate
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Superóxido
<b>PBS</b>	Tampão Fosfato Salina
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>Pgp</b>	P glicoproteína
<b>RE</b>	Retículo Endoplasmático
<b>ROS</b>	Substâncias Reativas ao Oxigênio
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sódio
<b>SIDA</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>SIVEP</b>	Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica
<b>SOD Cu/Zn</b>	CobreZinco superóxido dismutase
<b>SP</b>	Pirimetamina/sulfadoxina
<b>SVS</b>	Secretaria de Vigilância em Saúde
<b>TBA</b>	Ácido Tiobarbitúrico
<b>TBARS</b>	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
<b>TOCO</b>	Tocoferol
<b>TRAP</b>	Proteína adesiva relacionada à trombospondina
<b>VD</b>	Vacúolo Digestivo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>19</b>
2.1 Malária Humana e Ciclo dos Parasitos	19
2.1.1 Epidemiologia da Malária	25
2.1.2 Tratamento	28
2.2 Curcumina	30
2.3 Dissulfiram e DETC	33
2.4 Estresse Oxidativo	34
<b>3. HIPÓTESE</b>	<b>38</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>38</b>
4.1 Objetivo Geral	38
4.2 Objetivos específicos	38
<b>5. METODOLOGIA</b>	<b>39</b>
5.1 Drogas utilizadas	39
5.2 Aprovação ética para o uso de material humano	39
5.3 Cultivo contínuo da fase eritrocítica de <i>P. falciparum</i>	39
5.4 Sincronização das culturas para utilização nos testes <i>in vitro</i>	39
5.5 Concentração das células infectadas para aumento da parasitemia utilizando percoll	40
5.6 Preparo das placas para os ensaios de quimioterapia	40
5.7 Testes de proliferação de <i>P. falciparum</i> através da incorporação de hipoxantina tritiada	40
5.8 Determinação da citotoxicidade em esplenócitos murinos	41
5.9 Separação do <i>P. falciparum</i> da hemácia	41
5.10 Determinação da IC <sub>50</sub> das drogas	41
5.11 Ensaio de hemólise	42
5.12 Avaliação do efeito citotóxico/citostático dos compostos sobre culturas de <i>P. falciparum</i>	42
5.13 Avaliação do sinergismo entre os compostos pela metodologia da Concentração Inibitória Fracionada (FIC)	42
5.14 Índice de seletividade	43
5.15 Avaliação das interações farmacológicas	43

5.16	Avaliação da produção de peroxidação lipídica	43
5.17	Microscopia eletrônica de transmissão	44
5.18	Detecção de espécies reativas ao oxigênio pela microscopia de fluorescência	44
5.19	Detecção de superóxido mitocondrial	44
5.20	Detecção citométrica de espécies reativas ao oxigênio	45
5.21	Quantificação de hemozoína <i>in vitro</i>	45
5.22	Dosagem de hemozoína em extrato de <i>P. falciparum</i>	45
5.23	Aprovação ética para uso de animais de laboratório	46
5.24	Avaliação da sobrevivência de camundongos Swiss Webster infectados por <i>P. berghei</i> tratados com diferentes concentrações dos compostos	46
5.25	Análise estatística	46
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>47</b>
6.1	Determinação da IC <sub>50</sub> da curcumina, dissulfiram e DETC sobre culturas de <i>P. falciparum</i>	47
6.2	Determinação das IC <sub>50</sub> dos compostos combinados em culturas de <i>P. falciparum</i>	49
6.3	Avaliação de efeitos sinérgico para variadas combinações entre os compostos	51
6.4	Determinação das IC <sub>50</sub> dos compostos sobre esplenócitos murinos	53
6.5	Determinação das IC <sub>50</sub> dos compostos combinados sobre esplenócitos murinos	55
6.6	Avaliação do índice de seletividade (IS) dos compostos em combinação	57
6.7	Avaliação do efeito (citotóxico/citostático) produzido pelas drogas em culturas de <i>P. falciparum</i>	58
6.8	Avaliação do efeito hemolítico dos compostos	60
6.9	Avaliação dos alvos celulares das drogas	63
6.10	Avaliação do efeito dos compostos sobre a inibição da hemozoína <i>in vitro</i>	72
6.11	Avaliação da inibição da formação de hemozoína com extrato do parasito	74
6.12	Avaliação da presença de espécies reativas ao oxigênio após o tratamento com as drogas	76
6.13	Quantificação dos níveis de EROs pela sonda DHE através da citometria de fluxo	80
6.14	Detecção de superóxido mitocondrial em <i>P. falciparum</i>	82
6.15	Avaliação da peroxidação lipídica produzida pelo tratamento com as drogas	84
6.16	Avaliação do efeito protetor do antioxidante Urato	86
6.17	Avaliação do efeito das drogas sobre a sobrevivência de camundongos infectados com <i>P. berghei</i>	88
<b>7.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>91</b>

<b>8. CONCLUSÃO</b>	<b>104</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>105</b>
<b>10. APÊNDICE</b>	<b>126</b>
A.1 Colocalização das células positivas para espécies reativas ao oxigênio por fluorescência com contraste interferencial	126
A.2 Histogramas e dot plot da detecção citométrica de espécies reativas ao oxigênio	128
A.3 Histogramas e dot plot da detecção de superóxido mitocondrial por citometria de fluxo	132

## **1.INTRODUÇÃO**

---

A malária é uma doença infecciosa grave, causada por parasitas do gênero *Plasmodium*. Existem relatos da doença desde 2700 a.C. em escritos do Egito e China. Dentre as doenças infecciosas, é a que teve maior impacto na história mundial, influenciando inclusive guerras, movimentos populacionais, o crescimento e declínio de nações (GARCIA, 2010).

Existem cinco espécies que acometem o homem, são elas: *Plasmodium falciparum*, o mais comum e o que causa o maior número de mortes; *Plasmodium vivax*, responsável por 77% das infecções nas Américas; *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* (PAHO, 2007) e, recentemente, foi descrita infecção natural de seres humanos pelo *P. knowlesi* (JONGWUTIWES *et al.*, 2004; SINGH *et al.*, 2004), uma espécie que até então era descrita apenas como parasita de primatas não humanos.

Em todos os continentes existem regiões com risco potencial de transmissão da malária, mas as regiões tropicais são as mais afetadas pela doença. Ela é endêmica em 90 países, nos quais vivem aproximadamente 2,57 bilhões de pessoas. Isso representa 37% da população mundial em áreas de risco. Destas, 1,13 bilhões vivem em áreas de transmissão instável, os outros 1,44 bilhões vivem em áreas onde a transmissão é estável (GETHING *et al.*, 2011). O grau de endemicidade é bastante diverso, chegando a variar dentro de uma mesma região. Baseado na taxa de endemicidade, as faixas etárias mais afetadas são diferentes. Em regiões onde as taxas são altas, os principais acometidos são crianças com menos de 5 anos de idade; já em regiões onde a taxa é baixa, a doença acomete todas as faixas etárias (MILLER *et al.*, 1994).

Até então, não existe vacinação para esta enfermidade e, devido a isso, a terapia baseada em medicamentos continua sendo a melhor opção para o tratamento e controle. A quimioterapia da malária está direcionada, principalmente, contra as formas eritrocíticas do parasito (KAUR *et al.*, 2010).

As drogas quinolónicas são, historicamente, as mais importantes introduzidas no combate à malária (KAUR *et al.*, 2010). Os quimioterápicos à base de quinolinas são bases fracas, anfifílicas, que rapidamente penetram no eritrócito infectado e se acumulam no interior do

vacúolo digestivo do parasito (compartimento ácido) (YAYON, CABANTCHIK e GINSBURG, 1984). Após o acúmulo, ocorre rápida protonação da base, elevando o pH do vacúolo (GEARY, JENSEN e GINSBURG, 1986). A elevação do pH vacuolar inativa as enzimas e impede a síntese da hemozoína (pigmento malárico) (KROGSTAD, SCHLESINGER e GLUZMAN, 1985). Existe na literatura bastante discussão e controvérsias sobre o real mecanismo de ação da cloroquina.

Desde os anos 50 existem relatos de resistência do parasito ao tratamento com cloroquina. O uso frequente e prolongado de fármacos antimaláricos em extensas áreas endêmicas favorece a seleção de cepas resistentes, que ocasionam casos refratários, cada vez mais comuns. Essa resistência tem se tornado o principal problema no controle da doença. Resistência *in vivo* já foi reportada no uso de todos os medicamentos indicados para tratar a doença (FAROOQ e MAHAJAN, 2004). Atualmente, vem sendo descrita a redução da sensibilidade do *P. falciparum* ao tratamento com artemisinina (YEUNG *et al.*, 2008; DONDORP *et al.*, 2010).

O número de casos resistentes ao arsenal terapêutico disponível levou à necessidade da descoberta de novos compostos que apresentem atividade contra o *Plasmodium falciparum*. Outro grande problema é que nenhuma nova classe de droga foi introduzida para o tratamento desde 1996. A identificação e validação de novos alvos para o tratamento irão auxiliar na luta contra a resistência (DANDAPANI *et al.*, 2012). Atualmente, novos medicamentos estruturalmente distintos dos já existentes são o foco dos estudos para desenvolvimento de quimioterápicos (GUIGUEMDE *et al.*, 2012).

A OMS preconiza, para o tratamento desta enfermidade, o emprego de combinações de dois ou mais fármacos, com mecanismos de ação autônomos e diferentes alvos bioquímicos. Esse tipo de combinação terapêutica potencializa os efeitos sobre o parasito, diminuindo a probabilidade da seleção de indivíduos resistentes (OMS, 2006).

Atualmente, existe uma tendência ao uso de drogas já aprovadas pelo FDA (Food and Drug Administration) e OMS, bem como Ministério da Saúde e ANVISA, para novos usos na clínica (CHAVALI *et al.*, 2012). Entre estes fármacos, o disulfiram (e conseqüentemente o DETC ou dietilamina-N-carboditioato de sódio) tem atividade antiparasitária contra *Trypanosoma brucei* e

*T. rhodesiense* (WILLIAMSON e SCOTT-FINNIGAN, 1978); *Trypanosoma cruzi* (LANE *et al.*, 1996); *Leishmania* (proposto por NAMAZI, 2008 e demonstrado por KHOURI *et al.*, 2010) *Giardia lamblia* (NASH e RICE, 1998); *Trichuris muris* (HILL e FETTERER, 1997), *Plasmodium falciparum* (SCHEIBEL *et al.*, 1979; MESHNICK *et al.*, 1990) e capacidade de potencializar a ação antimalárica de cloroquina *in vivo* (DEHARO *et al.*, 2003).

A curcumina tem atividade antimalárica relatada (HADDAD *et al.*, 2011; AKHTAR *et al.*, 2012) e vem sendo empregada em combinação com drogas antimaláricas (MIMCHE *et al.*, 2011; ADITYA *et al.*, 2012; ISACCHI *et al.*, 2012; MARTINELLI *et al.*, 2008; NANDAKUMAR *et al.*, 2006). Ministrada com artemeter, pode evitar as recrudescências da infecção murina por *Plasmodium berghei* (VATHSALA *et al.*, 2012).

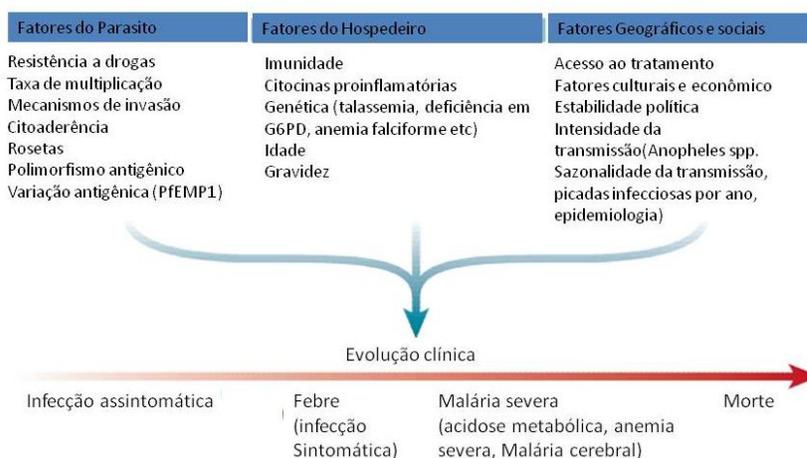
Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da combinação entre a curcumina, o dissulfiram e seu metabólito na sobrevivência de *Plasmodium falciparum* e estudar os possíveis mecanismos de ação envolvidos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MALÁRIA HUMANA E CICLO DOS PARASITOS

O *Plasmodium falciparum* e, em menor escala, o *P. vivax* são os principais agentes etiológicos causadores da malária humana. A malária é o produto da interação do parasito com o hospedeiro, e a sua evolução clínica depende da interação de características do próprio parasito, do hospedeiro, de fatores geográficos e sociais (figura 1). Para a compreensão da patogênese da doença é de fundamental importância o entendimento destas interações.

O processo de fisiopatogenia da doença é, em grande parte, desencadeado pela destruição eritrocitária, processo esse que coloca na circulação sanguínea componentes do parasito e da própria hemácia que irão deflagrar toda a resposta do hospedeiro.



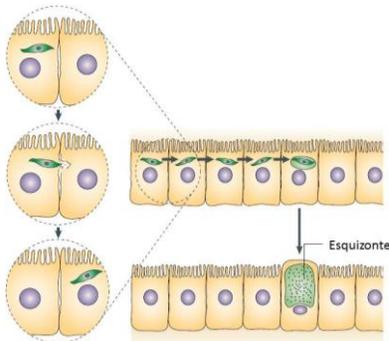
**Figura 1:** Evolução clínica da malária, fatores parasitários, do hospedeiro, geográficos e sociais. O resultado clínico de infecção por malária depende de muitos fatores associados ao parasita, ao hospedeiro, geográficos e sociais. Estes convergem, resultando numa gama de desfechos, a partir de uma infecção assintomática até doença grave e morte. Traduzido de MILLER e colaboradores 2002.

A infecção se inicia pela hematofagia da fêmea do anofelino, durante a qual ocorre a inoculação de esporozoítos presentes na saliva do inseto, na pele e na corrente sanguínea do hospedeiro.

Os mecanismos moleculares associados aos esporozoítas do *Plasmodium* são majoritariamente investigados em modelos de malária murina, como, por exemplo, em *P. berghei*. Entretanto, esses mecanismos provavelmente são semelhantes na malária humana (WIRTH e PRADEL, 2012).

O primeiro passo do desenvolvimento do *Plasmodium* no hospedeiro vertebrado é a transformação do esporozoíta (forma liberada na pele pela picada do inseto vetor) em merozoíta (forma que infeta as hemácias). Anteriormente, acreditava-se que essa transformação ocorria apenas no hepatócito. Entretanto, em 2010, GUEIRARD e colaboradores demonstraram que esporozoítas de *P. berghei* e *P. yoelii* podem sofrer esquizogonia exoeritrocítica completa não apenas no hepatócito, mas também na pele. Esses merozoítas possuem a capacidade de infectar hemácias e, como ocorre no fígado, também são liberados na forma de merossomos. Entretanto, estes merozoítas derivados da pele não contribuem de forma significativa para a infecção dos eritrócitos em condições normais.

Os esporozoítas que seguem o curso hepático atingem o órgão em aproximadamente 52 horas, dando início à fase exoeritrocítica hepática (AMINO *et al.*, 2006). Em 2002, MOTTA, HAFALLA e RODRIGUEZ mostraram que o esporozoíta, antes de infectar um hepatócito, migra por diversas outras células do hospedeiro (figura 2). Para que ocorra a ativação do parasito e consequentemente o processo de infecção, é necessária a migração do mesmo por diferentes células hepáticas. Esse contato do parasito com moléculas específicas no citosol do hepatócito culmina com a ativação de uma cascata de sinalização dependente de  $Ca^{2+}$ , fundamental para induzir a exocitose de moléculas do esporozoíta, processo necessário para a formação do vacúolo do parasito na célula hepática. A migração através das células hospedeiras é essencial para o estabelecimento da infecção, pois possibilita a formação do vacúolo no hepatócito.



**Figura 2:** Maturação e replicação de esporozoítos de *Plasmodium falciparum* nos hepatócitos. Uma vez que o esporozoíta (verde) cruza a camada sinusoidal e entra em um hepatócito, ele atravessa várias células hepáticas até se estabelecer em uma, onde o vacúolo parasitóforo é formado. Cada esporozoítos invade e se multiplica dentro de um hepatócito, formando o esquizonte, que é constituído por milhares de merozoítos. Traduzido de PRUDÊNCIO, RODRIGUEZ e MOTA, 2006.

O processo de invasão do hepatócito pelo esporozoíta acontece através da ligação da proteína circunsporozoita (CSP) a receptores proteoglicanos sulfatados de heparan (HSPGs) do hepatócito (FREVERT *et al.*, 1993). Essa interação ocorre entre oligossacarídeos altamente sulfatados semelhantes à heparina e dois domínios na proteína CSP, um na região II—mais da porção C terminal da região adesiva celular semelhante à trombospondina e o outro carregado positivamente acima da região I conservada. O sulfato de heparan do fígado apresenta um grau maior de sulfatação, quando comparado a outros tecidos. Isso pode explicar o reconhecimento do sulfato de heparan do fígado pela proteína CSP e o motivo do sítio de replicação inicial dos parasitos da malária no hospedeiro mamífero ser o fígado e não outros tecidos (YING *et al.*, 1997).

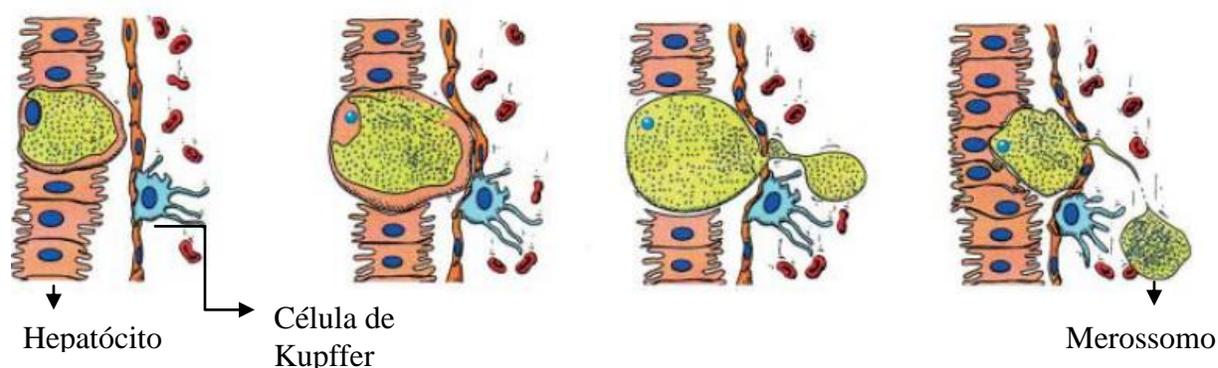
A partir da caracterização de diferentes espécies de proteoglicanos produzidos pelas diversas células hepáticas, foi demonstrado que a CSP e a TRAP (proteína adesiva relacionada à trombospondina) reconhecem proteoglicanos de superfície não somente nos hepatócitos, como também nas células de Kupffer e nas células dendríticas. Além disso, devido às células dendríticas produzirem oito vezes mais proteoglicanos sulfatados que os hepatócitos e incorporarem duas vezes mais sulfato na forma de sulfato de heparan, sugere-se que o sítio inicial de invasão dos esporozoítos de *Plasmodium* nos sinusóides hepáticos é a matriz de proteoglicanos produzidas por este tipo celular e se prolonga através das fenestrações endoteliais (PRADEL, GARAPATY e FREVERT, 2002; PRADEL, GARAPATY e FREVERT, 2004).

Nas infecções causadas por *P. vivax* e *P. ovale* existe a possibilidade de uma segunda esquizogonia, pois alguns esporozoítos permanecem quiescentes nos hepatócitos. Esses estágios são chamados de hipnozoítas (KROTOSKI *et al.*, 1982).

Os esporozoítos começam o processo de multiplicação transformando-se em merozoítos exoeritrocíticos. Em torno de 10 a 12 dias, os hepatócitos se rompem, liberando milhares de

merozoítos que irão, então, infectar os eritrócitos e começar o ciclo eritrocítico da doença. É nesta fase que ocorre a maior parte da sintomatologia (HALDAR *et al.*, 2007).

O processo de liberação dos merozoítos ocorre através da formação de merossomos (figura 3). Esses merossomos parecem agir como transportadores que garantem a liberação dos merozoítos na corrente sanguínea do hospedeiro, funcionando também como um escudo, impedindo a fagocitose dos mesmos, aumentando o número de parasitos vivos e consequentemente o número de hemácias invadidas (STUM *et al.*, 2006).



**Figura 3:** Liberação dos merossomos na corrente sanguínea do hospedeiro. A liberação do Plasmodium através de vesículas cheias de merozoítos (merossomos em verde), a partir de hepatócitos infectados. Os glóbulos vermelhos (vermelho) são separados a partir de hepatócitos pelo endotélio (laranja) e o espaço de Disse. A célula Kupffer está em azul. Retirado de STUM *et al.*, 2006.

O processo de invasão pelo parasito é similar entre as diferentes espécies de *Plasmodium spp.* É um processo complexo que é mediado por interações moleculares multifatoriais. O processo de invasão das hemácias pelos plasmódios ocorre através da interação do parasito com receptores de membrana das hemácias. No caso do *P. vivax* e do *P. knowlesi*, a interação ocorre com o receptor Duffy. Já o *P. falciparum* possui a capacidade de interagir com variados receptores, dentre eles as glicoforinas A, B e C e com a proteína Banda 3 (GAUR, MAYER e MILLER, 2004).

O parasito interage com receptores na membrana da hemácia e reorienta a região apical, formando junções e sinalizando. O parasito induz a formação de um vacúolo derivado da membrana plasmática da hemácia e com componentes parasitários e então penetra no vacúolo através de junções móveis. Três organelas do parasito estão principalmente envolvidas no processo de invasão: roptrias, micronemas e grânulos densos. Os receptores que medeiam o

processo de invasão no parasito estão localizados nos micronemas, na superfície celular e nas roptrias. A localização desses receptores dentro de organelas protege o parasito do processo de neutralização mediada por anticorpos. Como a liberação destes receptores a partir das organelas do complexo apical é posterior ao contato com as hemácias, isso acaba por limitar a exposição deles aos anticorpos (COWMAN e CRABB, 2006). Cada trofozoíto maduro, nas infecções por *P. vivax* e *P. falciparum*, é capaz de dar origem a aproximadamente 20 merozoítos, sendo que cada merozoíto pode infectar uma nova hemácia (MILLER, 2002).

Na hemácia, o parasito começa o processo de divisão celular assexuada (figura 4). O trofozoíto jovem em forma de “anel” é o estágio mais imaturo do parasito. O crescimento do trofozoíto é acompanhado pelo aumento significativo da taxa metabólica, a qual inclui glicólise, ingestão do citoplasma da célula hospedeira e proteólise da hemoglobina em aminoácidos. O final desta fase é marcado por múltiplas divisões nucleares, sem que ocorra a citocinese, resultando na formação do esquizonte. Cada esquizonte maduro apresenta em torno de 20 merozoítos, que são liberados após a lise das hemácias, invadindo, assim, novas células. Esse processo de liberação está relacionado à resposta imunológica e, conseqüentemente, ao aumento da temperatura corporal.

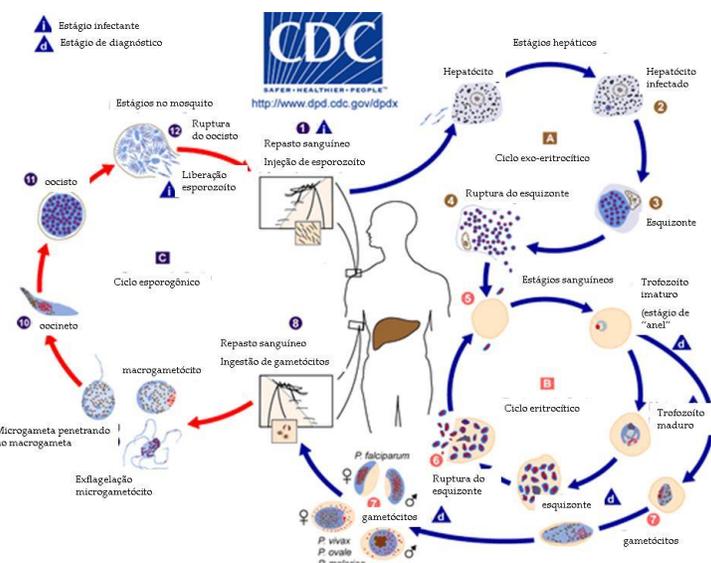
Após a liberação na corrente sanguínea, muitos merozoítos são destruídos pelo sistema imune e outros imediatamente invadem novas hemácias, começando um novo ciclo eritrocítico. Esses ciclos (invasão – multiplicação – liberação – invasão) têm duração média de 48 horas para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, e 72 horas para *P. malariae*. Tal periodicidade valeu à infecção as alcunhas de febres terçã e quartã, respectivamente. Após várias gerações eritrocíticas, alguns merozoítos se desenvolvem em gametócitos masculinos e femininos. Essas alterações podem ser pré-determinadas geneticamente, como resposta a algum estímulo específico ou a algum fator desconhecido (GRACIA, 2010).

Na corrente sanguínea do hospedeiro circulam as formas assexuadas (trofozoíto jovem, trofozoíto maduro, esquizonte e merozoíto) e as formas sexuadas (gametócitos masculinos e femininos) do parasito. Entretanto, na infecção causada pelo *P. falciparum*, somente são encontradas circulantes as formas gametocíticas e trofozoíto jovem. Isso ocorre, pois o *P. falciparum* possui a capacidade de aderir ao endotélio venoso (citoaderência) e assim escapar dos mecanismos imunológicos

dependentes do baço. Os eritrócitos infectados mantêm-se aderidos até ocorrer a formação e liberação dos merozoítos na corrente sanguínea, invadindo novas hemácias (MILLER, GOOD e MILON, 1994).

Quando os gametócitos são ingeridos pelo vetor (que é o hospedeiro definitivo), ocorre maturação dos gametas dentro do intestino do mosquito. Os microgametas (gametas masculinos) sofrem divisão nuclear, um processo chamado exflagelação. Eles rompem as hemácias, tornam-se móveis e penetram nos macrogametas (gametas femininos), formando o estágio fertilizado, zigoto. O zigoto alonga-se e torna-se móvel, passando a se chamar oocineto, atravessa a parede do tubo digestivo e fixa-se à face deste voltada à cavidade geral do corpo. Nesta fase ele se transforma em oocisto, no interior do qual são formadas centenas de esporozoítos. Os oocistos rompem-se, liberando esporozoítos que migram para as glândulas salivares de onde são introduzidos nos hospedeiros vertebrados, juntamente com a saliva, durante repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo.

O período pré-patente da doença é de 10 a 15 dias, e os sintomas incluem febre, vômitos, calafrios, cefaleia dentre outros. Uma característica dos acessos febris da malária é a intermitência de fases de calor, frio e suor (PAHO, 2007).



**Figura 4:** Ciclo da vida do *Plasmodium* sp. É possível observar o ciclo esporogônico, que ocorre no hospedeiro invertebrado. Bem como os ciclos exo-eritrocítico (ocorre no hospedeiro vertebrado, nas células hepáticas) e o ciclo eritrocítico (ocorrendo no hospedeiro vertebrado, nos eritrócitos). Traduzido do Centro de controle e prevenção de doenças (CDC).

### 2.1.1 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

Historicamente, a malária aparece como uma das principais doenças. Essa parasitose é considerada uma das responsáveis pela decadência do Império Romano, inclusive sendo denominada como “febre romana”. Antes de ser considerada uma “doença tropical”, esta infecção era endêmica em grande parte da Europa e América do Norte, incluindo o Canadá (OMS, 1998).

Durante o século passado, algumas epidemias de malária demonstraram os níveis de disseminação e mortalidade que a doença pode atingir (OMS, 1998). Na epidemia da Índia, em 1908, foram relatadas 100 milhões de pessoas infectadas, dentre as quais foi registrada aproximadamente 1 milhão de mortes (THE BRITISH MEDICAL JOURNAL, 1910). Na epidemia da União Soviética, em meio à 1ª Guerra Mundial e à Guerra Civil, registrou-se em torno de 10 milhões de casos, com aproximadamente 60 mil mortes por ano (BRUCE-CHWATT, 1959). No Nordeste do Brasil, a epidemia de 1938-39, causada pela invasão do *Anopheles gambiae* trazido da costa africana por embarcações, ocasionou 100 mil casos e o registro de 14 mil mortes (DEANE, 1986).

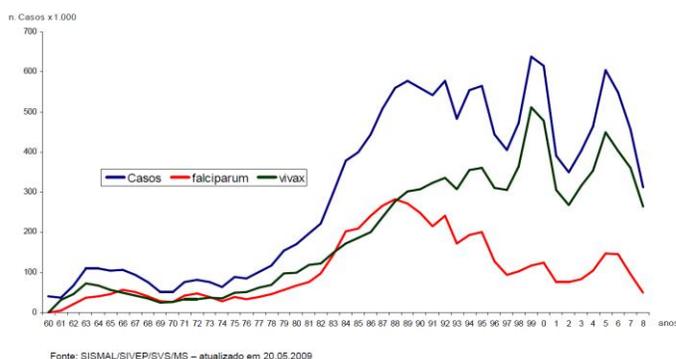
Dados da ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, de 199,8 apontam surtos epidêmicos em áreas como norte do Iraque e sul da Turquia, (1993-1995); no Tajiquistão, (1993-1994); no Azerbaijão, (1993-1994); no noroeste da Índia, particularmente Rajasthan, (1995 – 1996); no sul e leste da África (Zimbabwe, Botswana, Moçambique, Suazilândia e África do Sul, 1996). Em 2008 foram registrados no Maranhão mais de 4,757 mil casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Uma importante observação é que o impacto real das epidemias não depende somente da morbidade, mas também da saúde geral da população afetada. Muitas epidemias de malária coincidiram com períodos de fome, crise econômica e guerra, afetando populações empobrecidas e muitas vezes acometidas por outras doenças, impossibilitadas de conseguir tratamento adequado, agravando substancialmente a situação socioeconômica (OMS, 1998).

A malária é a doença parasitária com maior mortalidade entre humanos, ceifando a vida de uma criança a cada minuto, mais de 1.400 por dia. Segundo os últimos dados publicados pela OMS, ocorrem no mundo cerca de 216 milhões de casos de malária, doença que mata 655 mil pessoas por ano (OMS, 2012). Com as alterações do meio ambiente e o aquecimento global, estão sendo ampliadas as áreas de distribuição dos vetores de entidades nosológicas, como malária, dengue e febre amarela.

O grau de endemicidade varia entre países e até mesmo entre diferentes áreas no mesmo país. Em áreas de alta endemicidade, os indivíduos que mais sofrem com a doença são crianças com menos de 5 anos. Já em áreas de baixa endemicidade, a doença acomete indivíduos de diferentes faixas etárias (MILLER *et al.*, 1994).

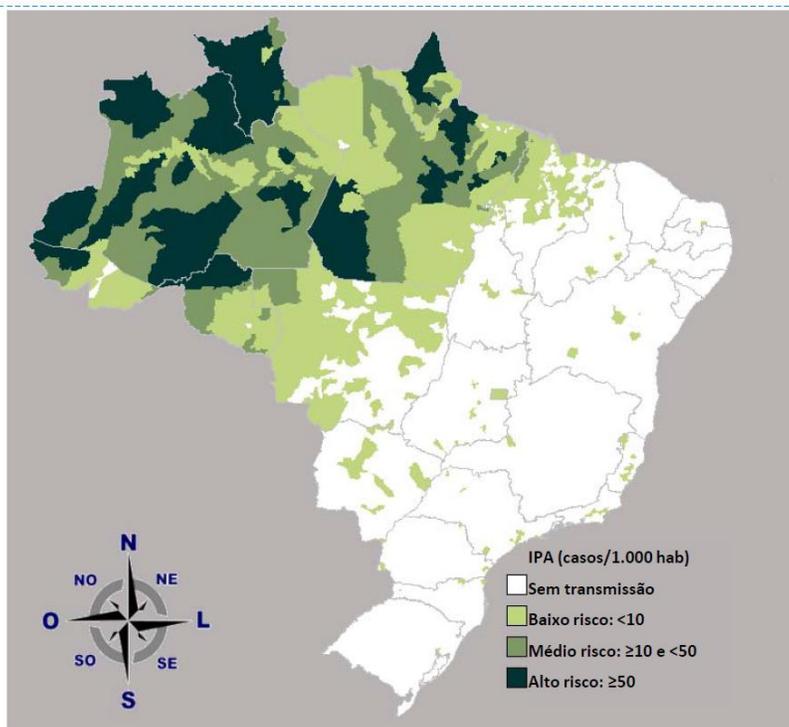
No Brasil, o registro da malária sempre ocorreu de forma esporádica. A partir de 1870, com o ciclo da borracha e com a abolição da escravatura, os números de casos subiram significativamente e no início do século XX praticamente todo território brasileiro era acometido pela doença. Nos anos 40 ocorriam entre 4 a 8 milhões de casos/ano, levando a aproximadamente 80 mil mortes. A partir do uso do DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano), da introdução da cloroquina e de campanhas de erradicação, os casos começaram a diminuir e, em 1970, foram registrados os menores índices até então, 52 mil casos de malária (figura 5). Com o desenvolvimento da região norte e conseqüentemente o estímulo da migração, o número de casos subiu novamente e, em 1999, foram registrados 636.649 casos na região amazônica (MARTINS *et al.*, 2011).



**Figura 5:** Revisão histórica da malária no Brasil, de 1960 a 2008. Número de casos /1000 habitantes no decorrer dos anos 60 até o ano de 2008.

Atualmente no Brasil existem 49 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco para a malária. Em 2010, ocorreram 330.000 casos e 72 óbitos. O risco de transmissão da malária (figura 6) está praticamente restrito à região da Amazônia legal (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins) (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2010).

## Risco de Transmissão de Malária - 2010

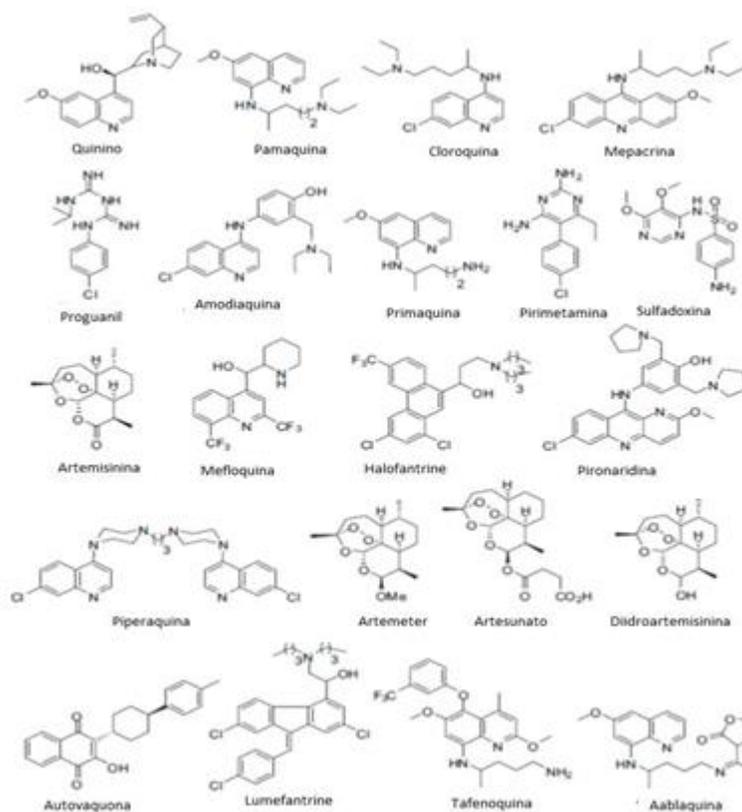


**Figura 6:** Risco de Transmissão da malária no Brasil no ano de 2010. Número de casos / 1000 habitantes distribuídos nos estados. Fonte: SIVEP\_malária/SVS/MS, 2010.

O combate à malária é uma prioridade para a OMS e para os países em desenvolvimento, particularmente de clima tropical, como o Brasil. Uma vez que não existe a disponibilidade de uma vacina eficaz, a única medida disponível continua sendo a terapêutica.

## 2.1.2 TRATAMENTO

A quimioterapia constitui a principal estratégia terapêutica da malária e uma das principais formas de controle da progressão da doença. Os grupos de antimaláricos mais utilizados no tratamento são (figura 7): (i) os quinolínicos obtidos da planta *Cinchona officinalis* e seus análogos; (ii) os inibidores da via do ácido fólico, usados em combinação, sendo os mais conhecidos o proguanil, as sulfas, a pirimetamina e o trimetropim; (iii) os derivados da planta *Artemisia annua* efetivos no tratamento da malária, dentre eles o artesunato e o arthemeter (FAROOQ e MAHAJAN, 2004).



**Figura 7:** Antimaláricos em uso e em desenvolvimento. Traduzido de KAUR *et al.*, 2010.

A quimioterapia da malária está direcionada para a destruição das formas assexuadas do parasito. O histórico do desenvolvimento de drogas antimaláricas teve início com o surgimento do quinino, primaquina, cloroquina (CQ) e mepacrina. Na década de 40, surgiram o proguanil e a amodiaquina. A pirimetamina, em 1950; a sulfadoxina, em 1960; a artemisinina, em 1970; e

algumas drogas foram introduzidas na década de 80, dentre elas a halofantrina e alguns derivados da artemisinina (KAUR *et al.*, 2010).

A cloroquina funciona apenas contra estágios assexuados do parasito, que degradam ativamente a hemoglobina (PETERS, 1970). O seu mecanismo de ação primário está associado a sua capacidade de entrar no vacúolo digestivo do parasito e acumular-se, interferindo assim com a biocristalização da hemozoína, levando o parasito à morte, devido ao acúmulo de heme tóxico (FITCH, 1998; SULLIVAN, 2002).

A cloroquina é uma base fraca e na sua forma não protonada atravessa a membrana do eritrócito infectado e do vacúolo digestivo do parasito, onde, uma vez protonada, se acumula, levando à alteração do pH e impedindo assim o processo de formação da hemozoína e levando ao aumento do estresse oxidativo, pois o pH ácido é fundamental para a formação do cristal (YAYON, CABANTCHIK E GINSBURG, 1984).

O extensivo e prolongado uso das drogas antimaláricas vem provocando o surgimento de cepas resistentes (BARNES *et al.*, 2008) e isto constitui um dos maiores obstáculos para reduzir a malária no mundo, o que nos mostra que sem políticas efetivas associadas ao tratamento não será possível atingir as metas de combate e controle da doença (BARNES *et al.*, 2008).

A dose dos medicamentos e o intervalo de administração são importantes, pois deverão fornecer concentrações suficientes para garantir a cura clínica do paciente. A utilização de doses subterapêuticas aumenta o risco de falha durante o tratamento e constitui uma pressão seletiva para fenótipos resistentes (BARNES *et al.*, 2008).

A presença de parasitas resistentes está associada ao aumento de infecções latentes. Além do mais, a presença de gametócitos na infecção primária leva a uma maior probabilidade de transmissão da doença. Mesmo em países que apresentam malária endêmica e resistência à cloroquina, esse medicamento continua sendo utilizado no tratamento (KOUYATÉ *et al.*, 2007).

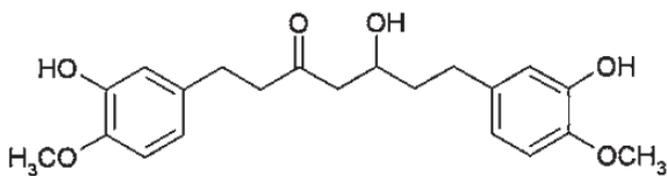
A glicoproteína P (Pgp) já foi descrita em *Plasmodium* spp. e está possivelmente relacionada à

resistência à cloroquina e à mefloquina (Borst & Ouellette, 1995). Em 1987, duas observações relacionaram a resistência à cloroquina com mecanismos mediados pela Pgp, KROGSTAD *et al.*, reportaram que o efluxo de cloroquina é aumentado em parasitas resistentes, e MARTIN *et al.*, demonstraram que o tratamento com verapamil, um clássico inibidor de Pgp, reverte a resistência à cloroquina.

A Pgp é uma bomba de efluxo dependente de ATP e localizada na membrana celular. Essa proteína realiza a extrusão de fármacos e conseqüentemente confere resistência a parasitos e células de mamíferos. A susceptibilidade a drogas é, muitas vezes, inversamente proporcional à expressão da Pgp (SAUNA, SHUKLA e AMBUDKAR, 2005).

## 2.2 CURCUMINA

A curcumina [(E, E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5dione] (figura 8) é um polifenol natural encontrado no rizoma da *Curcuma longa* (figura 9).



**Figura 8:** Estrutura química da Curcumina. STRIMPAKOS e SHARMA, 2008.

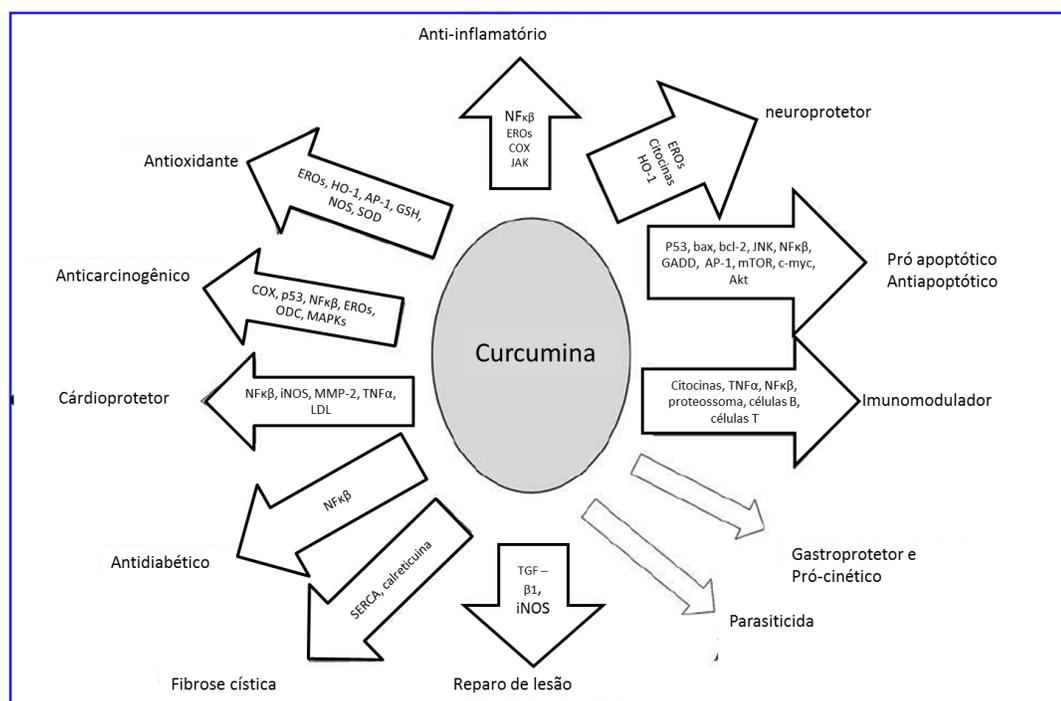


**Figura 9:** *Curcuma longa*. STRIMPAKOS e SHARMA, 2008.

O tubérculo e seus constituintes têm sido utilizados há séculos na medicina e culinária chinesas e manteve-se restrito ao continente asiático até o século 13, quando foram introduzidos no oeste por mercadores. Atualmente, várias autoridades em segurança da saúde, como a FDA (Food and Drug Administration) nos EUA, o NHPD ('Natural Health Products directorate') no Canadá e a FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization) já caracterizaram a curcumina como uma droga segura (STRIMPAKOS E SHARMA, 2008). Atualmente, existem 58 testes clínicos verificando as diversas atividades da curcumina ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), 2011).

As propriedades farmacocinéticas da curcumina têm sido estudadas em modelos murinos desde a década de 70. Vários estudos avaliaram vias de administração e doses, bem como rotas de eliminação da curcumina. Os estudos mostraram que a biodisponibilidade da curcumina após administração oral em camundongos é baixa. Ela sofre metabolismo intestinal e aparentemente sofre metabolismo de primeira passagem muito rápido, sendo excretada pela bile. A administração com outros agentes ou com diferentes veículos, como lipossomas, aumenta a biodisponibilidade sistêmica da curcumina (HOLDER *et al.*, 1978; RAVINDRANATH e CHANDRASEKHARA, 1981; SHOBA *et al.*, 1998).

A curcumina apresenta uma série de potenciais propriedades terapêuticas (figura 10), como antiinflamatória, antioxidante, antineoplásica, dentre outras, e diversos alvos moleculares e celulares. Isso possivelmente explica a atividade da substância para diversas doenças, incluindo o câncer (STRIMPAKOS E SHARMA, 2008).



**Figura 10:** Atividades biológicas da curcumina. Traduzido de STRIMPAKOS e SHARMA, 2008.

A curcumina é capaz de inibir bombas de efluxo ABC, revertendo o fenótipo MDR em células tumorais (SREENIVASAN *et al.*, 2012; XIAO *et al.*, 2010; GANTA E AMIJI, 2009; LABBOZZETTA *et al.*, 2009; ANGELINI *et al.*, 2008; LIMTRAKUL, 2007) e em *Candida albicans* (GARCIA-GOMES *et al.*, 2012). Uma vantagem do uso da curcumina em combinação com outros fármacos é que este produto natural é cardioprotetor (SWAMY *et al.*, 2012; SUNAGAWA *et al.*, 2011), hepatoprotetor (GIRISH E PRADHAN, 2012; WANG *et al.*, 2012; CERNÝ *et al.*, 2011), neuroprotetor (JIANG *et al.*, 2012; CANALES-AGUIRRE *et al.*, 2012; SOOD *et al.*, 2012; CAESAR *et al.*, 2012; ATAIE *et al.*, 2010), nefroprotetor (ROGERS *et al.*, 2012), pneumoprotetor (KALPANA e MENON, 2004) androprotetor (OGUZTURK *et al.*, 2012). Possui ainda efeito protetor contra o choque toxémico causado por *Staphylococcus* (SCHAEFERS *et al.*, 2012) e reverte efeitos hepatotóxicos da cloroquina (DATTANI *et al.*, 2010).

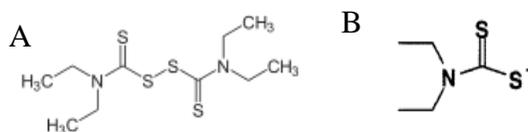
Alguns produtos naturais (SCHMIDT *et al.*, 2012 a, b; WRIGHT, 2010; COS *et al.*, 2006; SALEM e WERBOVETZ, 2006; TAGBOTO e TOWNSON, 2001), incluindo a curcumina (HADDAD *et al.*, 2011), constituem importantes fontes de agentes antiparasitários. Diferentes formulações e regimes de curcumina já apresentaram atividade antiparasitária contra

*Trypanosoma cruzi* (NAGAJYOTHI *et al.*, 2012), *Leishmania* spp. (ALVES *et al.*, 2003; SAMIM *et al.*, 2011), *Schistosoma mansoni* (ALLAM, 2009), *Giardia lamblia* (PÉREZ-ARRIAGA *et al.*, 2006; SAID *et al.*, 2012), *Cryptosporidium parvum* (SHAHIDUZZAMAN *et al.*, 2009), *Eimeria tenella* (KHALAFALLA *et al.*, 2011), *Opisthorchis viverrini* (PINLAOR *et al.*, 2009) e atividade antimalárica demonstrada (REDDY *et al.*, 2005). Entretanto, este composto não foi testado em combinação com tiocarbamatos no tratamento de qualquer infecção parasitária.

### 2.3 DISSULFIRAM e DETC

O dissulfiram (figura 11 A) foi utilizado no tratamento do alcoolismo nos últimos 50 anos. Seu mecanismo de ação é baseado na inibição da enzima aldeído desidrogenase. O dietilditiocarbamato é o primeiro metabólito do dissulfiram e um agente seletivo para carbamilação de proteínas nos grupos sulfidril (NAGENDRA *et al.*, 1997).

Os ditiocarbamatos demonstram atividade antioxidante e quelantes de metais (SOMERS *et al.*, 2000). Eles são reconhecidos por sua capacidade de inativar a enzima superóxido dismutase (SOD – Cu/Zn) em células eucarióticas, ligando-se ao cobre do sítio ativo da enzima (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).



**Figura 11:** Estrutura química do dissulfiram (A) e do dietilditiocarbamato de sódio (DETC) (B).

O DETC (figura 11 B) pode exercer diversas propriedades, como quelar íons metálicos, ferro e cobre e atuar como supressor de radicais livres. Este composto inibe a superóxido dismutase (SOD), promovendo danos mediados por superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), bem como liga-se a proteínas ricas em tiol, formando pontes disulfeto, inibindo, assim, possíveis mecanismos antioxidantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

A busca por novas terapias nos leva a abordar a possibilidade de sinergismo entre drogas, melhorando a eficácia delas mesmo em menores concentrações, diminuindo, portanto, os efeitos

colaterais de ambas. Neste sentido, sistemas reguladores de estresse oxidativo surgem como um possível alvo.

Além de possíveis efeitos sobre o superóxido dismutase, tanto o DETC (ARNELLE *et al.*, 1997; NINGARAJ *et al.*, 2001; RAHDEN-STARONÍ *et al.*, 2012) quanto o seu precursor, o dissulfiram (NAGENDRA *et al.*, 1994; van GORP *et al.*, 1997; BURKITT *et al.*, 1998; BALAKIREV e ZIMMER, 2001; KWOLEK-MIREK *et al.*, 2012), podem regular os níveis de glutatona reduzida (GSH), podendo, com isso, promover a ação antimalárica de drogas quinolónicas (DEHARO *et al.*, 2003).

LOO *et al.*, em 2004, demonstraram que os metabólitos do dissulfiram exercem efeitos inibitórios sobre a glicoproteína P, não relacionados à inibição da síntese da proteína, mas à interação do dissulfiram com duas cisteínas localizadas no sítio ligante de ATP da proteína. Quando os sítios de ATP estão acessíveis, o dissulfiram interage com as cisteínas, inibindo, assim, a hidrólise do mesmo e conseqüentemente inativando a proteína. Quando o sítio do ATP está protegido, o dissulfiram estimula a hidrólise do ATP pela Pgp.

O DETC já foi empregado em pesquisas com humanos como imunomodulador em pacientes com HIV/AIDS (REISINGER *et al.*, 1990) e em modelos de leishmaniose cutânea (KHOURI *et al.*, 2010).

## **2.4 ESTRESSE OXIDATIVO**

O sistema Redox desempenha um importante papel na sobrevivência de diversos parasitos no hospedeiro (TURRENS, 2004). Todos os organismos aeróbios são expostos a espécies reativas de oxigênio (EROs), como superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxila (OH) gerados através do seu próprio metabolismo (TURRENS, 2004).

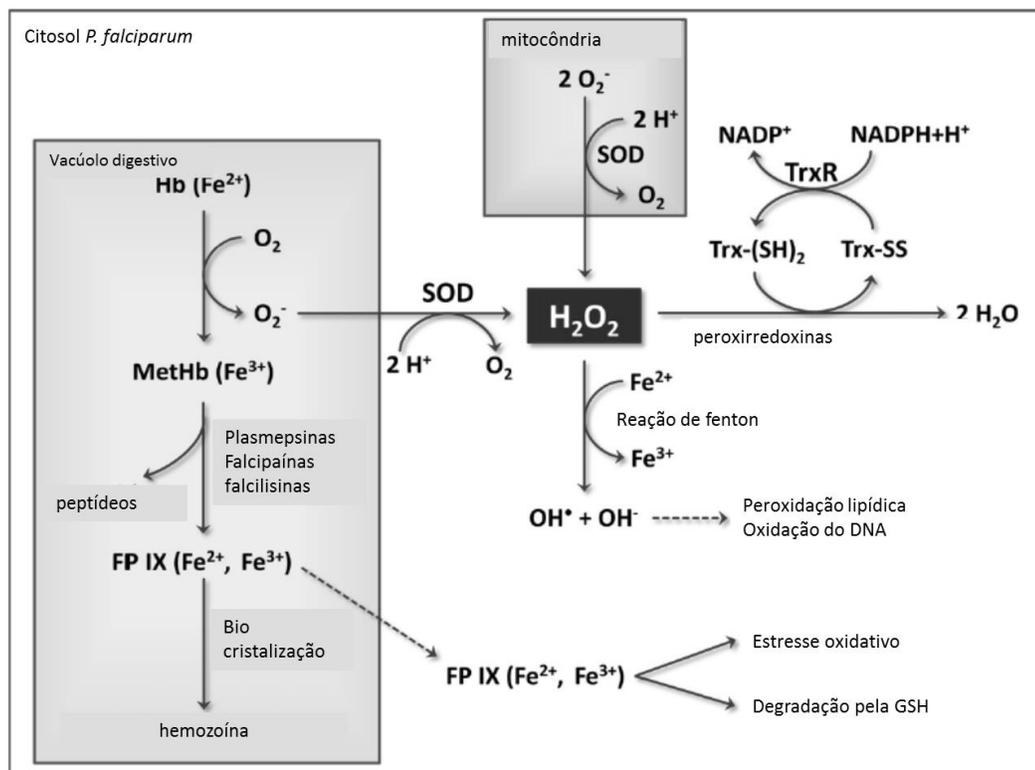
Além de ter que eliminar os seus próprios metabólitos endógenos, os protozoários parasitas precisam lidar com o “burst” oxidativo do sistema imune do hospedeiro. O estresse oxidativo é proveniente de um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas ao oxigênio (endógenas e exógenas) e os antioxidantes disponíveis (MULLER *et al.*, 2003).

Existem evidências de que o estresse oxidativo esteja envolvido na patogênese da malária, e estudos apontaram mecanismos que desencadeiam tanto em nível celular (MULLER, 2004), quanto em pacientes (PABÓN *et al.*, 2003). Uma vez que células efectoras do sistema imune geram espécies oxidantes com atividade microbicida, os mecanismos antioxidantes dos parasitos usualmente constituem importantes estratégias de escape e, portanto, são fatores de virulência.

A homeostasia requer a manutenção de um meio com equilíbrio redox apropriado, minimizando a geração de espécies reativas ao oxigênio como os ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil, que causam danos a ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos e membranas (IMLAY, 2003). Na tentativa de preservar este ambiente redutor, organismos aeróbicos e anaeróbicos utilizam sistemas antioxidantes e reações de óxido-redução (SIES, 1997). O estado redox da célula é mediado por taxas de nucleotídeos de purina oxidados e reduzidos e tióis, como a glutatona/glutationa dissulfeto e tiorredoxina/tiorredoxina dissulfeto (BUNIK, 2003).

Parasitos causadores da malária são vulneráveis ao estresse oxidativo durante seu estágio de vida eritrocítico (BECKER *et al.*, 2004). Isto é compreensível, tendo em vista que o parasito vive em um ambiente pró-oxidante que possui oxigênio e ferro, os principais pré-requisitos para a formação de EROs (espécies reativas ao oxigênio) via reação de Fenton (LIOCHEV e FRIDOVICH, 1999).

A principal fonte geradora de estresse oxidativo do *Plasmodium* (figura 12) é a degradação de hemoglobina. A hemoglobina é incorporada a partir do eritrócito e degradada até aminoácidos e heme livre no interior do vacúolo digestivo (FRANCIS *et al.*, 1997). A maior parte do heme livre é convertido em hemozoína (STIEBLER *et al.*, 2011). Entretanto, uma pequena quantidade residual é oxidada com formação de superóxido e peróxido do hidrogênio, levando a danos oxidativos no DNA e peroxidação lipídica (EGAN *et al.*, 2002).



**Figura 12:** Fontes de estresse oxidativo no *P. falciparum*. Na figura, é possível observar os principais processos metabólicos capazes de produzir radicais livres em *P. falciparum*. Dentro do vacúolo digestivo ocorre o processo de degradação da hemoglobina, que pode gerar como subprodutos o radical superóxido e a ferroprotoporfirina. Esses subprodutos ao transpassarem a membrana do vacúolo e atingirem o citoplasma podem ocasionar uma série de reações capazes de produzir estresse oxidativo no parasito. Traduzido de JORTZIK e BECKER, 2012.

Para sobreviver a este desequilíbrio redox, parasitos e hospedeiros precisaram desenvolver uma pletera de defesas antioxidantes. Algumas destas estão funcionais apenas nos parasitos, constituindo, portanto, promissores alvos terapêuticos.

A produção da hemozoína pode estar relacionada à resistência a drogas antimaláricas, como a artemisinina (MEUNIER e ROBERT, 2010; WITKOWSKI *et al.*, 2012), a qual atua no vacúolo digestivo dos parasitos intracelulares (del PILAR CRESPO *et al.*, 2008). Assim sendo, a modulação da via endocítica deste parasito é uma abordagem que não apenas constitui um modelo experimental importante para o entendimento da doença, mas ainda um promissor alvo para a quimioterapia antimalárica. Com isso, a formação de cristais de hemozoína a partir de heme constitui uma importante estratégia parasitária de escape ao estresse oxidativo. O

plasmódio não degrada os anéis tetrapirrólicos ou heme livres, sendo que estes e o ferro ali presentes são tóxicos para o microrganismo por seu efeito oxidante (HAR-EL *et al.*, 1993).

Durante o processo de degradação da hemoglobina, a maior parte do heme liberado é polimerizado na forma de hemozoína ou pigmento malárico (STIEBLER *et al.*, 2011). Compostos que inibem este processo de biocristalização têm atividade antimalárica (ZIEGLER *et al.*, 2001; HEMPELMANN, 2007).

A biogênese de vacúolos digestivos contendo hemozoína tem um papel central na fisiopatogenia da malária (DASARI E BHAKDI, 2012), ativando as cascatas de complemento e coagulação, processos observados em casos severos de malária (DASARI *et al.*, 2012), modulando a resposta imunológica (SCHUMANN, 2007) e inibindo a função de células efectoras (PERKINS *et al.*, 2011), como macrófagos (ARESE e SCHWARZER, 1997), monócitos (SCHWARZER *et al.*, 2008), neutrófilos (PERKINS *et al.*, 2011) e células dendríticas (URBAN e TODRYK, 2006; MILLINGTON *et al.*, 2006).

### 3. HIPÓTESE DO TRABALHO

---

Os compostos curcumina, dissulfiram e DETC utilizados em combinação são eficientes na terapêutica da malária experimental.

### 4. OBJETIVOS

---

#### 4.1 Objetivo Geral

Analisar a efetividade da combinação entre a curcumina e os tiocarbamatos dissulfiram e seu metabólito DETC e estudar o(s) mecanismo(s) de ação destas combinações na malária experimental.

#### 4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de curcumina isolada e em combinação com o DETC e com o dissulfiram sobre a sobrevivência de *Plasmodium falciparum in vitro*;
- Avaliar o potencial citotóxico das substâncias isoladas e em combinação;
- Analisar possíveis efeitos sinérgicos entre as drogas combinadas;
- Avaliar os possíveis mecanismos de ação das drogas isoladas e combinadas com antagonistas de sistemas antioxidantes, através da análise microscópica e de técnicas bioquímicas usando *Plasmodium falciparum*;
- Avaliar o efeito das drogas e combinação supracitadas sobre a sobrevivência de camundongos da linhagem Swiss Webster infectados com *Plasmodium berghei*.

## **5. METODOLOGIA**

---

### **5.1 Drogas utilizadas**

Foram utilizadas nos experimentos cloroquina e dissulfiram, provenientes de Farmanguinhos e o dietildithiocarbamato de sódio proveniente da Sigma-Aldrich. Todas as soluções foram preparadas no dia da execução dos experimentos.

### **5.2 Aprovação ética para uso de material humano**

Todos os procedimentos que utilizaram material humano foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz e está protocolado sob o número 270.

### **5.3 Cultivo contínuo da fase eritrocítica de *Plasmodium falciparum***

Os experimentos foram realizados utilizando-se *P. falciparum* clone W2 (CQ-resistente), cultivado em hemácias humanas, conforme descrito por TRAGER e JENSEN, 1976. Os parasitos foram mantidos em garrafas plásticas para cultura (©TPP), de 50 a 150 mL, a 37°C, em meio RPMI 1640 (GibcoBRL), suplementado com 25mM de HEPES (Sigma-Aldrich), 11mM de glicose (Sigma-Aldrich), 40µg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich), 5% de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich) filtrado, hipoxantina (Sigma-Aldrich) e 10% (v/v) de plasma humano O<sup>+</sup> (inativado) coletado no Hemocentro da Bahia (HEMOBA). As culturas foram mantidas com hematócrito de 5% em mistura gasogênica de 90% N<sub>2</sub>; 5% O<sub>2</sub>; 5% CO<sub>2</sub>. As trocas do meio de cultura e da mistura gasogênica foram realizadas diariamente.

### **5.4 Sincronização das Culturas para Utilização nos testes *in vitro***

A sincronização para obtenção de culturas com parasitos predominantemente na forma de “anel” utilizados para testes quimioterápicos *in vitro* foi realizada segundo LAMBROS e VANDERBERG, 1979. Resumidamente, 15 mL da cultura com 90% dos parasitos na forma evolutiva de “anel” foram centrifugados por 5 minutos a 2039 x g. Posteriormente as células foram ressuspensas em 10 mL de sorbitol (VETEC) a 5% e incubadas por 5 minutos a 37°C. As células foram então centrifugadas a 2039 x g por 6 minutos e mantidas em cultura conforme descrito.

### **5.5 Concentração das células infectadas para aumento da parasitemia utilizando**

#### **Percoll**

Devido à taxa de parasitemia, fez-se necessário, para algumas técnicas, a concentração das células parasitadas através da utilização do gradiente de percoll, segundo KUTNER *et al.*, 1985. As culturas sincronizadas e com hematócrito de 5% no estágio de trofozoíto maduro foram centrifugadas a 550 x g a 27°C por 5 minutos. Os *pellets* foram lavados em salina tamponada com fosfato - PBS (137 mM NaCl – 2,7 mM KCl – 1,24 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0,14 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,2). As hemácias infectadas foram então ressuspensas em 2 mL de PBS com 6% de sorbitol (VETEC). Suspensões de hemácias em PBS-sorbitol foram adicionadas sobre gradientes de percoll (GE Healthcare) (90% - 80% - 70% - 60%). Após esse procedimento, os tubos foram centrifugados a 1500 x g, por 20 minutos, à temperatura ambiente em centrífuga (BECKMAN) com rotor de ângulo fixo.

### **5.6 Preparo das placas para os ensaios de quimioterapia *in vitro***

Culturas de parasitos sincronizadas com predomínio de anéis de *P. falciparum* foram distribuídas em microplacas de 96 poços (©TPP). Inicialmente, adicionou-se 20 µL dos compostos a serem testados, em triplicata, e em diferentes concentrações seriadas utilizando o epMotion® 5075 LH systems (eppendorf). Posteriormente, foi adicionado 180 µL/poço de meio de cultura RPMI contendo 1 – 2 % de parasitemia e 2,5 % de hematócrito para o teste de incorporação de hipoxantina tritiada. Os poços controles (seis por teste) continham hemácias infectadas não tratadas ou hemácias infectadas sem adição dos compostos-testes e com o diluente DMSO.

### **5.7 Testes de proliferação de *P. falciparum* através da incorporação de hipoxantina tritiada**

Os testes de proliferação foram realizados segundo DESJARDINS *et al.*, 1979. Os parasitos foram previamente cultivados em meio isento de hipoxantina por no mínimo 72 horas, posteriormente sincronizados. Parasitos foram incubados com 5 (cinco) concentrações variadas dos compostos, utilizando a proporção 1/3 (100 µg/mL à 1,23 µg/mL) por 24 horas em placas de 96 poços (©TPP). Após esse período foram adicionados ao meio de cultura 25 µL/poço de [<sup>3</sup>H]-hipoxantina (0,5 µCi/poço) e incubados por mais 24 horas, a 37 °C. As placas foram então congeladas a - 20°C por 6-18 horas para lise das hemácias. Após esse período foram

descongeladas e colhidas em capilares de vidro, em papéis de filtro (PerkinElmer), na qual foram adicionados 4 mL de líquido de cintilação. Então as amostras foram colocadas em bolsas e emergidas em cintilação de fluxo, por emissão radioativa de 1205 betaplate, através de contador  $\beta$  Matrix 9600 (PerkinElmer). A concentração de hipoxantina tritiada incorporada aos parasitos foi avaliada através da leitura da radioatividade incorporada. A medida de incorporação de [ $^3\text{H}$ ]-hipoxantina foi realizada em contagem por minuto, sendo proporcional à viabilidade do parasito. Os resultados foram comparados com os controles positivos, considerando-se que nestes últimos a viabilidade foi igual a 100%.

### 5.8 Determinação da citotoxicidade em esplenócitos murinos

Inóculos de  $1 \times 10^6$  esplenócitos retirados de camundongos BALB/c foram incubados em meio RPMI (GibcoBRL) completo, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino e 10  $\mu\text{L}$  de [ $^3\text{H}$ ]-timidina/poço, de forma a obter uma concentração de 1  $\mu\text{Ci/poço}$ , em presença ou ausência dos fármacos. Para estimular a proliferação dos esplenócitos, foram utilizadas 10  $\mu\text{g/mL}$  de concanavalina A (Sigma-Aldrich). Após 24 horas, as células foram coletadas para contagem de radioatividade incorporada através do contador  $\beta$  Matrix 9600 (PerkinElmer). Para determinar a  $\text{IC}_{50}$  das drogas, foram utilizadas 5 (cinco) concentrações variadas (100  $\mu\text{g/mL}$  – 1,23  $\mu\text{g/mL}$ ), utilizando o epMotion® 5075 LH systems (epENDORF). O valor da  $\text{IC}_{50}$  foi calculada pelo programa GRAPHPAD.PRISM5.0.

### 5.9 Separação do *P. falciparum* da hemácia

O processo de lise das hemácias foi realizado segundo GALLO *et al.*, 2009. Parasitos foram isolados das hemácias utilizando-se 20 vezes o volume do *pellet* de um tampão contendo 7 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  – 11 mM  $\text{NaHCO}_3$  – 58 mM  $\text{KCl}$  – 56 mM  $\text{NaCl}$  – 1 mM  $\text{MgCl}_2$  – 14 mM glicose – 0,02% saponina. O *pellet* foi lavado 2 vezes a 1500 g por 5 minutos neste tampão. Posteriormente, foi lavado em PBS.

### 5.10 Determinação da $\text{IC}_{50}$ das drogas

A inibição do crescimento de 50% dos parasitos foi determinada através de curvas dose-resposta, em função de regressão não linear. Foi utilizado o programa GRAPHPAD.PRISM5.0 para determinar o valor da  $\text{IC}_{50}$ . Todos os testes foram realizados em triplicata.

### 5.11 Ensaio de hemólise

Para avaliar a capacidade dos compostos em causar hemólise, foi utilizada a técnica proposta por WANG e colaboradores 2010. Foi coletado sangue em tubo com heparina, centrifugado a 796g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e as hemácias foram lavadas 4 vezes com PBS. As hemácias (hematócrito 1%) foram incubadas com concentrações variadas das substâncias (100µg/mL – 50µg/mL – 25µg/mL – 12,5µg/mL e a IC<sub>50</sub> da substância) a 37°C em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> por 1 hora. Foi utilizada solução de saponina a 1% (m/v) como controle positivo, gerando 100% de hemólise. Após incubação, as placas foram centrifugadas a 286 x g por 10 minutos e 100µL do sobrenadante foram transferidos para outra microplaca e a leitura foi realizada a 540nm em espectrofotômetro. A taxa de hemólise das amostras foi calculada segundo a fórmula abaixo:

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{\text{Absorbância da amostra} - \text{absorbância do branco}}{\text{Absorbância do controle com saponina}} \times 100$$

### 5.12 Avaliação do efeito citotóxico/citostático dos compostos sobre culturas de *P. falciparum*

Para avaliação do efeito citotóxico/citostático, foram utilizadas hemácias infectadas com *Plasmodium falciparum* tratadas ou não (controle sem antioxidante) previamente (por 24 horas) com o antioxidante urato e incubadas com a IC<sub>50</sub> das drogas. As células foram mantidas durante 48 horas na presença dos compostos. Durante as primeiras 48 horas realizamos trocas de meio e adição das substâncias diariamente. Após este período, as células foram lavadas para retirada das drogas e mantidas as trocas diárias de meio de cultura. Esfregaços sanguíneos foram realizados a cada 24 horas, fixados e corados com panótico rápido para a determinação da parasitemia. Foram avaliadas no mínimo 2000 hemácias por lâmina e constatada a quantidade de hemácias infectadas.

### 5.13 Avaliação do sinergismo entre os compostos pela metodologia da Concentração Inibitória Fracionada (FIC)

Para a determinação da FIC e posterior caracterização do tipo de associação entre as drogas, foram realizados ensaios de proliferação celular. Os ensaios foram realizados segundo metodologia descrita (item 5.6). Entretanto, para a determinação da FIC fez-se necessário

combinar concentrações variadas de um composto, mantendo-se fixa a concentração do outro (e vice-versa). A partir daí determinamos a IC<sub>50</sub> do composto que teve sua concentração variada na combinação entre as drogas e posteriormente estes resultados foram plotados na seguinte fórmula, objetivando a determinação da FIC:

$$FIC = \frac{IC_{50} \text{ combinação AB}}{IC_{50} \text{ de A}} + \frac{IC_{50} \text{ combinação BA}}{IC_{50} \text{ de B}}$$

Resultados abaixo de 0,5 caracterizam efeito sinérgico (HALLANDER *et al.*, 1982).

#### 5.14 Índice de Seletividade

Para o cálculo do índice de seletividade foi necessário dispor dos valores referentes ao cálculo da IC<sub>50</sub> das drogas e o valor da IC<sub>50</sub> da citotoxicidade em esplenócitos (BÉZIVIN *et al.*, 2003). Para determinar o índice utiliza-se a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de seletividade (IS)} = \frac{IC_{50} \text{ dos compostos nos esplenócitos}}{IC_{50} \text{ em culturas de } P. \textit{falciparum}}$$

#### 5.15 Avaliação das interações farmacológicas

As interações farmacológicas entre os diferentes compostos, independente do seu mecanismo de ação ou da natureza de suas relações dose-resposta, foram avaliadas pela plotagem de isobogramas. Nos isobogramas, as IC<sub>50</sub> provenientes da utilização isolada de cada produto foram relacionadas, gerando a linha teórica de aditividade. As demais IC<sub>50</sub> obtidas da associação em diferentes proporções dos produtos foram, então, analisadas em relação à sua linha de aditividade. O posicionamento dos pontos em relação a essa linha caracteriza o tipo de atividade: (i) pontos sobre a linha de aditividade apresentam ação aditiva; (ii) ponto abaixo, ação sinérgica; (iii) pontos acima, a ação é antagônica. O gráfico do isobograma foi construído através da utilização do programa CompuSyn. Foram utilizadas combinações das proporções de: 25%, 50%, 75% e 100 % da IC<sub>50</sub> dos compostos (FIVELMAN *et al.*, 2004).

#### 5.16 Avaliação da produção de peroxidação lipídica

A determinação da peroxidação lipídica foi realizada segundo SOUZA *et al.*, 1997. Hemácias

infectadas foram incubadas na presença e ausência das  $IC_{50}$  das drogas. Após o tratamento, as células foram centrifugadas e, então, as hemácias foram lisadas segundo protocolo descrito previamente (item 5.8). Após a lise, as células foram ressuspensas em 200 $\mu$ L de PBS e 200 $\mu$ L de ácido tiobarbitúrico (TBA) (Sigma-Aldrich) a 1% em água destilada. Foi adicionado ácido acético glacial na proporção de 1:1 e, então, incubou-se a 100°C por um período de 3 horas. As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram mensuradas em espectrofotômetro (HITACHI) a 532nm e os resultados foram expressos por  $\mu$ g de proteína.

#### 5.17 **Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Após o tratamento com as drogas, as células foram concentradas através do gradiente de percoll (item 5.4) e as amostras foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, ferricianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5mM ao abrigo da luz por 40 minutos em temperatura ambiente. A seguir, as células foram lavadas no mesmo tampão e desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30 – 100%) por 10 minutos em cada. As amostras foram infiltradas e polimerizadas em resina epoxi Polybed (Polysciences). Após polimerização, cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo e coletados em grades de cobre de malha 400. Posteriormente, as grades foram contrastadas com acetato de uranila alcóolico a 7% e citrato de chumbo por 5 minutos e observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 a 80kV.

#### 5.18 **Deteção de Espécies Reativas ao Oxigênio pela Microscopia de fluorescência**

Culturas de hemácias infectadas por *Plasmodium falciparum* sincronizadas e tratados com curcumina ou DETC a 10 $\mu$ g/mL por 2 horas foram lavadas com PBS, centrifugadas a 280 x g por 5 minutos e incubadas com 10 $\mu$ M de Dihidroetídio (DHE) (Molecular Probes®) em PBS, a 37°C. Após este período de incubação, as células foram levadas ao microscópio invertido, e a fluorescência foi observada.

#### 5.19 **Deteção de superóxido mitocondrial**

Para a detecção de radicais superóxido mitocondriais, foi utilizada a sonda fluorescente MitoSox<sup>®</sup> (Molecular Probes®). Hemácias infectadas com *Plasmodium falciparum* foram incubadas na presença de 5 $\mu$ M de MitoSox por um período de 10 minutos a 37°C na ausência de

luz. As células foram previamente tratadas com as drogas na concentração de 10µg/mL por um período de 3 horas. Após incubação, as células foram lavadas em tampão e avaliadas por citometria de fluxo a 510/580nm (excitação/emissão).

#### 5.20 **Detecção citométrica de espécies reativas do oxigênio (EROs)**

Para detectar as espécies reativas do oxigênio, utilizou-se a sonda fluorescente DHE (Molecular Probes®). Hemácias infectadas com *Plasmodium falciparum* foram tratadas por 3 horas com as drogas teste a 10µg/mL e, posteriormente, foram incubadas com DHE a 10µM por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, as células foram lavadas e avaliadas por citometria de fluxo.

#### 5.21 **Quantificação de Hemozoína *in vitro***

A quantificação de hemozoína formada foi realizada segundo KANYILE e EGAN, 2004. Diferentes concentrações de drogas foram incubadas com 40mM de SDS (dodecil sulfato sódico) (BioUltra) e 200µM de hemina (Sigma-Aldrich) em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,8 por 24 horas, em placa de fundo cônico. Após 24 horas, foi feita uma curva padrão de hemina com as seguintes concentrações: 5µM, 10µM e 20µM. Foram adicionados 80µL de piridina a 30% em cada uma das amostras e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foram retirados 38µl da primeira placa e transferidos para placas de 96 poços de fundo reto, sendo adicionados 250µL de piridina 30% e a leitura efetuada a 405nm em espectrofotômetro (HITACHI).

#### 5.22 **Dosagem de hemozoína em extrato de *P. falciparum***

A dosagem foi realizada segundo OLIVEIRA *et al*, 2000. Hemácias infectadas com a forma de anel foram incubadas na presença e ausência das drogas. Após um período de 18 horas, as hemácias foram lisadas e os parasitos foram ressuspensos em 1mL de PBS. Posteriormente, foram centrifugados a 14000g por 5 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspensado em 1,0mL de tampão bicarbonato de sódio 0,1 M pH 9,1 com 2,5% de SDS (BioUltra). As amostras foram agitadas por 15 minutos e novamente centrifugadas a 14000 x g em microcentrífuga por 10 minutos em temperatura ambiente (esse procedimento foi repetido 3 vezes). Após esse processo, as amostras foram novamente ressuspensas em 1mL de água destilada e passadas no agitador de tubos (vortex) por 1 minuto.

Novamente foram centrifugadas a 14000 x g por 10 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado (esse procedimento foi repetido 2 vezes). As amostras foram então ressuspensas em 1,0mL de NaOH 0,1 M, agitadas por 30 minutos e o heme total foi quantificado em espectrofotômetro a 400nm.

### 5.23 Aprovação ética para uso de animais de laboratório

Todos os procedimentos utilizados neste estudo que envolveram o uso de animais de laboratório foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ e protocolados sob o número CEUA L-023/2009.

### 5.24 Avaliação da sobrevida de camundongos Swiss Webster infectados por *P. berghei* tratados com diferentes concentrações dos compostos

Camundongos da linhagem Swiss Webster, pesando aproximadamente 25±5g, provenientes do biotério do CPqGM FIOCRUZ/Ba foram inoculados por via intraperitoneal com  $1 \times 10^5$  eritrócitos infectados com *P. berghei*, cepa NK65. 48 horas após a infecção, realizamos esfregaço sanguíneo, objetivando confirmar o estabelecimento da infecção nos camundongos. A partir daí, os animais foram tratados diariamente por via oral, durante 5 dias com as substâncias teste nas concentrações de 2mg/kg, 25mg/kg, 50mg/kg e 100mg/kg. Dois grupos controles (n=8) foram usados a cada experimento, um grupo tratado com doses curativas de cloroquina (25mg/kg) e outro grupo tratado com o diluente das substâncias teste (DMSO). A sobrevida dos grupos tratados foi calculada em relação aos grupos controle não tratados e foi avaliada durante 30 dias após o inóculo inicial.

### 5.25 Análise estatística

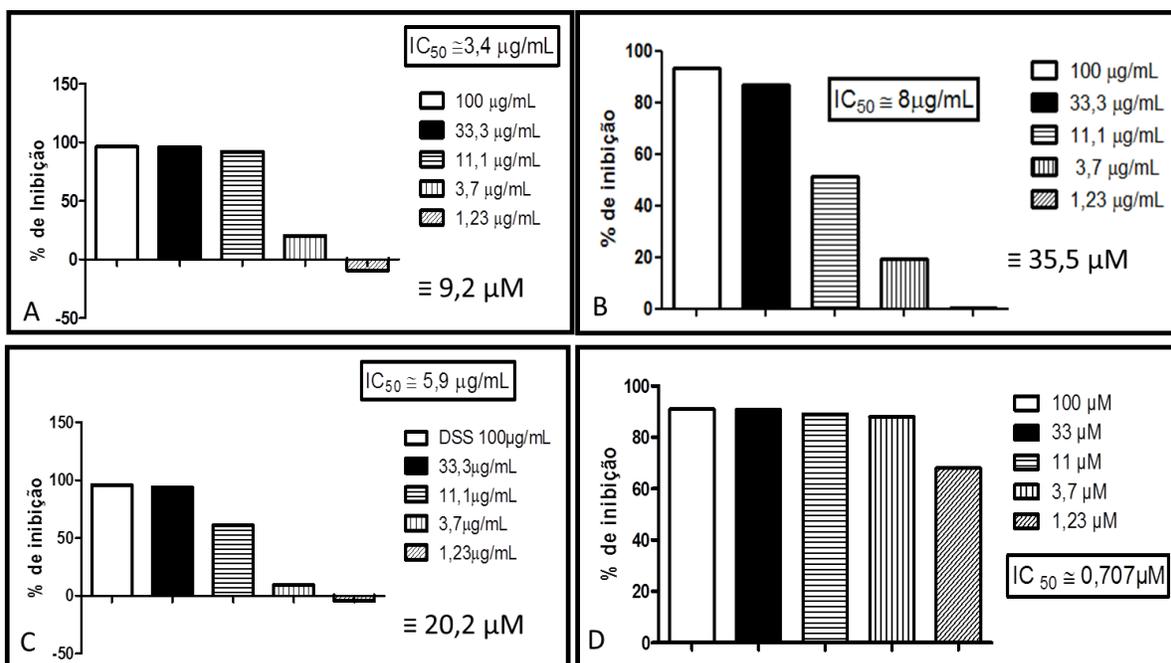
Os dados obtidos foram representados como média da porcentagem de inibição ou médias ± desvio padrão. Para determinar a diferença entre as médias de pelo menos três grupos analisados, utilizamos o teste ANOVA seguido do Dunnett ou Tukey. Todos os testes foram considerados significativos quando apresentaram um valor de  $p < 0,05$ . Todos os experimentos foram realizados com pelo menos duas repetições independentes em triplicata. Os gráficos apresentados neste trabalho são representativos.

## 6. RESULTADOS

---

### 6.1 Determinação da IC<sub>50</sub> da curcumina, dissulfiram e DETC sobre culturas de *P. falciparum*

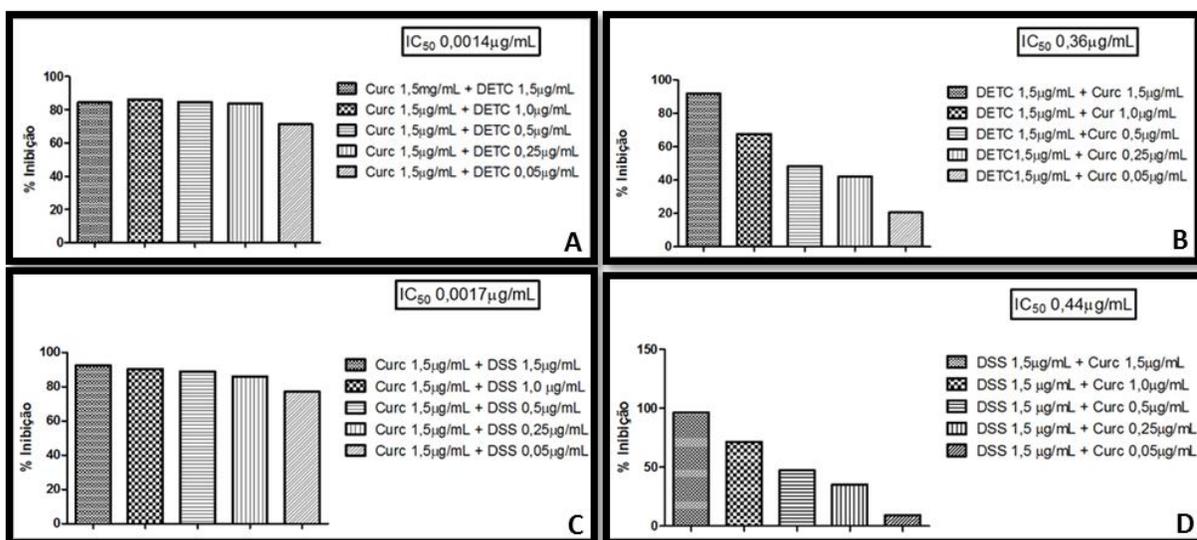
Com o objetivo de determinar a IC<sub>50</sub> dos compostos nas culturas de *P. falciparum*, incubamos as culturas com diferentes concentrações das drogas por 24 horas. Na figura 13, observamos que a IC<sub>50</sub> da curcumina foi de 9,22µM (**A**), o DETC apresentou a IC<sub>50</sub> de 35,5µM (**B**), a IC<sub>50</sub> do dissulfiram foi aproximadamente 20,2µM (**C**). O valor da IC<sub>50</sub> da artemisinina (**D**), droga atualmente utilizada na quimioterapia da malária, foi determinada, para as condições de cultivo, a IC<sub>50</sub> foi de 0,707µg/mL (2,5 µM). Dentre os compostos avaliados no nosso estudo, excetuando-se a droga padrão, a curcumina foi a mais eficaz na inibição do crescimento do parasito, apresentando a menor IC<sub>50</sub>.



**Figura 13: Determinação da  $IC_{50}$  dos compostos em culturas de *Plasmodium falciparum*.** As drogas foram testadas em culturas sincronizadas de *P. falciparum* e mantidas em incubação por 24 horas. O percentual de inibição foi determinado em comparação ao controle com solvente (dimetilsulfóxido – DMSO). A proliferação celular foi avaliada através da técnica de incorporação de hipoxantina tritiada. Observamos o efeito da curcumina (A), DETC (B), dissulfiram (C) e artemisinina (D), sendo que os valores de  $IC_{50}$  obtidos foram  $9,22\mu\text{M}$ ,  $35,5\mu\text{M}$ ,  $20,2\mu\text{M}$  e  $2,5\mu\text{M}$ , respectivamente. Os gráficos são representativos e os valores aproximados de  $IC_{50}$  foram obtidos em pelo menos três experimentos independentes, empregando cinco diferentes concentrações das drogas isoladas, realizados em triplicata. Cada barra representa a média da porcentagem de inibição. Os valores de  $IC_{50}$  foram determinados a partir do programa GraphPad.PRISM 5.0.

## 6.2 Determinação das IC<sub>50</sub> dos compostos combinados em culturas de *P. falciparum*

A partir da observação da capacidade das drogas isoladamente inibirem o crescimento do parasito e tendo em vista a recomendação, por parte da Organização Mundial de Saúde, da utilização de terapia combinada para o tratamento da malária, o efeito da combinação dos compostos foi avaliado contra cultura de *P. falciparum*. A avaliação da combinação foi realizada inicialmente através do método da FIC (combinação inibitória fracionada), que permite determinar, dentro da proporção de concentração testada, as interações medicamentosas entre os compostos (sinergismo, antagonismo e efeito aditivo). Como o objetivo era avaliar o efeito da combinação, a dose utilizada foi padronizada para um valor inferior à IC<sub>50</sub> do composto. Nesses experimentos (figura 14), a maior concentração dos compostos usada foi 1,5µg/mL. Ao combinarmos a curcumina com o DETC (**A**), mantendo fixa a concentração da curcumina, a IC<sub>50</sub> do DETC foi de 0,0014µg/mL (0,00621µM). Na combinação do DETC com a curcumina, mantendo fixa a concentração do DETC (**B**), a IC<sub>50</sub> da curcumina foi de 0,36ug/mL (0,977µM). A curcumina foi mais eficiente sobre o parasito que o DETC, pois o efeito da combinação foi melhor com a concentração dela fixa. A combinação entre as drogas dissulfiram e curcumina resultou nos valores de IC<sub>50</sub>, para o dissulfiram (**C**) 0,0017µg/mL (0,0057µM) e para a curcumina 0,44µg/mL (1,19µM). Portanto, a combinação entre os compostos reduziu os valores de IC<sub>50</sub> das drogas isoladas. A redução foi de aproximadamente 5000 vezes para o DETC, 3500 vezes para o dissulfiram e 7 vezes para a curcumina. Esses resultados apontaram para os seguintes FICs: 0,000175 para a combinação entre a curcumina e o DETC; 0,1 para o DETC em combinação com a curcumina; 0,00028 para a curcumina em combinação com o dissulfiram; e 0,129 para o dissulfiram combinado com a curcumina.

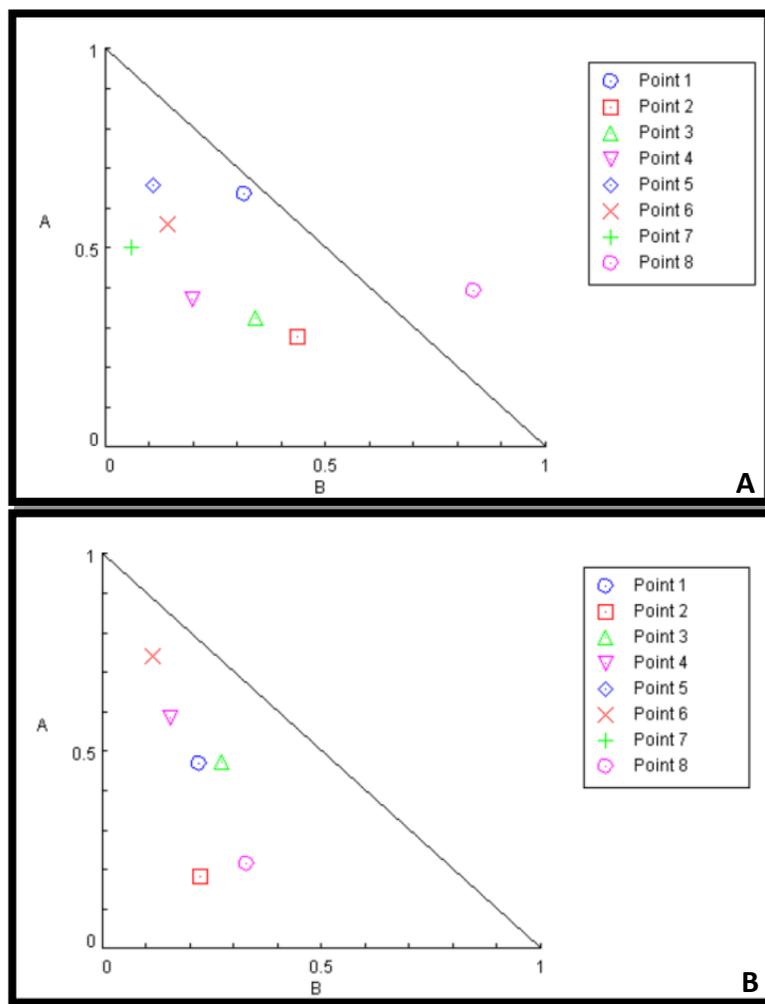


**Figura 14: Determinação da  $IC_{50}$  da combinação das drogas em culturas de *P. falciparum*.**

As drogas foram utilizadas sobre culturas sincronizadas na forma de trofozoítos jovens e mantidas em incubação por 24 horas. O percentual de inibição foi determinado em comparação ao controle com solvente (dimetilsulfóxido – DMSO). A proliferação celular foi avaliada através da técnica de incorporação de hipoxantina tritiada. Curcumina em combinação com o DETC (A), DETC em combinação com a curcumina (B), curcumina em combinação com o dissulfiram (C) e o dissulfiram em combinação com a curcumina (D) produziram, respectivamente, as  $IC_{50}$  de 6,21nM, 977nM, 5,7nM e 1,19 $\mu$ M. Os gráficos são representativos dos experimentos, e os valores aproximados de  $IC_{50}$  foram obtidos em ao menos três experimentos independentes de dose-resposta, empregando cinco diferentes concentrações de um dos compostos e sempre mantendo fixa a concentração do outro composto. Cada barra representa a média da porcentagem de inibição. Os valores de  $IC_{50}$  foram determinados a partir do programa GraphPad.PRISM 5.0.

### 6.3 Avaliação de efeitos sinérgico para variadas combinações entre os compostos

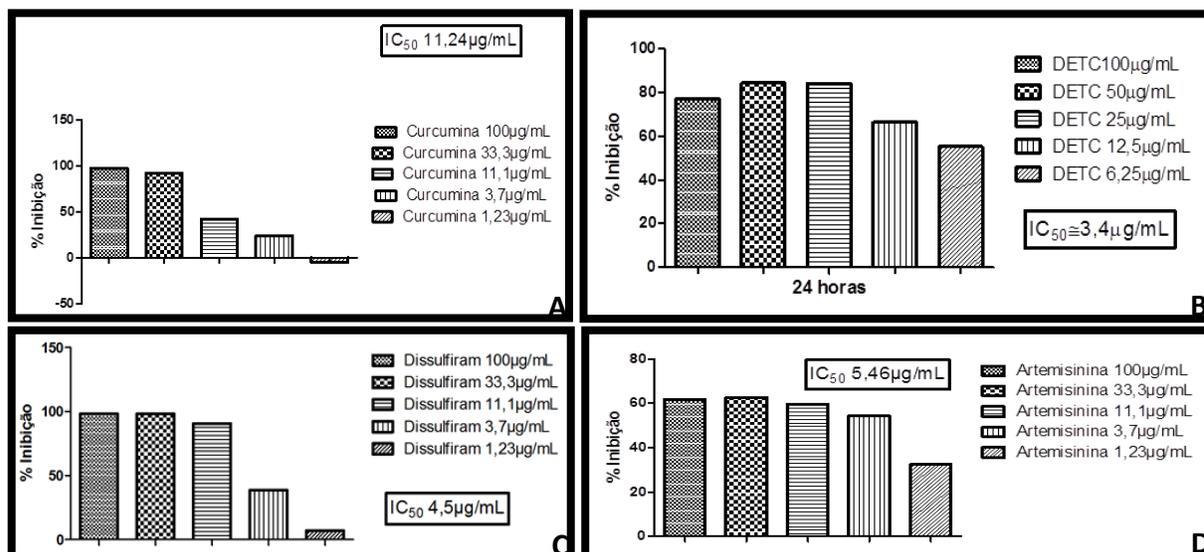
Objetivando avaliar se diferentes proporções de concentrações entre as drogas combinadas mantinham o efeito sinérgico observado pela metodologia da FIC, plotamos os dados em isobogramas. Estes permitem avaliar se diferentes combinações dos compostos mantêm as mesmas relações de efeito sobre as culturas celulares. A concentração máxima testada para cada droga foi a sua  $IC_{50}$ , pois como o objetivo era avaliar a relação entre os compostos, fazia-se necessário utilizar concentrações que isoladamente não exerciam efeitos excessivamente inibitórios sobre a proliferação das células. Na figura 15 **A**, temos o isobograma da curcumina com o DETC, e na figura 15 **B**, a combinação da curcumina com o dissulfiram. É possível verificar que das oito proporções avaliadas na combinação com o DETC, sete apresentaram-se sinérgicas. Na combinação com o dissulfiram, das oito proporções, seis foram sinérgicas.



**Figura 15 Isobologramas do efeito das combinações entre curcumina com o DETC ou dissulfiram sobre os parasitas tratados.** Experimento realizado sobre culturas sincronizadas de *P. falciparum* (na fase trofozoíto jovem). Foram utilizadas como concentrações máximas as  $IC_{50}$  das drogas isoladas e realizamos combinações entre os compostos com diferentes proporções (100% - 75% - 50% - 25% da  $IC_{50}$ ). Cada ponto representa uma combinação específica obedecendo às seguintes proporções: **ponto 1** – 100% da  $IC_{50}$  curcumina + 100% da  $IC_{50}$  DETC ou dissulfiram; **ponto 2** – 25% da  $IC_{50}$  curcumina + 75% da  $IC_{50}$  DETC ou dissulfiram; **ponto 3** – 25%  $IC_{50}$  curcumina + 50%  $IC_{50}$  DETC ou dissulfiram; **ponto 4** – 25%  $IC_{50}$  curcumina + 25%  $IC_{50}$  DETC ou dissulfiram; **ponto 5** – 75%  $IC_{50}$  curcumina + 25%  $IC_{50}$  DETC ou dissulfiram; **ponto 6** – 50%  $IC_{50}$  curcumina + 25%  $IC_{50}$  DETC ou dissulfiram; **ponto 7** – 100%  $IC_{50}$  curcumina + 25%  $IC_{50}$  DETC ou dissulfiram; **ponto 8** – 25%  $IC_{50}$  curcumina + 100%  $IC_{50}$  DETC ou dissulfiram. Os gráficos são representativos de 2 experimentos independentes realizados em triplicata e foram gerados a partir do programa CompuSyn.

#### 6.4 Determinação das IC<sub>50</sub> dos compostos sobre esplenócitos murinos

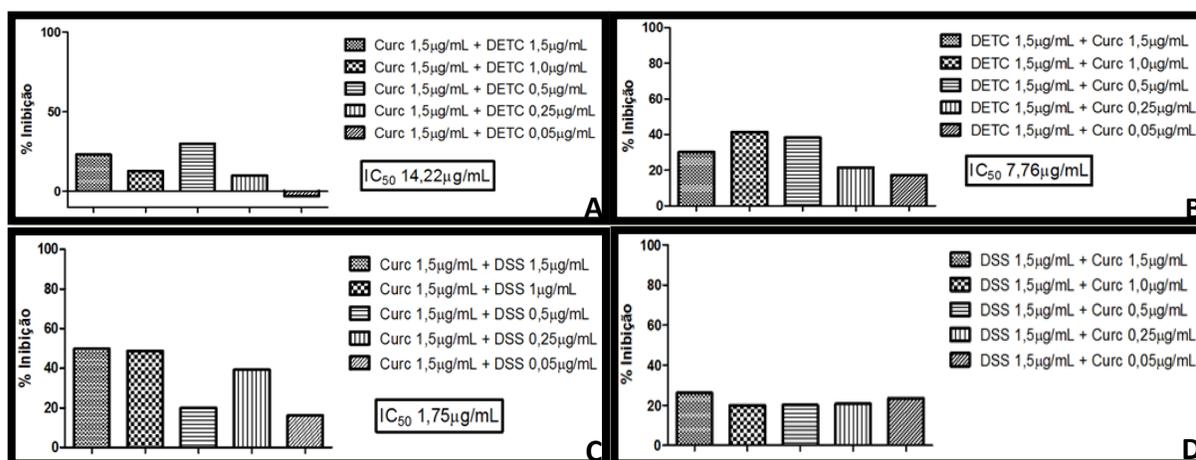
O potencial tóxico das drogas sobre cultura de células de mamífero foi avaliado em esplenócitos isolados do baço de camundongos e incubados com as drogas em cinco concentrações diferentes, para determinar a IC<sub>50</sub> de cada composto (figura 16). A curcumina apresentou IC<sub>50</sub> de 11,24µg/mL (30,51µM) sendo, aproximadamente, 3 vezes mais tóxica para o parasito que para células de mamíferos. A curva de inibição apresentou um efeito dose resposta. O DETC (**B**) apresentou uma IC<sub>50</sub> de 3,4µg/mL (15,09µM). Esse composto foi aproximadamente 2 vezes mais citotóxico para a célula de mamífero que para o parasito. A IC<sub>50</sub> do dissulfiram (**C**) foi de 4,5µg/mL (15,17µM), assim como seu metabólito, o dissulfiram apresentou-se mais tóxico para os esplenócitos que para as culturas de *P. falciparum*. Como controle, o efeito da artemisinina foi avaliado sobre os esplenócitos e foi obtida uma IC<sub>50</sub> de 5,46µg/mL (19,3µM). Dentre os compostos testados, o DETC e o dissulfiram foram os mais citotóxicos para esplenócitos murinos.



**Figura 16: Determinação das  $IC_{50}$  em esplenócitos murinos, após a incubação com os compostos.** Figura A representa a citotoxicidade da curcumina; figura B representa a citotoxicidade do DETC; figura C representa a citotoxicidade do dissulfiram; e figura D representa a citotoxicidade da artemisinina, sendo obtidos, respectivamente, valores de  $IC_{50}$  de 30,51µM, 15,09µM, 15,17µM e 19,3µM. As drogas foram incubadas com  $1 \times 10^6$  esplenócitos murinos, durante 24 horas. O percentual de inibição foi determinado a partir do controle com o DMSO (solvente). A indução da proliferação foi feita através do uso da concanavalina A e a proliferação foi avaliada através da técnica de incorporação de timidina tritiada. Cada barra representa a média da porcentagem de inibição do experimento em triplicata. Esses gráficos são representativos de quatro experimentos independentes realizados em triplicata e as  $IC_{50}$  foram determinadas pelo GraphPad.PRISM5.0.

### 6.5 Determinação das IC<sub>50</sub> dos compostos combinados sobre esplenócitos murinos

Objetivando avaliar a IC<sub>50</sub> da combinação entre as drogas, procedemos com a citotoxicidade sobre esplenócitos murinos (figura 17). As células foram incubadas com as drogas por 24 horas, e avaliados os efeitos da combinação sobre a proliferação celular. Foi utilizada a concentração de 1,5µg/mL, concentração inferior à IC<sub>50</sub> dos compostos. A curcumina (com a concentração fixa) em combinação com o DETC (figura **A**) apresentou um valor de IC<sub>50</sub> de 14,22µg/mL (63,10µM). A combinação com a curcumina reduziu os efeitos tóxicos do DETC, quando utilizado isoladamente, em aproximadamente 4 vezes. Ao mantermos fixa a concentração do DETC e combinando com variadas concentrações da curcumina (figura **B**), obtivemos uma IC<sub>50</sub> para a curcumina de 7,76µg/mL (21,06µM), a combinação com o DETC elevou a toxicidade da curcumina. Quando combinado com a curcumina (figura **C**), o dissulfiram apresentou uma IC<sub>50</sub> de 1,75µg/mL (5,9µM), demonstrando maior toxicidade sobre os esplenócitos. A combinação entre o dissulfiram e concentrações variadas da curcumina (figura **D**) não exibiu um efeito dose-resposta, o que impossibilitou a determinação da IC<sub>50</sub>. Para todas as combinações testadas, o percentual de inibição da proliferação celular manteve-se em torno de 20%.



**Figura 17: Determinação das IC<sub>50</sub> da combinação entre curcumina, DETC e dissulfiram sobre esplenócitos.** Figura A corresponde à combinação entre a curcumina e o DETC; figura B corresponde à combinação entre o DETC e a curcumina; a figura C representa a combinação entre a curcumina e o dissulfiram; e a figura D, a combinação entre o dissulfiram e a curcumina, resultando em valores de IC<sub>50</sub> de 63,10 μM, 21,06 μM, 5,9 μM. O tipo de resposta induzido pela combinação exposta na figura D não possibilitou a determinação da IC<sub>50</sub>. As drogas foram incubadas com  $1 \times 10^6$  esplenócitos murinos por um período de 24 horas, a proliferação celular dos esplenócitos foi induzida pela concanavalina A e a detecção da proliferação celular foi realizada através do método de incorporação da timidina tritiada. Cada barra representa a média da porcentagem de inibição de um experimento representativo de três realizados em triplicata. Os valores de IC<sub>50</sub> foram obtidos através do programa GraphPad.PRISM 5.0.

## 6.6 Avaliação do índice de seletividade (IS) dos compostos em combinação

Este índice visa a avaliar o quão seletivo um composto é entre a cultura dos parasitos e as células de mamífero, indicando assim o potencial destes, para uso em testes clínicos. Observamos que o índice de seletividade (IS) (tabela 1) do DETC quando combinado com a curcumina foi de 10161,03; o IS da curcumina quando combinada com o DETC foi de 21,55; o IS do dissulfiram em combinação com a curcumina foi de 1035,08; o IS da curcumina quando combinada com o dissulfiram não pode ser determinada tendo em vista que não obedeceu a uma curva dose-resposta, sem esse dado fica impossível calcular o IS. Como comparação, calculamos o índice de seletividade da artemisinina que foi de 7,72. A combinação da curcumina com o DETC foi que apresentou maior seletividade, inclusive maior que a da artemisinina.

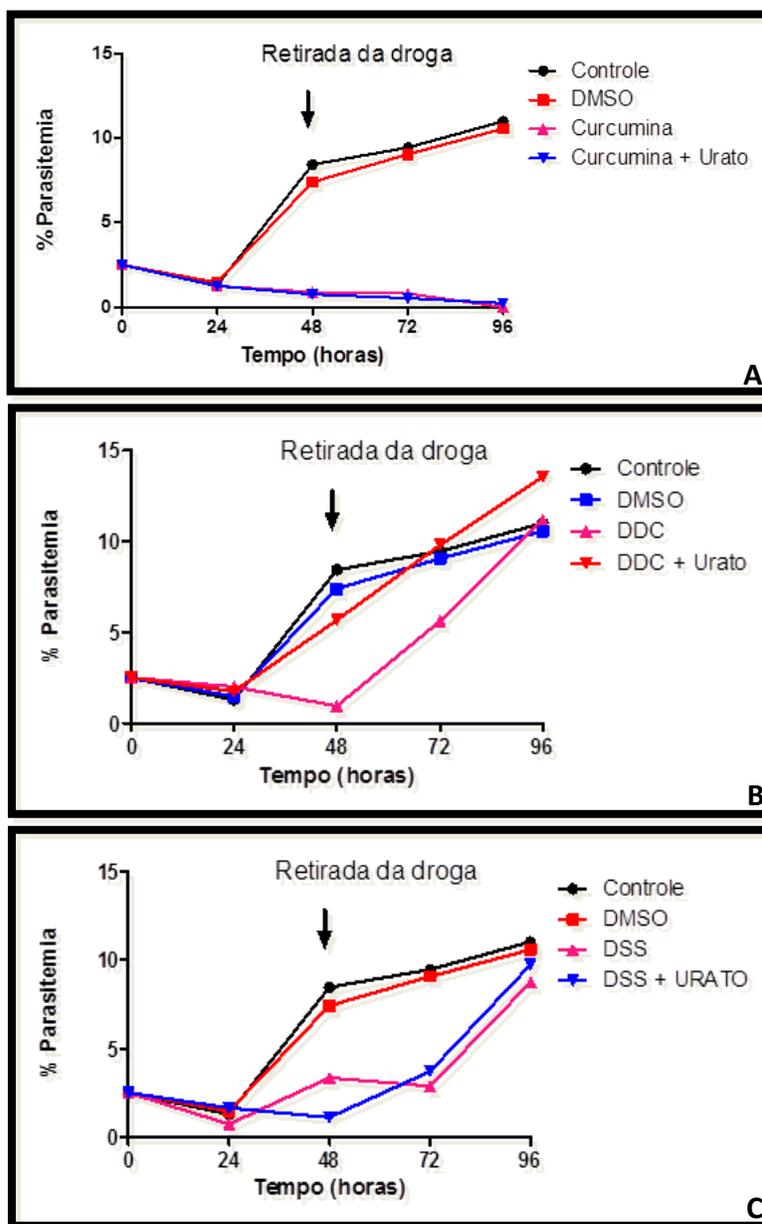
$$\text{Índice de seletividade (IS)} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ dos compostos nos esplenócitos}}{\text{IC}_{50} \text{ em culturas de } P. \textit{falciparum}}$$

COMPOSTO	Citotoxicidade em esplenócitos IC <sub>50</sub> μM	IC <sub>50</sub> μM	ÍNDICE DE SELETIVIDADE
Curcumina + DETC	63,10	0,00621	10161,03
DETC + CURCUMINA	21,06	0,977	21,55
Curcumina + DSS	5,9	0,0057	1035,08
DSS + CURCUMINA	-----	1,19	-----
ARTEMISININA	19,3	0,7	27,57

**Tabela 1: Índice de seletividade dos compostos em combinação.** Os índices de seletividade foram calculados pela proporção entre a IC<sub>50</sub> encontrada para a combinação em esplenócitos e a IC<sub>50</sub> da combinação em culturas de *P. falciparum*. Os dados foram baseados na média determinada pelos experimentos realizados para cada avaliação.

### 6.7 Avaliação do efeito (citotóxico/citostático) produzido pelas drogas em culturas de *P. falciparum*

Com a finalidade de analisar o padrão de efeito que os compostos apresentavam sobre as culturas, as hemácias infectadas pelo *P. falciparum* foram incubadas com os compostos por 48 horas (tempo necessário para a conclusão de um ciclo em cultura) e, após esse período, os compostos foram retirados e o crescimento da cultura acompanhado por mais um ciclo. Em um dos grupos, foi realizada a pré-incubação da cultura com o antioxidante urato, na tentativa de validar os dados da literatura que correlacionam os efeitos da curcumina, dissulfiram e DETC à interferência com o equilíbrio redox. Na figura 18 **A**, observamos que, mesmo após a retirada da curcumina da cultura, o *P. falciparum* permaneceu, por mais um ciclo, incapaz de invadir novas hemácias. Isso nos indica que, possivelmente, o efeito da curcumina é citotóxico nas condições empregadas. A pré-incubação com o urato não influenciou a proliferação celular, o que nos leva a ponderar que o efeito do composto pode não ter relação com estresse oxidativo, ou que a concentração do antioxidante e/ou o tempo de exposição não foram suficientes para reverter o efeito da droga. Na figura 18 **B**, notou-se que após a remoção do DETC as células mantiveram o padrão de invasão celular, o que nos leva a crer que provavelmente os efeitos desta droga são citostáticos para culturas de *P. falciparum* e, neste caso, a pré-incubação com o urato foi capaz de reverter os efeitos causados pela droga. A figura 18 **C** exhibe o efeito do dissulfiram e evidencia que, assim como seu metabólito, o efeito causado nas culturas foi citostático, e a pré-incubação com o urato não causou interferência no padrão de efeito da droga.

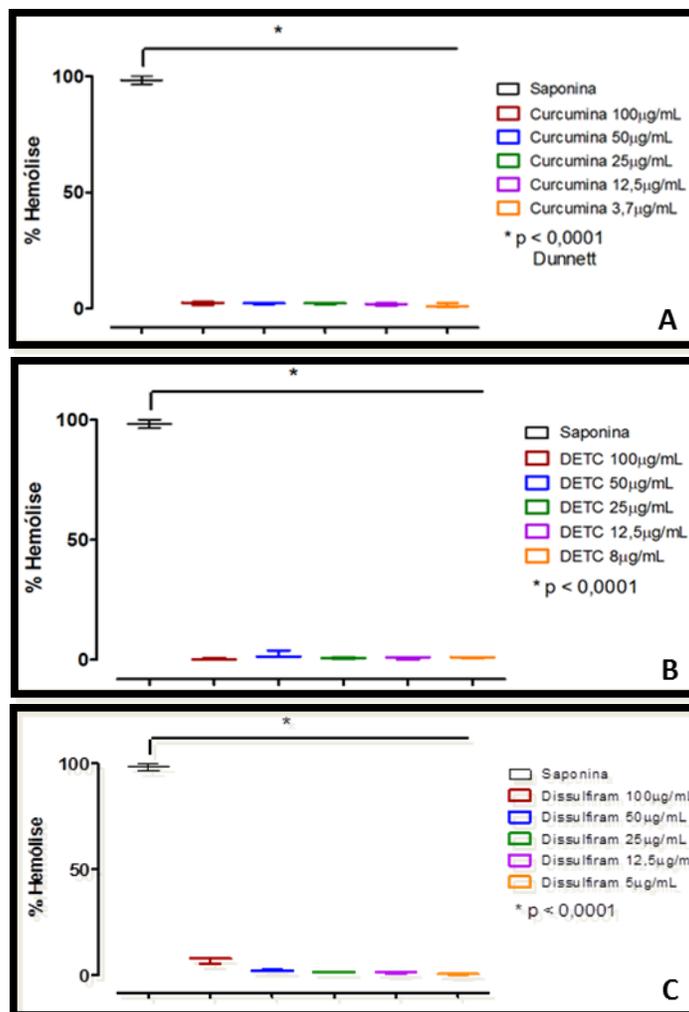


**Figura 18: Efeito citotóxico/citostático da curcumina, DETC e dissulfiram sobre culturas de *P. falciparum*.** Incubamos as drogas, na concentração da  $IC_{50}$ , sobre culturas sincronizadas de *P. falciparum*, com parasitemia e hematócrito de 2,5%, e mantivemos a incubação por um período de 48 horas. As trocas de meio foram realizadas diariamente e as drogas foram adicionadas ao meio a cada troca. Após 48 horas, retiramos as drogas e mantivemos a troca de meio diária. O crescimento da cultura foi acompanhado por mais 48 horas. A determinação da parasitemia foi através de esfregaços sanguíneos diários. A pré-incubação com o urato foi realizada 24 horas antes de tratarmos as culturas com as drogas. Na figura 18 **A**, observamos o efeito da curcumina, que foi citotóxico e que o urato não foi capaz de reverter o efeito do composto; na figura 18 **B**, o efeito do DETC; e na figura 18 **C**, o efeito do dissulfiram, ambos apresentaram efeito citostático e somente no caso do DETC o antioxidante foi capaz de reverter o efeito do composto. Esse gráfico é representativo de 2 experimentos independentes.

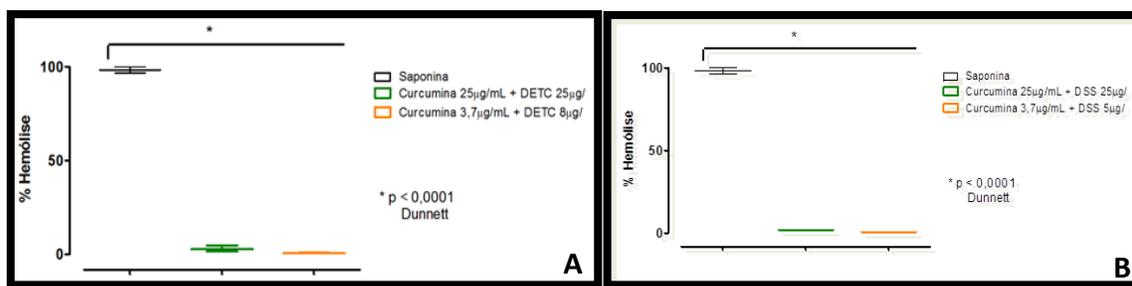
## 6.8 Avaliação do efeito hemolítico dos compostos

Tendo em vista que o *Plasmodium falciparum* é um parasito intracelular que infecta as hemácias, e que a morte da célula hospedeira inviabiliza a infecção, avaliamos a capacidade das drogas em causar hemólise, com o intuito de verificar se a atividade das substâncias fora exercida no parasito por indução de hemólise, impossibilitando assim a manutenção da infecção. Para todas as condições, o controle positivo foi saponina, um detergente natural que provoca hemólise. Na **figura 19 A**, foi avaliado o efeito da curcumina e observado que as concentrações testadas não ocasionaram hemólise. A menor concentração utilizada correspondeu a  $IC_{50}$  do composto. As figuras **19 B** e **C** evidenciam a avaliação do DETC e do seu precursor, o dissulfiram. Assim como para a curcumina, a menor concentração testada dos tiocarbamatos foi a  $IC_{50}$  e da mesma forma, não observamos efeitos hemolíticos.

Foi realizada a avaliação da capacidade hemolítica das drogas usadas em combinação. Verificou-se nas **figuras 20 A** e **B** que a combinação da curcumina com o DETC e a combinação da curcumina com o dissulfiram não produziram hemólise detectável. A capacidade hemolítica foi avaliada tanto com a combinação das  $IC_{50}$  como da combinação de concentrações bem superiores a elas.



**Figura 19: Efeito hemolítico da curcumina, DETC e dissulfiram.** As hemácias (hematócrito de 1%) foram incubadas com as drogas curcumina (A), DETC (B) e dissulfiram (C) por 1 hora, posteriormente foi avaliada a taxa de hemólise em relação ao controle positivo e para todas as drogas e concentrações testadas, não observamos efeito hemolítico. Cada traçado representa a média  $\pm$  o desvio padrão. Os gráficos são representativos de dois experimentos realizados em triplicata e a análise estatística foi realizada através do programa Graph.Pad prism 5.0 utilizando o teste Anova e Dunnett com  $p < 0,0001$ .

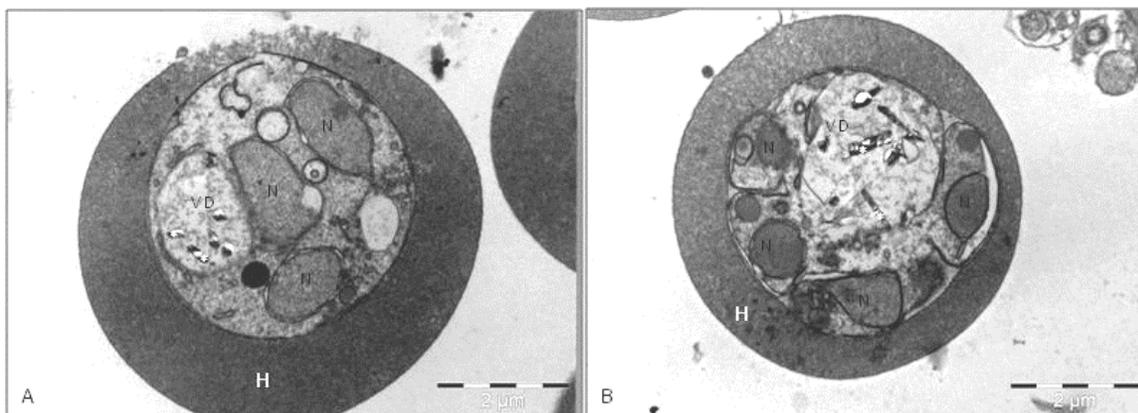


**Figura 20: Efeito hemolítico da combinação dos compostos.** As hemácias (hematócrito de 1%) foram incubadas com a combinação das drogas curcumina com DETC (A) e curcumina com dissulfiram (B) por 1 hora. Posteriormente foi avaliada a taxa de hemólise em relação ao controle positivo e, nas concentrações testadas, não foi observado efeito hemolítico. Cada traçado representa a média  $\pm$  o desvio padrão. Os gráficos são representativos de dois experimentos realizados em triplicata, e a análise estatística foi determinada através do programa Graph.Pad prism 5.0 utilizando o teste Anova e Dunnett com  $p < 0,0001$ .

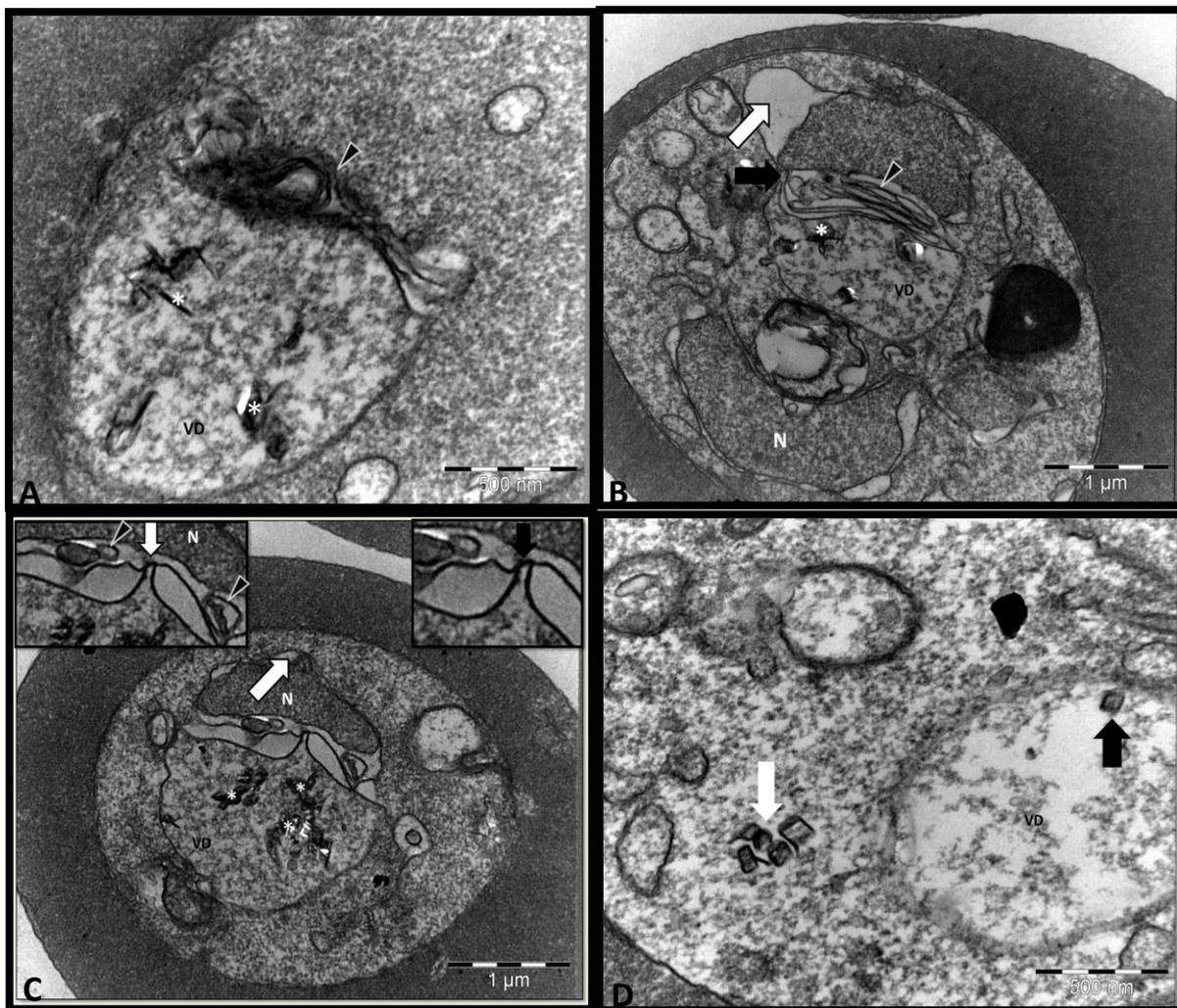
## 6.9 Avaliação dos alvos celulares das drogas

Na tentativa de identificar possíveis alvos celulares e eventuais mecanismos de ação das substâncias, foi realizada a técnica de microscopia eletrônica de transmissão com as drogas isoladas e em combinação. A **figura 21** mostra as células controle com as características normais de fase evolutiva, núcleo apresentando eletron densidade característica, os cristais de hemozoína bem determinados, com a conformação padrão e ocupando o vacúolo digestivo. A **figura 22** apresenta células tratadas com o dissulfiram, em que se observa uma desorganização estrutural do parasito. Os cristais de hemozoína apresentam conformação delgada, com membranas na periferia do vacúolo digestivo, além de uma porção eletrodensa do parasito em associação com o vacúolo. Ocorreram dilatações proeminentes do retículo endoplasmático que circunscribe o núcleo. A **figura 23** mostra células tratadas com a  $IC_{50}$  do dissulfiram, onde o vacúolo digestivo do parasito apresentava estruturas, possivelmente, cristais de hemozoína delgados e/ou desestruturados. Foi verificada a formação de figuras de mielina no citoplasma, associadas ao vacúolo digestivo e compartimentos de natureza presumivelmente autofágica. Assim como na figura 20, foram visualizadas dilatações do retículo endoplasmático que compõem o envoltório nuclear. Ao tratar os parasitos com a  $IC_{50}$  do DETC, **figura 24**, observou-se a presença de vacúolo autofágico, contendo membranas e cristais de hemozoína polimórficos. Observamos também a dilatação de cisternas de retículo endoplasmático que compõem o envelope nuclear. Foi verificada a frequente presença de membranas na periferia dos vacúolos digestivos. Na **figura 25**, verificou-se a presença de um grande compartimento eletron denso com as mesmas características do citoplasma do eritrócito. Muitos parasitos apresentaram vacuolização citoplasmática e membranas associadas aos cristais de hemozoína, com associada inclusão lipídica. Alguns parasitos apresentaram cristais de hemozoína dispersos pelo citoplasma e acentuada desorganização estrutural da célula. Na **figura 26** pode-se observar a presença de vacúolos contendo membrana, estrutura indicativa de vacúolos autofágicos. Observou-se estrutura semelhante ao vacúolo digestivo do parasito com possíveis cristais de hemozoína completamente alterados. A **figura 27** exhibe o parasito com vacúolo contendo membranas, e presença de compartimento em aparente fusão com vacúolo. Observou-se vacúolo digestivo contendo cristais de hemozoína. Notou-se a presença de compartimentos autofágicos em associação ao vacúolo digestivo, contendo hemozoína. Na **figura 28**, é possível observar grandes

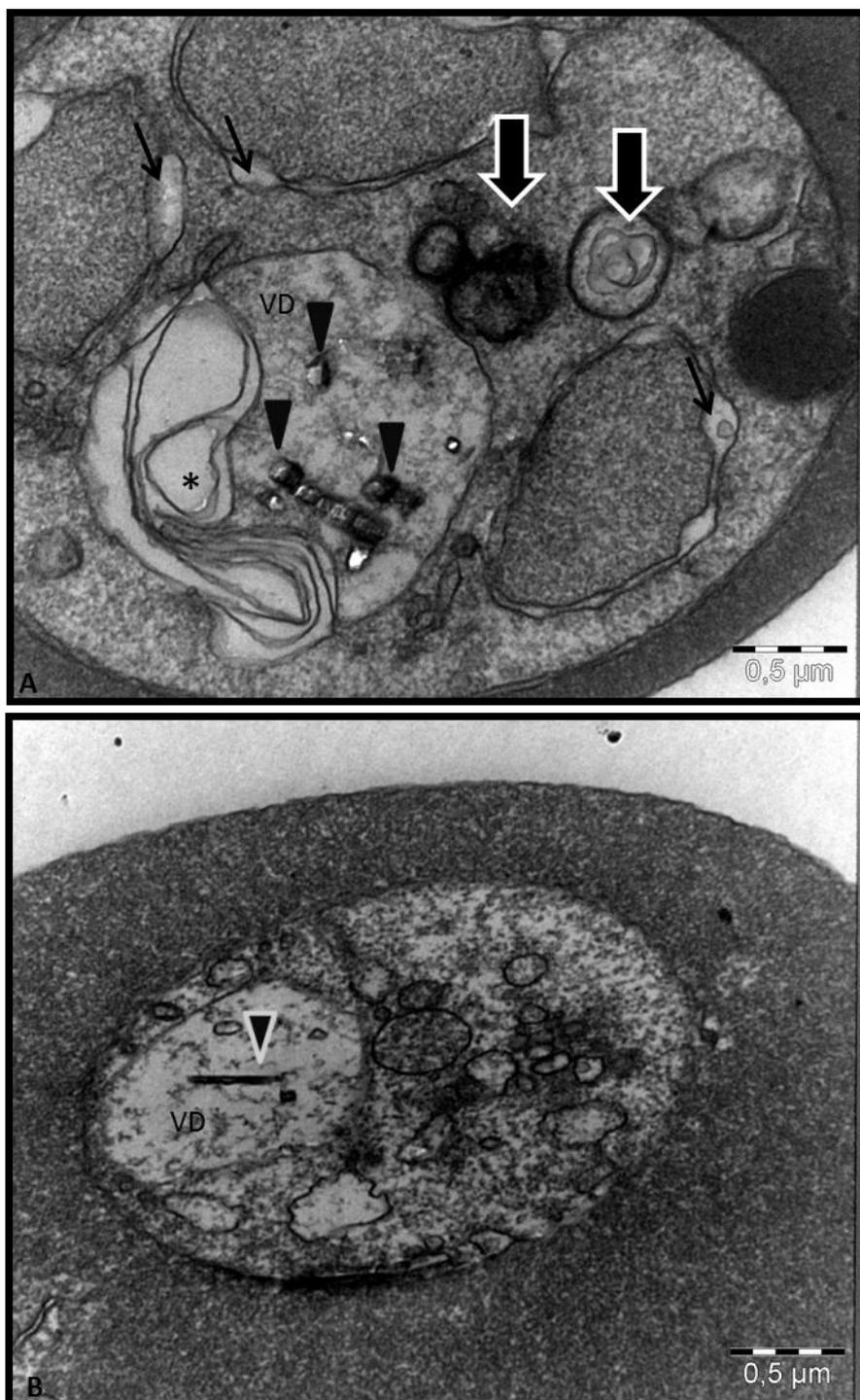
áreas com conteúdo do citoplasma do eritrócito, além de dilatações do retículo endoplasmático. Os vacúolos digestivos apresentam cristais de hemozoína, além de material amorfo.



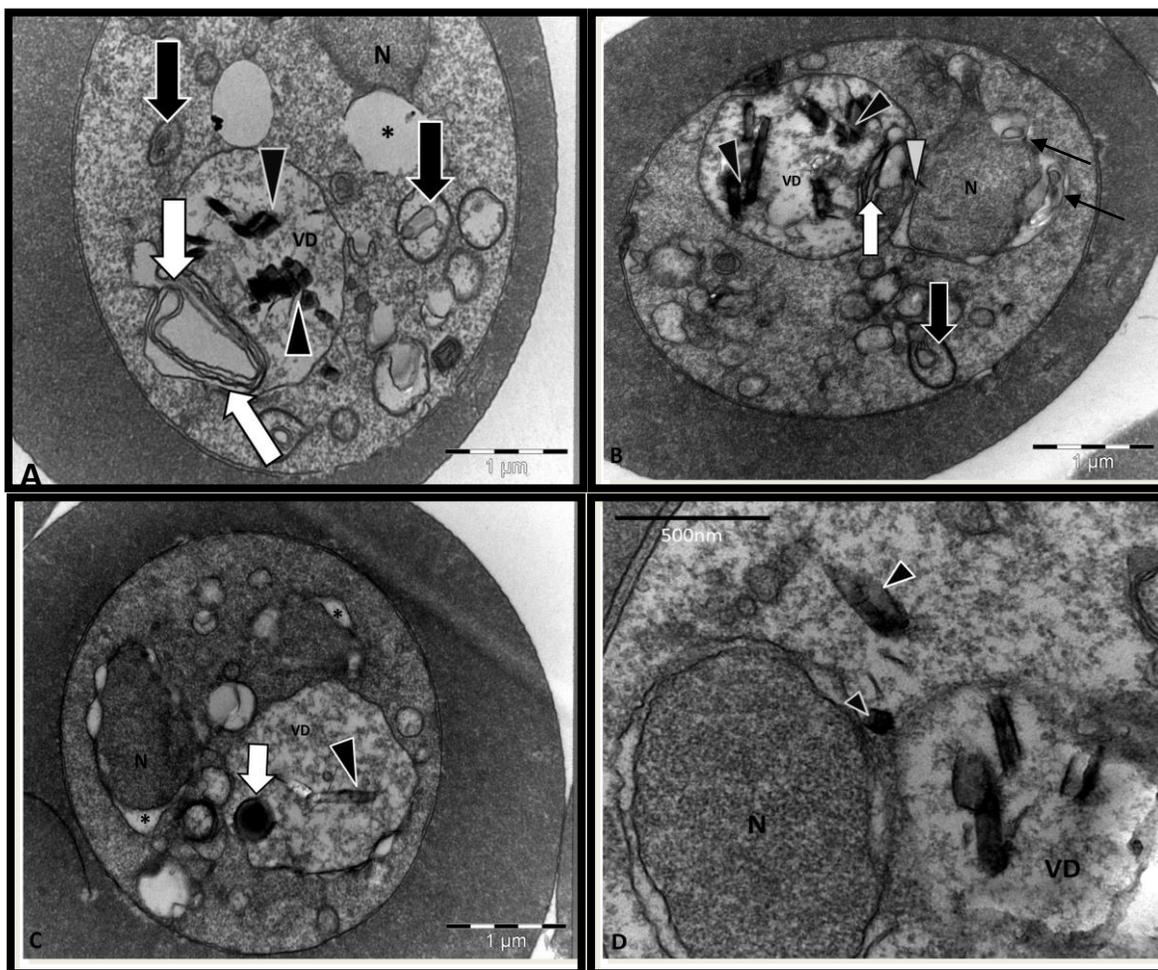
**Figura 21: Análise Ultraestrutural de *Plasmodium falciparum* em Eritrócitos Humanos.** Microscopia eletrônica de transmissão realizada com hemácias infectadas sem tratamento, sincronizadas, com parasitemia de 10%. É possível observar nas figuras A e B que a disposição das organelas do parasito é característica da fase evolutiva, os núcleos (N) apresentam eletrondensidade normal, os cristais de hemozoína (\*) estão com a conformação padrão no interior dos vacúolos digestivos (VD). Para a realização da microscopia, fez-se necessário previamente concentrar as células com percoll. Foram observadas em torno de 140 células e apresentadas as características que foram encontradas em mais de 60% das células.



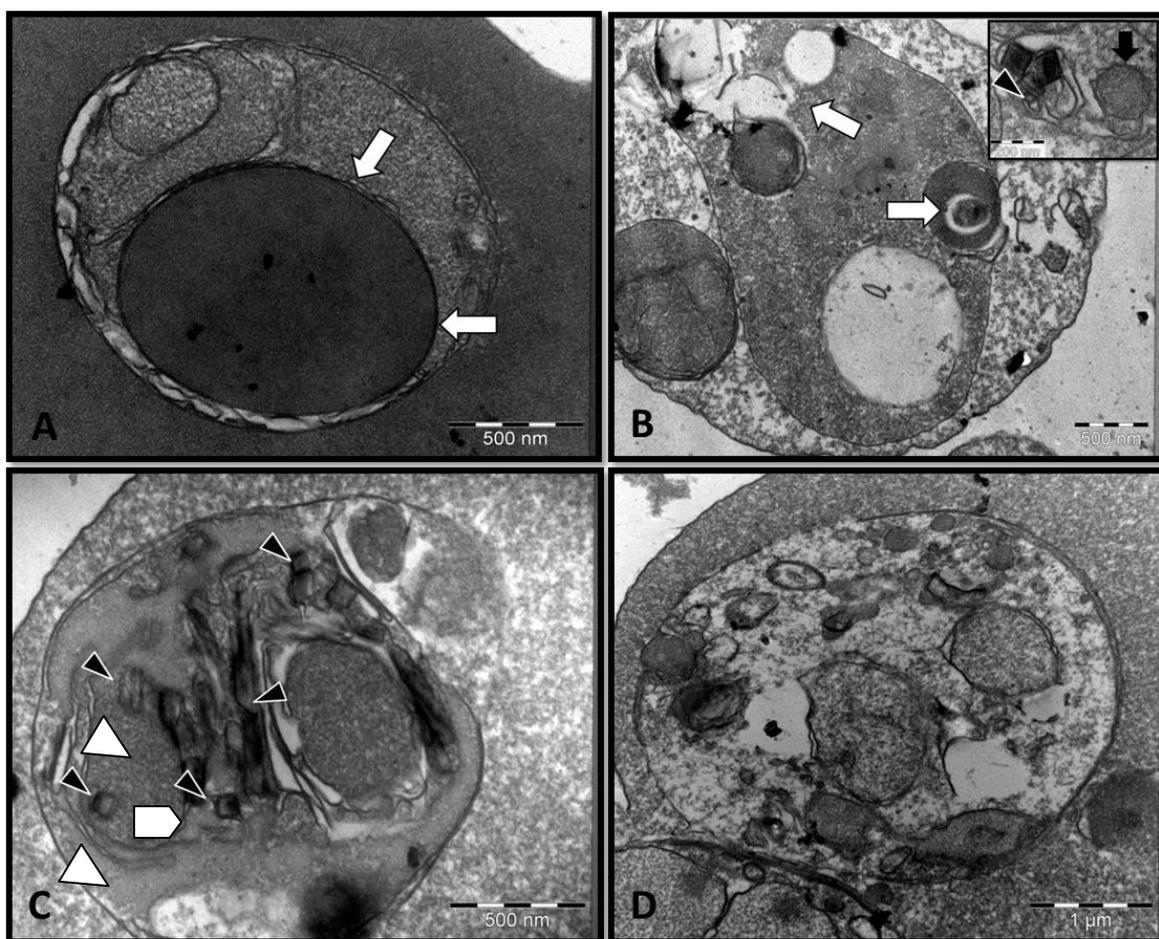
**Figura 22: Microscopia eletrônica de transmissão de hemácias infectadas por *Plasmodium falciparum* tratadas com dissulfiram.** MET de hemácias infectadas, com parasitemia de 10% e sincronizadas, tratadas com a  $IC_{50}$  do dissulfiram por 24 horas. Para concentrar as células infectadas foram enriquecidas em gradientes de Percoll. É possível observar a desorganização estrutural dos parasitos (A-D). Observamos a formação de cristais delgados (A, \*) ou subdesenvolvidos (B, \*) de hemozoína, além da presença de membranas na periferia do vacúolo digestivo (VD, pontas de seta). As figuras B e C apresentam dilatação (setas brancas) do retículo endoplasmático (RE) que circunscribe o compartimento nuclear (N). Observamos também a membrana do retículo em continuação com a membrana do vacúolo digestivo (B, seta preta). Foi observada a justaposição das membranas do vacúolo digestivo (C, VD) e o envoltório nuclear (insets, setas), o qual apresenta material membranar luminal (pontas de seta). Na figura D observamos cristais de hemozoína localizados tanto no vacúolo digestivo (seta preta), quanto livres no citoplasma (seta branca), indicando a ruptura da membrana deste compartimento. As alterações apontadas foram observadas em no mínimo 60% das imagens e foram avaliadas em torno de 100 células.



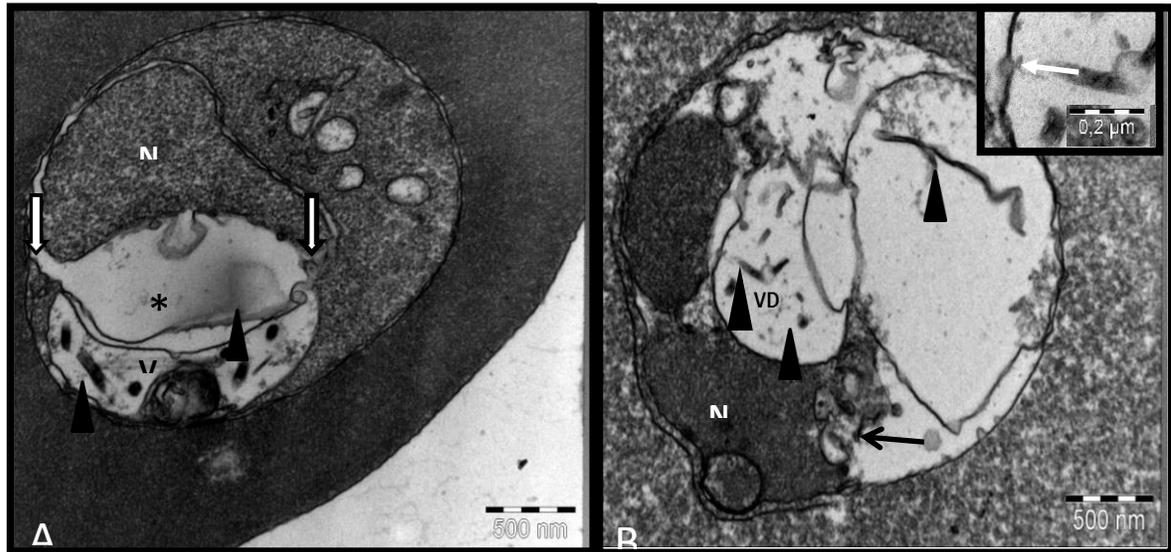
**Figura 23: Microscopia eletrônica de transmissão de hemácias infectadas por *Plasmodium falciparum* tratadas com dissulfiram.** MET de hemácias infectadas, com parasitemia de 10%, sincronizadas e tratadas com a IC<sub>50</sub> do dissulfiram por 24 horas. Para concentrar as células infectadas, foram enriquecidas com gradientes de Percoll. Observamos nos vacúolos digestivos (VD) cristais de hemozoína (pontas de seta) desestruturados (A) e/ou delgados (B). A figura A apresenta a formação de figuras de mielina associadas ao vacúolo digestivo (VD, \*) e compartimentos autofágicos (setas largas) e dilatações do retículo endoplasmático (setas finas). As alterações apontadas foram observadas em no mínimo 60% das imagens e foram avaliadas em torno de 100 células.



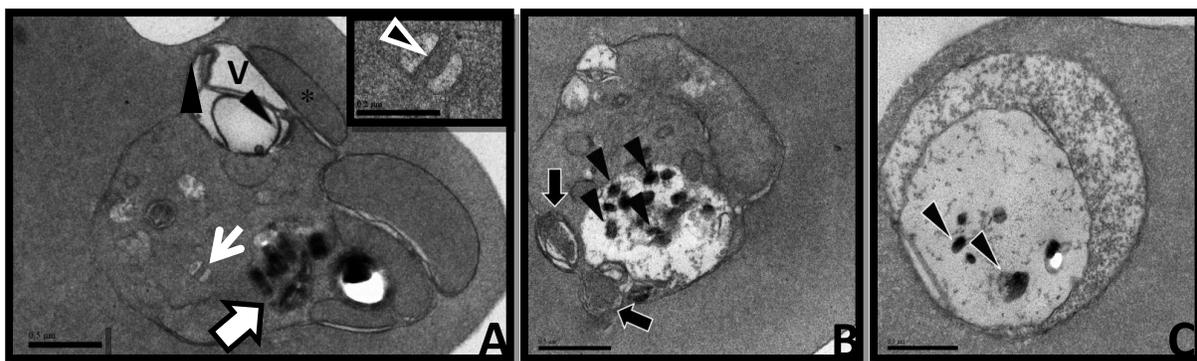
**Figura 24: Hemácias infectadas por *P. falciparum* tratadas com a  $IC_{50}$  do DEET por 24 horas.** Microscopia eletrônica de transmissão realizada com hemácias infectadas com parasitemia de 10%, sincronizadas e tratadas com a  $IC_{50}$  do DEET por 24 horas. Observou-se vacúolo autofágico (A e B, seta preta). Também foram observadas alterações nucleares (B, seta fina). Cristais de hemozoína (pontas de seta pretas, A-D), inclusive dispersos no citoplasma celular (D, pontas de seta pretas). Dilatação de cisternas de retículo endoplasmático (\*, A - D) que compõem o envelope nuclear (N). Presença de inclusão lipídica (A e B, seta branca) associada ao vacúolo digestivo (VD). Na figura B, verificou-se a continuidade da membrana do vacúolo digestivo com a do retículo endoplasmático que circunscreve o núcleo (ponta de seta branca). Foram avaliadas aproximadamente 80 células e todas as alterações apontadas foram observadas em no mínimo 60% das células. O método de concentração do percoll foi utilizado com o objetivo de concentrar as células infectadas.



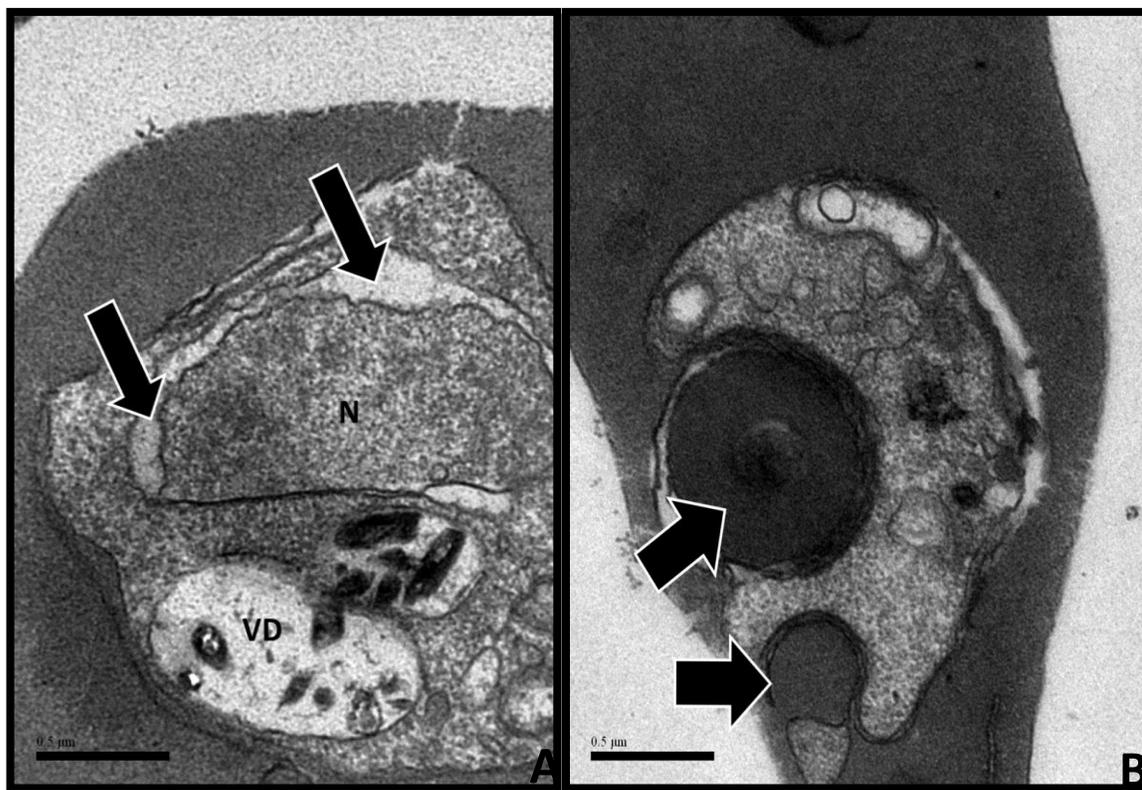
**Figura 25: Hemácias infectadas por *P. falciparum* tratadas com a IC<sub>50</sub> da curcumina.** Microscopia eletrônica de transmissão de hemácias infectadas, sincronizadas e com parasitemia de 10% e tratadas com a IC<sub>50</sub> da curcumina por 24 horas. Na Figura A, observa-se compartimento eletrondenso (setas brancas) semelhante ao citoplasma do eritrócito. Vacuolização citoplasmática (B, setas) e membranas associadas aos cristais de hemozoína (inset, ponta de seta), associada inclusão lipídica (seta preta). Cristais de hemozoína dispersos pelo citoplasma (C, pontas de seta) e desorganização estrutural da célula (D). É possível observar a presença de cristais de hemozoína em sobreposição ao núcleo (C, ponta de seta branca) e no lúmen do envoltório nuclear (C, pentágono). Foram avaliadas aproximadamente 70 células e todas as alterações apontadas foram observadas em no mínimo 60% das células. O método de concentração do percoll foi utilizado com o objetivo de concentrar as células infectadas.



**Figura 26: Hemácias infectadas por *P. falciparum* tratadas com a  $IC_{50}$  da curcumina.** Microscopia eletrônica de transmissão de hemácias infectadas, sincronizadas e com parasitemia de 10% e tratadas com a  $IC_{50}$  da curcumina por 24 horas. Figura A observa-se a perda da organização celular e a presença de cristais de hemozoína (pontas de seta) com alteração na conformação. Na figura B, nota-se estrutura semelhante ao vacúolo digestivo (VD) do parasito com possíveis cristais de hemozoína (pontas de seta), e também a continuidade da membrana do retículo endoplasmático que circunscreve o núcleo em associação com a membrana do vacúolo digestivo (A, setas brancas), além de extensa dilatação da membrana do núcleo (\*). Observa-se a presença de destruição nuclear (B, seta preta) e de perda de continuidade da membrana do vacúolo digestivo (B, inset seta branca). Foram avaliadas aproximadamente 70 células e todas as alterações apontadas foram observadas em no mínimo 60% das células. O método de concentração do percoll foi utilizado com o objetivo de concentrar as células infectadas.



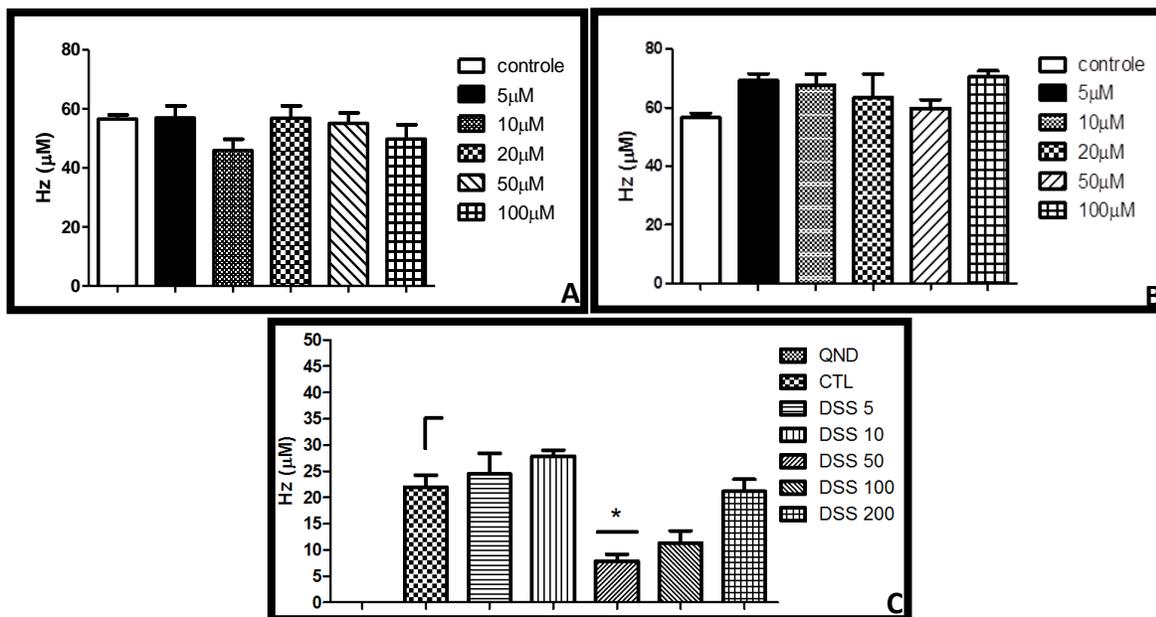
**Figura 27: Hemácia infectada com *P. falciparum* tratada com a combinação das drogas dissulfiram e curcumina (IC<sub>50</sub>) durante 24 horas.** Microscopia eletrônica de transmissão de hemácias infectadas, sincronizadas e com parasitemia de 10%, tratadas com a combinação da IC<sub>50</sub> das drogas curcumina e dissulfiram por 24 horas. Na figura A, observa-se vacúolo (V) apresentando membranas (pontas de seta) e compartimento (\*) em aparente fusão com vacúolo. Vacúolo digestivo contendo cristais de hemozoína (seta larga) e estrutura cristalóide (seta branca), inset demonstrado presença de membrana associada ao cristalóide (ponta de seta). Na figura B, compartimentos autofágicos (setas) e hemozoína (pontas de seta negras) com estrutura alterada. Em C, parasito com vacúolo digestivo e cristais de hemozoína (pontas de seta) com formato alterado. Foram avaliadas aproximadamente 60 células e todas as alterações apontadas foram observadas em no mínimo 60% das células. O método de concentração do percoll foi utilizado com o objetivo de concentrar as células infectadas.



**Figura 28:** Microscopia eletrônica de transmissão de hemácia infectada por *Plasmodium falciparum* tratada com a  $IC_{50}$  do DETC combinada com a  $IC_{50}$  da curcumina, por 24 horas. Microscopia eletrônica de transmissão de hemácias infectadas, sincronizadas e com parasitemia de 10% tratadas com a combinação da  $IC_{50}$  das drogas curcumina e DETC por 24 horas. Dilatações do retículo endoplasmático (A, setas) que delimitam o núcleo (N). Os vacúolos digestivos (VD) apresentam cristais de hemozoína (\*). Áreas com citoplasma do eritrócito (B, setas). Foram avaliadas aproximadamente 50 células e todas as alterações apontadas foram observadas em no mínimo 60% das células. O método do percoll foi utilizado com o objetivo de concentrar as células infectadas.

### 6.10 Avaliação do efeito dos compostos sobre a inibição da hemozoína *in vitro*

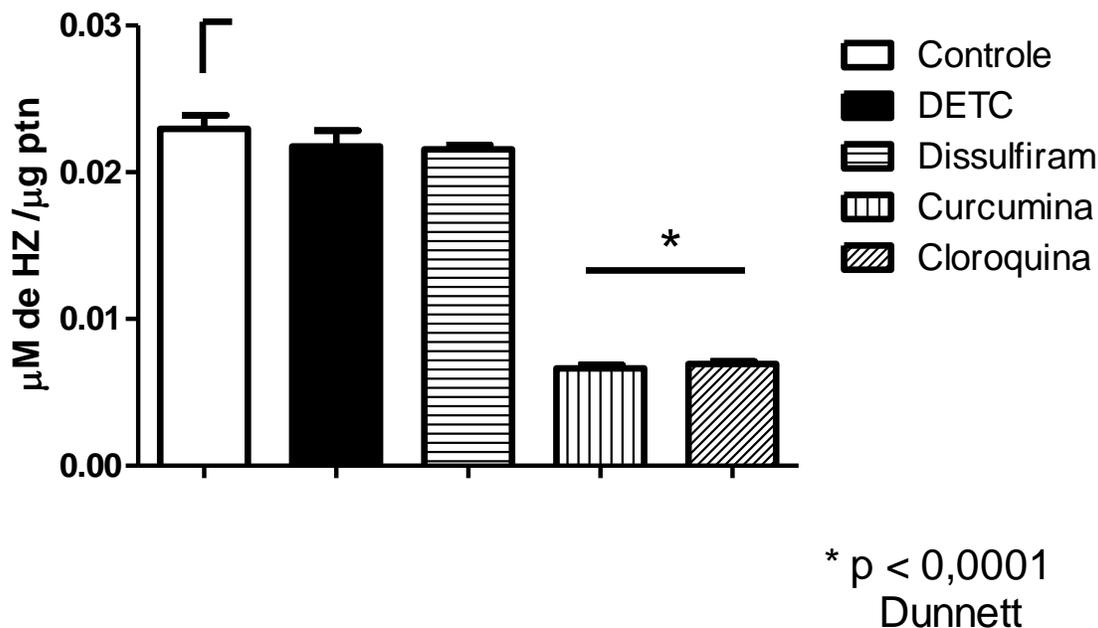
Tendo em vista que a formação da hemozoína é um processo metabólico extremamente importante para a sobrevivência e manutenção do ciclo do *Plasmodium falciparum* e que os achados da microscopia eletrônica indicavam alterações na estrutura do cristal, foram avaliados *in vitro* os possíveis efeitos das substâncias sobre esse processo, visando a verificar se o mecanismo de ação das drogas estava relacionado com este processo. Para isso, incubamos as drogas com hemina, SDS, tampão acetato e mantivemos por um período de 24 horas. A concentração de hemozoína foi determinada através de uma curva padrão de hemina. Foram utilizadas variadas concentrações das drogas e observa-se na **figura 29 A** que a curcumina não exerceu nenhum efeito sobre a formação do cristal *in vitro*. Ao avaliar o efeito do DETC (**B**), também foi verificado que, como a curcumina, ele não foi capaz de inibir a formação do cristal *in vitro*. Ao realizar a avaliação do dissulfiram (**C**), observou-se que apenas as concentrações mais elevadas apresentavam algum efeito, o que indica que não é o mecanismo de ação, tendo em vista que o valor da  $IC_{50}$  do composto é bem inferior à concentração capaz de inibir a formação do cristal *in vitro*.



**Figura 29: Efeito das drogas sobre a formação da hemozoína *in vitro*.** Foram incubadas diferentes concentrações das drogas com hemina, SDS, tampão acetato por 24 horas. Após esse período, avaliou-se o total de cristal formado através do espectrofotômetro a 400nm. A curva padrão foi realizada com diferentes concentrações de hemina. Figura **A**, avaliação do efeito da curcumina, em **B**, efeito do DETC e em **C**, efeito do dissulfiram, pelo método *in vitro* (item 5.21), as drogas não exercem efeito sobre a formação do cristal, nas concentrações testadas. Esses gráficos são representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada pela análise de variância utilizando o programa Graph.Pad prism 5.0.

### 6.11 Avaliação da inibição da formação de hemozoína com extrato do parasito

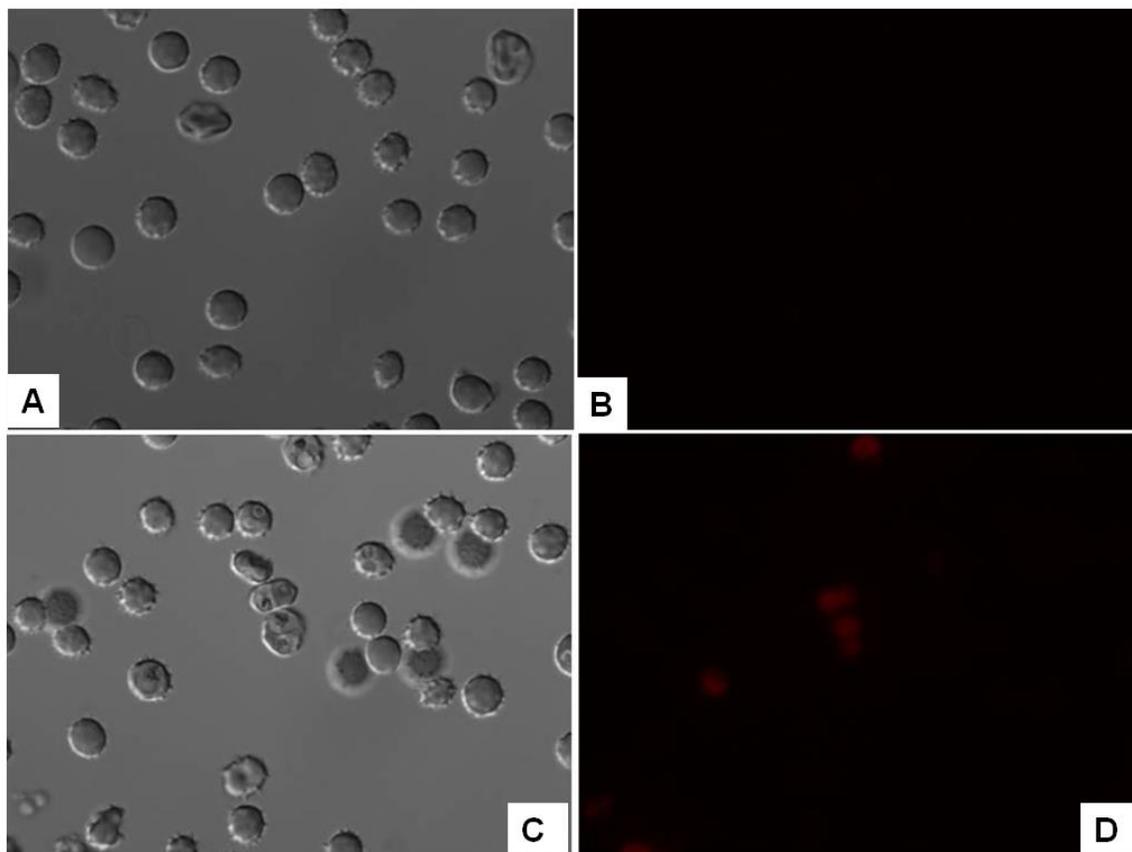
Uma vez que os achados de microscopia eletrônica de transmissão indicaram fortemente a lentificada formação de hemozoína, avaliamos se componentes do parasito *per se* poderiam estar envolvidos na biogênese do cristal (figura 30). Assim sendo, foram utilizados os homogenatos. Para isso, incubamos os parasitos na presença da IC<sub>50</sub> dos compostos e após 24 horas de incubação, seguiu-se com o método de isolamento do parasito e extração do cristal e normalizamos os dados por µg de proteína de parasito. A cloroquina foi utilizada como controle positivo. A partir deste método, foi possível observar que a IC<sub>50</sub> da curcumina foi capaz de inibir a formação do cristal na mesma proporção que a cloroquina, o que corrobora com os achados da microscopia eletrônica de transmissão. Nem o dissulfiram e nem o DETC foram capazes de inibir a formação do cristal, mantendo os níveis semelhantes ao do controle.



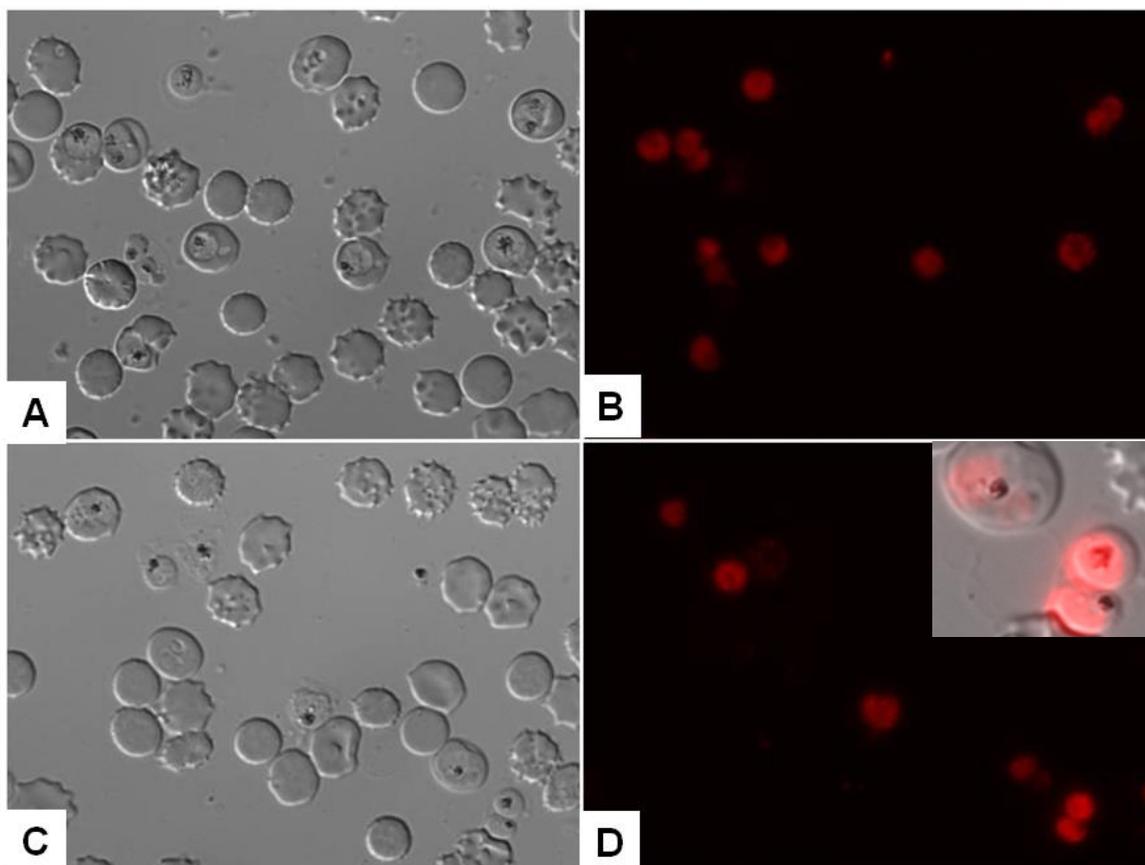
**Figura 30: Dosagem de hemozoína ( $\mu\text{M}/\mu\text{g}$  de proteína) de *Plasmodium falciparum* tratado com a  $\text{IC}_{50}$  das drogas.** Parasitos foram incubados com a  $\text{IC}_{50}$  das drogas por 24 horas, após esse período, isolamos o parasito da hemácia e seguimos com o protocolo de extração do cristal, usando homogenatos de parasitos isolados. A  $\text{IC}_{50}$  da curcumina inibiu a formação do cristal na mesma proporção que a  $\text{IC}_{50}$  da cloroquina. A detecção da quantidade de hemozoína foi feita em espectrofotômetro a 400 nm e a quantidade de hemozoína formada foi determinada por curva padrão, utilizando a hemina. A análise estatística foi realizada utilizando o Graph.Pad.prism e pela ANOVA ( $p < 0,0001$ , Dunnett). Esse gráfico é representativo de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

### 6.12 Avaliação da presença de espécies reativas ao oxigênio após o tratamento com as drogas

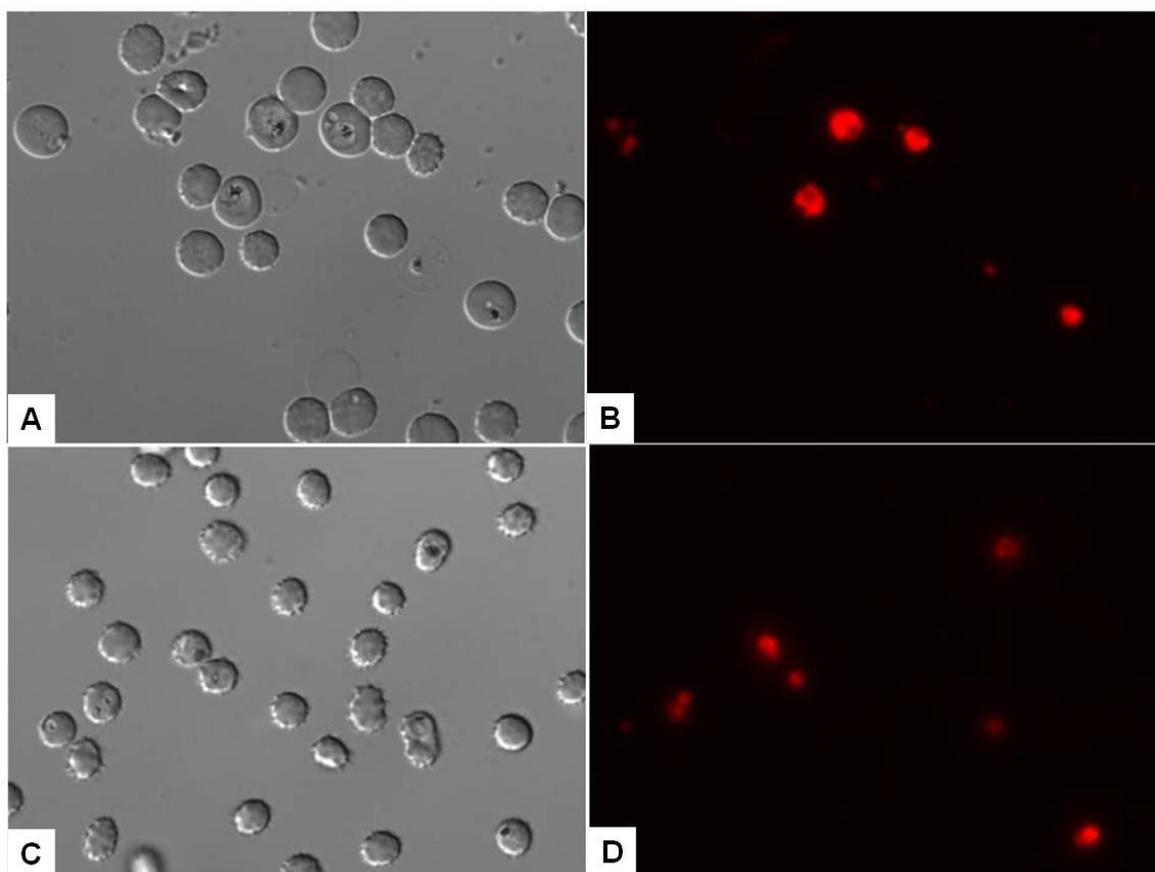
Tendo em vista a capacidade de produção de ERO (espécies reativas do oxigênio) induzida pelos fármacos testados, conforme descrito pela literatura, e os achados de microscopia eletrônica que demonstravam alterações celulares que poderiam estar associadas ao aumento intracelular dos níveis de radicais livres, avaliamos através da microscopia de fluorescência a geração de EROs, através da sonda fluorescente dihidroetídio (DHE). Como o *Plasmodium falciparum* é um parasito intracelular, a microscopia de fluorescência surge como uma ferramenta auxiliar, pois com ela é possível associar a fluorescência à presença do parasito. As células foram tratadas com 10 µg/mL das drogas. Essa concentração foi selecionada, pois como o objetivo era avaliar a indução inicial dos EROS em um curto tempo (2 horas), fazia-se necessário utilizar concentração superior à IC<sub>50</sub>. Na **figura 31** podemos observar hemácias não infectadas (A, B) e hemácias infectadas com o *P. falciparum* controle solvente (C, D). As imagens nos mostram que a marcação da sonda só é verificada na presença do parasito. Observamos também que o controle com solvente apresentou uma leve fluorescência (D) que não foi observada nas hemácias não infectadas (B). Na **figura 32**, temos hemácias infectadas tratadas com o DETC (A, B) e com a curcumina (C, D), ambas as drogas na concentração de 10µg/mL por duas horas. Podemos observar que o tratamento com as drogas aumenta a intensidade de fluorescência quando comparada ao controle com o DMSO, indicando que as drogas induzem um aumento nos níveis de EROs intracelular no parasito. A **figura 33** representa a co-incubação do DETC (A, B) e da curcumina com o antioxidante N-acetil-cisteína (NAC), utilizado para demonstrar o efeito protetor de um antioxidante frente à produção de EROs intracelulares. Entretanto, não observamos diminuição na intensidade de fluorescência ao usar este antioxidante.



**Figura 31: Detecção de espécies reativas ao oxigênio pela sonda DHE em hemácias infectadas com *P. falciparum*.** A, C contraste de fase e B, D fluorescência de hemácias incubadas com a sonda DHE (Dihidroetídio). Hemácias não infectadas (A, B) ou infectadas com *Plasmodium falciparum* na fase de trofozoíto adulto com o solvente (DMSO) (C, D). Observa-se que as hemácias não infectadas não apresentam fluorescência (B) e que o controle com solvente apresenta leve fluorescência, associada à presença do parasito (D). A concentração do solvente foi igual à maior concentração do mesmo, quando utilizado com os compostos. Essas imagens são representativas de dois experimentos independentes.



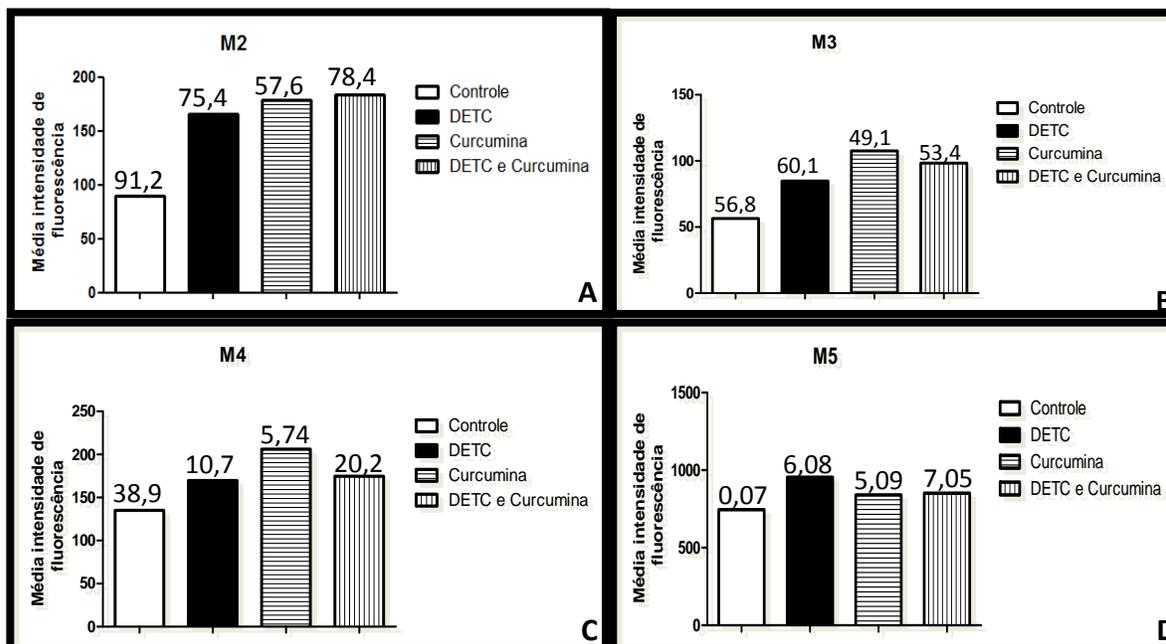
**Figura 32: Detecção de espécies reativas ao oxigênio pela sonda DHE em hemácias infectadas com *P. falciparum* tratadas com DETC e com a curcumina.** A e C- contraste de fase e B e D- fluorescência para DHE de hemácias infectadas com trofozoítos de *P. falciparum* tratadas com DETC a  $10\mu\text{g/mL}$  por 2 horas (A, B). Tanto o tratamento com o DETC (B) quanto com a curcumina (D) elevaram os níveis intracelulares de EROs. Observa-se que a distribuição de EROs no parasito é de forma disseminada. Células incubadas com  $10\mu\text{g/mL}$  de curcumina por 2 horas (C, D). Essas imagens são representativas de dois experimentos independentes.



**Figura 33: Detecção de espécies reativas ao oxigênio pela sonda DHE em hemácias infectadas com *P. falciparum* tratadas com DETC e com a curcumina co-incubadas com o NAC (*N*-acetil-cisteína). A, C contraste interferencial e B, D fluorescência para DHE de hemácias infectadas com *P. falciparum* na fase de trofozoíto tratadas com *N*-acetil-cisteína a 10µg/mL por 2 horas e co-incubadas com DETC a 10µg/mL (A, B) ou curcumina a 10µg/mL (C e D). Observou-se que o tratamento com o antioxidante não foi capaz de reverter as marcações promovidas pelo tratamento com as drogas. Essas imagens são representativas de dois experimentos independentes.**

### 6.13 Quantificação dos níveis de EROs pela sonda DHE através da citometria de fluxo

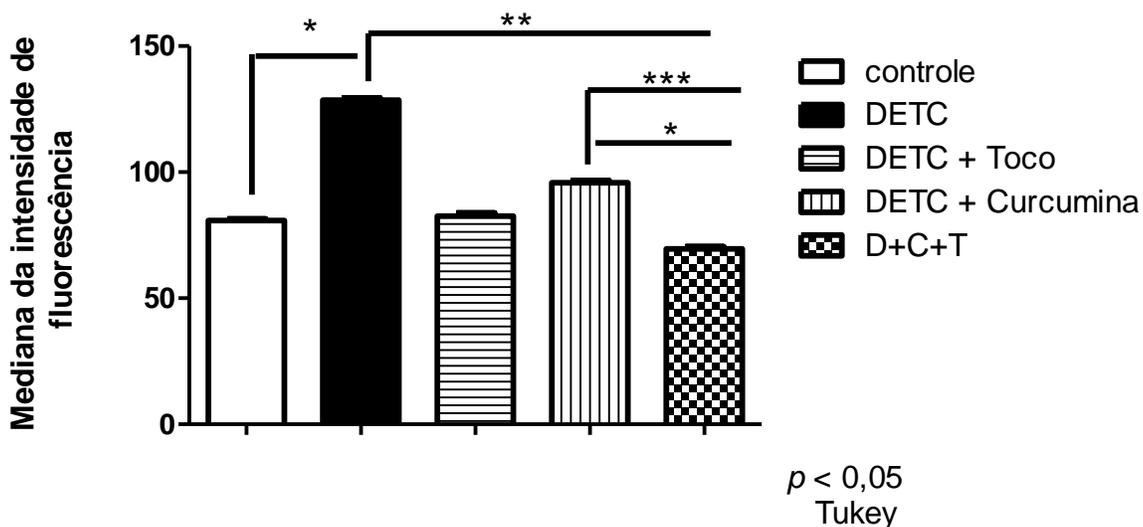
Após verificarmos que a fluorescência expressa pela sonda estava restrita ao parasito e que ocorria um aparente aumento da geração de espécies reativas por parte das substâncias testadas, quantificamos, através da citometria de fluxo, o aumento da geração de espécies reativas nas hemácias infectadas por *Plasmodium falciparum* (figura 34). Para isso, incubamos as células com 10µg/mL das drogas por 2 horas e 10µM de DHE. Foi feita leitura no citômetro de fluxo, sendo observado o aparecimento de 4 populações distintas, as quais não foi possível determinar, que classificamos como M2 figura 34 **A** (média de todas as populações), M3 figura 34 **B**, M4 figura 34 **C** e M5 figura 34 **D**. Ao analisarmos os dados da média de todas as populações (M2) figura 34 **A**, podemos verificar que o DETC, a curcumina e a combinação dos dois promove um aumento nos níveis de EROs do parasito. A combinação aumentou também a quantidade de indivíduos expressando fluorescência. O controle apresentou fluorescência em grande parte da população, o que era esperado tendo em vista que o *P. falciparum* vive em um ambiente extremamente oxidante. A curcumina promoveu maior aumento na intensidade de fluorescência (**figura 34 B**), porém houve uma diminuição na população. O DETC e a combinação também mantiveram maiores níveis de fluorescência que o controle. A figura 34 **C** mostra o mesmo padrão da figura **B**, a curcumina aumentou a intensidade de fluorescência quando comparada à célula não tratada. Entretanto, a porcentagem da população fluorescente foi inferior às outras condições. Quando combinada ao DETC, a intensidade de fluorescência permaneceu semelhante à da curcumina isolada, porém ocorreu aumento da porcentagem da população expressando a fluorescência. Na figura 34 **D** houve um incremento tanto na intensidade quanto na porcentagem da população expressando fluorescência para todas as drogas testadas quando comparadas ao controle. Os dados exibidos pela citometria de fluxo corroboram com o que foi observado na microscopia de fluorescência.



**Figura 34: Avaliação da presença de EROs intracelular em hemácias infectadas com *P. falciparum* após o tratamento com o DETC, a curcumina e a combinação destes compostos.** As hemácias parasitadas foram incubadas com 10 $\mu$ g/mL dos compostos por um período de 2 horas, após o tratamento as células foram lavadas e incubadas com a sonda DHE a 10 $\mu$ M por 10 minutos e posteriormente a intensidade de fluorescência foi avaliada através da citometria de fluxo. Na figura A temos a média da intensidade de fluorescência de todas as populações, e nas figuras B, C e D observamos a média da intensidade de fluorescência para cada população individualmente. Verificou-se que, de uma maneira geral, a incubação com as drogas promove um aumento na média da fluorescência e que existe uma variação na frequência da população marcada. Os valores expressos acima das barras representam a porcentagem da população positivamente marcada. O coeficiente de variação (CV) de cada gráfico pode ser observado nos dados da citometria que constam no apêndice A.2 da tese. Esses gráficos são representativos de dois experimentos independentes.

#### 6.14 Detecção de superóxido mitocondrial em *P. falciparum*

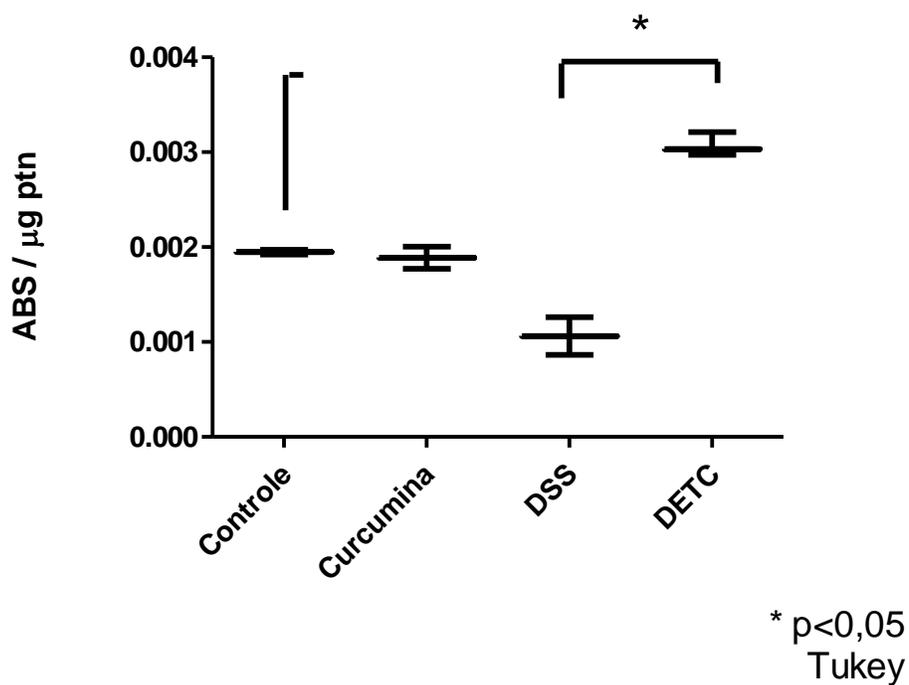
A partir da observação do aumento dos níveis de EROs intracelulares pela utilização da sonda DHE, foi avaliado se esse aumento seria decorrente, ao menos em parte, ao incremento dos níveis de radicais  $O_2^{\cdot-}$  (superóxido), tendo em vista que o DETC é um inibidor da enzima superóxido dismutase. Assim, tratamos as células com as drogas na concentração de  $10\mu\text{g/mL}$ , tanto isoladas quanto combinadas, e avaliamos a possível reversão do efeito do antioxidante co-incubando com  $10\mu\text{M}$  de tocoferol (figura 35). Verificamos então que o tratamento das células com o DETC promove um aumento significativo dos níveis de superóxido mitocondrial e esse efeito é revertido no nível do controle com a co-incubação com o tocoferol. O tratamento com a combinação entre curcumina e DETC promove um aumento na produção de superóxido mitocondrial quando comparada ao controle, entretanto esses níveis são significativamente inferiores aos do DETC. A co-incubação com o tocoferol reverte o efeito pró-oxidante causado pela combinação.



**Figura 35: Avaliação dos níveis de superóxido mitocondrial em hemácias infectadas por *P. falciparum* através da sonda fluorescente MitoSox.** Hemácias infectadas foram incubadas com 10µg/mL dos compostos isolados e combinados por 2 horas. Posteriormente foram lavadas e incubadas com a sonda MitoSox 5µM por 10 minutos e então avaliamos a quantidade de superóxido mitocondrial produzido pelo tratamento. Observamos que o DETC aumenta significativamente os níveis de superóxido mitocondrial. Esse gráfico é referente a dois experimentos realizados independentemente. Os dados correspondem à mediana da intensidade de fluorescência, que foi representativo da média como pode ser observado nos dados brutos do citômetro contidos no apêndice A.3 da tese.

### 6.15 Avaliação da peroxidação lipídica produzida pelo tratamento com as drogas

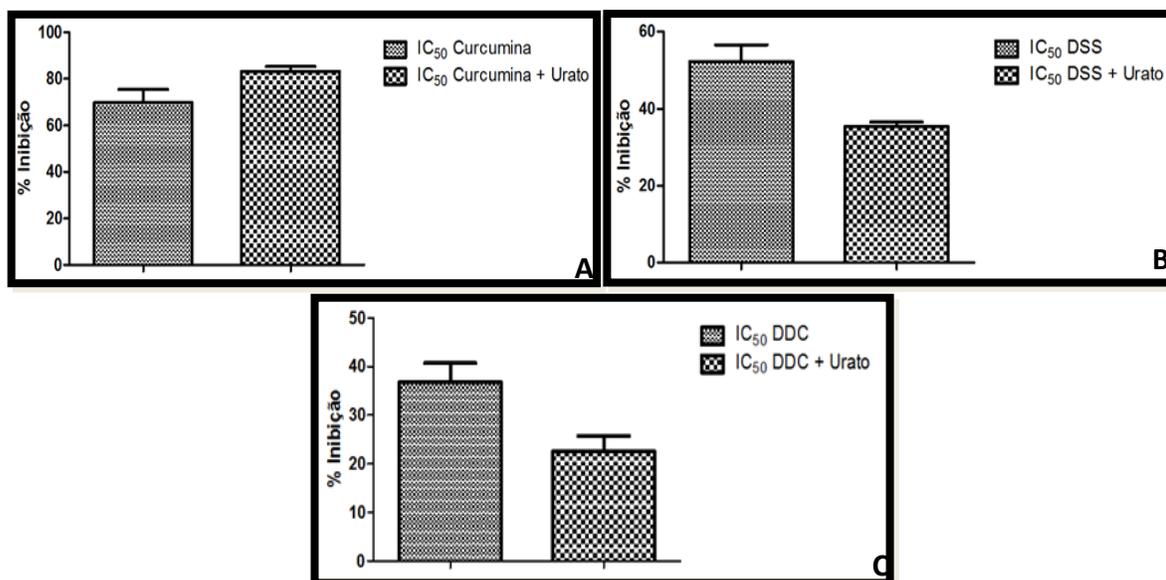
Ao observar a presença de membranas concêntricas *i.e.* figuras de mielina na microscopia eletrônica de transmissão, principalmente associada ao tratamento com o dietildithiocarbamato de sódio e com o dissulfiram e do aumento dos níveis de radicais detectados pela sonda DHE, utilizamos a técnica de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), objetivando verificar a presença de peroxidação lipídica. A produção de peróxidação lipídica é um evento posterior associado ao aumento dos níveis de espécies reativas ao oxigênio. Observa-se na figura 36 que o tratamento com a IC<sub>50</sub> do DETC promove um aumento estatisticamente significativo do malondialdeído (MDA), que é o produto final produzido pela peroxidação lipídica, quando comparado ao controle. O tratamento da curcumina não gera modificação dos níveis de peroxidação lipídica, quando comparadas ao controle. Já o dissulfiram promove a diminuição nos níveis de peroxidação lipídica celular.



**Figura 36: Avaliação da peroxidação lipídica produzida pelo tratamento com as drogas em *P. falciparum*.** Hemácias infectadas foram incubadas com a  $IC_{50}$  das drogas por 24 horas. Após esse período, as hemácias foram rompidas e a peroxidação lipídica foi avaliada nos parasitos isolados pela dosagem de MDA através do método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Observamos que o DETC promove um aumento na peroxidação lipídica celular. Os dados foram normalizados por  $\mu\text{g}$  de proteína do parasito. Esse gráfico é representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata.

#### 6.16 Avaliação do efeito protetor do antioxidante Urato

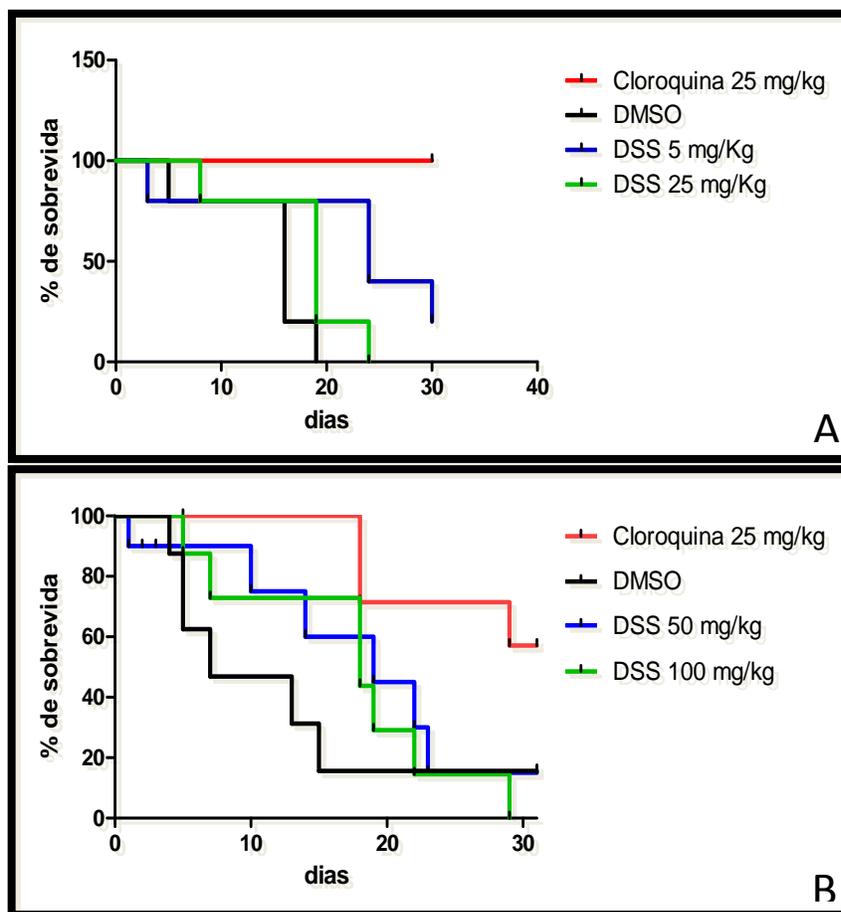
Como os dados prévios mostram um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio, avaliamos o possível efeito protetor do antioxidante urato sobre as culturas de *P. falciparum* submetidos à ação das drogas. Incubamos as células por 24 horas com 10 $\mu$ M de urato e após esse período colocamos as drogas e avaliamos a porcentagem de inibição das drogas sobre o crescimento celular. Observou-se que a pré-incubação com o urato não ocasionou qualquer proteção aos efeitos causados pela curcumina nas culturas de *Plasmodium falciparum* (**figura 37 A**). Na **figura 37 B**, nota-se que o urato não reverteu o efeito do dissulfiram, em níveis estatisticamente significativos, entretanto, é possível verificar que existe uma tendência à reversão na concentração testada. Na **figura 37 C**, verificou-se que a pré-incubação com o urato não reverteu significativamente o efeito do DETC sobre culturas. Entretanto, a concentração testada demonstra uma tendência à reversão do efeito da droga por ação do antioxidante.



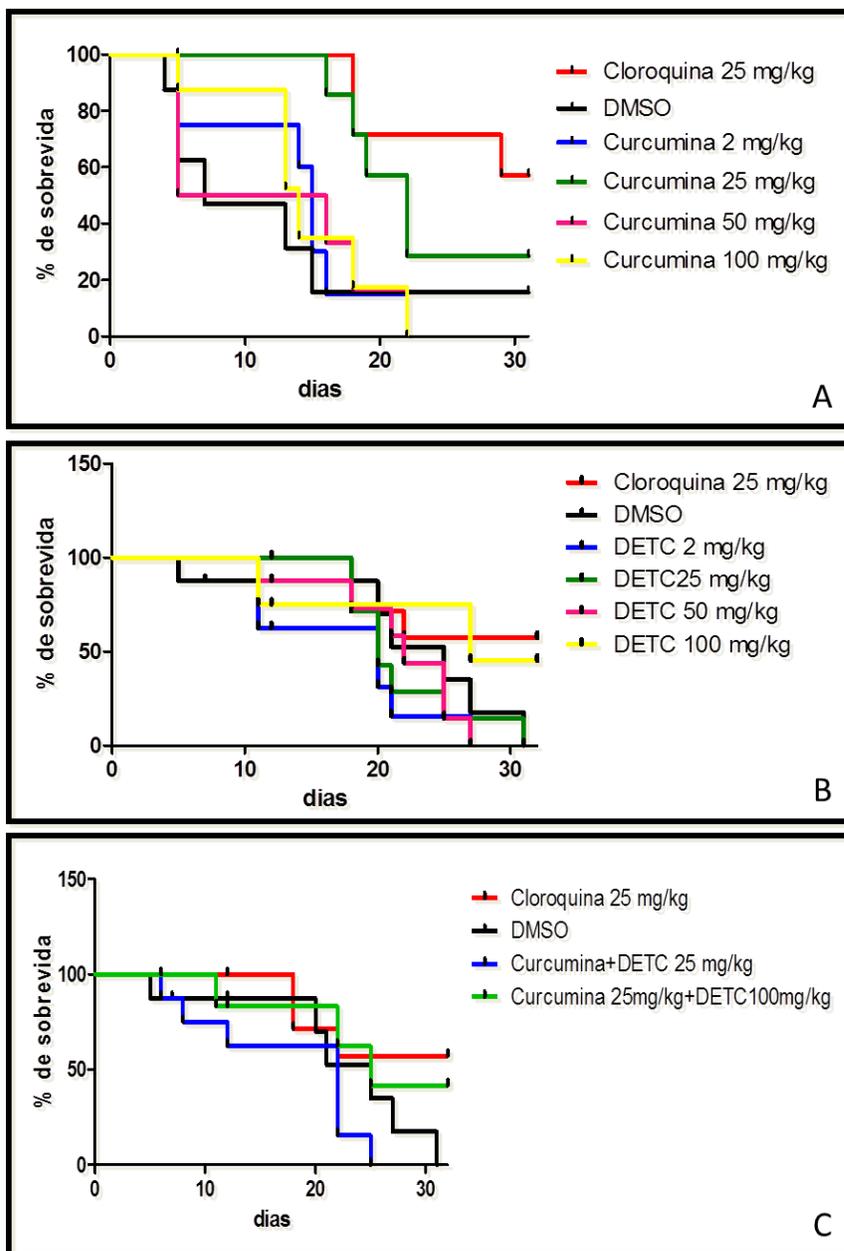
**Figura 37: Avaliação da reversão do efeito antiparasitário das drogas pela ação do antioxidante urato.** Hemácias infectadas foram pré-incubadas com os antioxidantes e após 24 horas foram submetidas à ação das drogas e sua proliferação celular foi avaliada pela técnica de incorporação de hipoxantina tritiada. Observamos que tanto para o dissulfiram quanto para o DETC a pré-incubação com o urato apresenta uma tendência à reversão dos efeitos tóxicos produzidos pelas drogas. Os dados são apresentados com a porcentagem de inibição da proliferação celular em relação ao controle com solvente (DMSO). Na figura A, observamos a ação da curcumina; na figura B, a ação do dissulfiram; e na figura C, ação do DETC. Os gráficos apresentados são representativos de três experimentos independentes em triplicata.

### 6.17 Avaliação do efeito das drogas sobre a sobrevida de camundongos infectados com *P. berghei*

O modelo de malária murina com camundongos, da linhagem swiss webstar, infectados com *P. berghei*, foi utilizado para avaliar a capacidade dos compostos em aumentar a sobrevivência e sobrevida dos animais infectados. A cloroquina a 25mg/kg foi empregada como controle positivo, e o solvente (DMSO) como controle negativo. As taxas de sobrevida foram avaliadas em comparação ao controle negativo. O dissulfiram a 5mg/kg aumentou a sobrevida dos animais em 20%, quando comparado ao DMSO (**figura 38 A**). Essa dose do dissulfiram apresentou melhores efeitos que doses mais altas, como, por exemplo, 50mg/kg que manteve a sobrevida em 15%, mesma taxa observada para o controle negativo (**figura 38 B**). O tratamento não foi capaz de eliminar a infecção (dados não mostrados). Na **figura 39 A** é possível observar que a curcumina a 25mg/kg prolongou a sobrevivência dos animais em aproximadamente 12 dias e manteve a taxa de sobrevida em torno de 28%, o controle negativo manteve uma taxa de sobrevida de aproximadamente 15%. Avaliamos o efeito do DETC (**figura 39 B**) e notamos que dentre as concentrações testadas, a dose de 100mg/kg demonstrou-se mais eficaz, é possível verificar que ela aumentou a sobrevivência dos animais, e apresentou taxa de sobrevida de 45%. A partir da identificação das melhores doses das drogas isoladas, seguimos com a combinação das mesmas. A junção das drogas (**figura 39 C**) apresentou um incremento no tempo de sobrevivência e uma taxa de sobrevida de aproximadamente 42%. Dados semelhantes aos encontrados para as drogas isoladas, porém, vale ressaltar a importância da terapia combinada para o tratamento da malária.



**Figura 38: Avaliação do efeito do disulfiram sobre a sobrevivência cumulativa de camundongos swiss webstar infectados com *Plasmodium berghei*.** Foram infectadas com  $1 \times 10^5$  células / animal. A parasitemia foi de 10% e o hematócrito de 2,5%. Após a infecção, esperou-se 48 horas para confirmação da infecção, e só então se iniciou o tratamento, que foi mantido por 5 dias consecutivos. Observou-se que o dissulfiram a 5mg/kg apresentou os melhores efeitos sobre a sobrevivência dos animais. Os animais foram avaliados por 30 dias consecutivos.



**Figura 39: Avaliação da sobrevida cumulativa de camundongos infectados com *P. berghei* tratados com curcumina (A), DETC (B) e a combinação delas (C).** Animais foram infectados com  $1 \times 10^5$  células / animal a partir de um doador. A parasitemia foi de 10% e o hematócrito de 2,5%. Após a infecção, esperou-se 48 horas para confirmação da infecção, e só então se iniciou o tratamento, mantido por 5 dias consecutivos. As doses de 100mg/kg de DETC e de 25mg/kg de curcumina foram as melhores para manter a sobrevida dos animais. A sobrevida dos animais foi avaliada por 30 dias corridos.

## 7. DISCUSSÃO

---

Este trabalho demonstrou que o uso combinado da curcumina, do dissulfiram e seu metabólito DETC surge como uma nova estratégia terapêutica para a malária experimental. O DETC e o dissulfiram apresentaram efeito sobre a proliferação de *P. falciparum* com IC<sub>50</sub> entre 20 e 30µM. Trabalhos prévios relatavam o efeito desses compostos sobre o protozoário (SCHEIBEL *et al.*, 1979; MESHNICK *et al.*, 1990), entretanto, empregando cepas e forma de cultivo diferentes.

A curcumina apresentou efeito abaixo dos 10µM. CUI e colaboradores em 2007 avaliaram a susceptibilidade de quatro cepas (duas sensíveis e duas resistentes à cloroquina) de *Plasmodium falciparum* aos efeitos da curcumina e encontraram IC<sub>50</sub> em torno de 20 a 30µM. Os nossos resultados demonstram uma susceptibilidade aproximadamente 2 vezes inferior. REDDY e colaboradores em 2005 encontraram um valor de IC<sub>50</sub> em torno de 5µM. Essas diferenças se devem provavelmente às diferentes cepas utilizadas no estudo, com possíveis variações genéticas entre as mesmas.

Embora a curcumina seja considerada um antioxidante natural, o composto exerce atividade anti-*Plasmodium* associada à geração de EROs (CUI *et al.*, 2007). Essa aparente discrepância é presumivelmente devida ao efeito bimodal dose-dependente da curcumina que, em baixa concentração (*i.e.* 20µM), inibe a produção de EROs, enquanto que na concentração de 100µM, o fármaco mostra-se pró-oxidante em células Hep3B (KANG *et al.*, 2005). Entretanto a curcumina pode ser pró-oxidante mesmo em concentrações baixas e induz respostas mediadas por glutathione (LEONG *et al.*, 2012). A curcumina é um potente inibidor da glutathione transferase e é capaz de modular o metabolismo da mesma (HEEBA *et al.*, 2012), enzima implicada em resistência à cloroquina, do *P. falciparum* (MANGOYI *et al.*, 2010). A depleção desta pela produção de EROs pode deflagrar o processo de apoptose (KIZHAKKAYIL *et al.*, 2012). Ela também inibe irreversivelmente a atividade da tioredoxina redutase, através da formação de aductos covalentes e conseqüentemente essa inibição leva a alterações drásticas nas funções redox celulares. Além disso, a proteína modificada possui uma atividade NADPH oxidase, que é capaz de gerar EROs na presença de oxigênio (FANG, LU e HOLMGREN, 2005). A tioredoxina redutase é uma

enzima indispensável para a sobrevivência dos estágios eritrocíticos do *Plasmodium falciparum* (KRNAJSKI *et al.*, 2002).

O DETC (N,N-dietilditiocarbamato) e conseqüentemente seu precursor, o dissulfiram, além da inibição de SOD (HEIKKILA *et al.*, 1978), tem a capacidade de oxidar a glutatona, promovendo o estresse oxidativo (BURKITT *et al.*, 1998; CEN *et al.*, 2002; FLETCHER *et al.*, 1988; RAHDEN-STARÓN *et al.*, 2012). Entre seus principais mecanismos de ação está a formação de múltiplos compostos bioativos, como o CS<sub>2</sub> e o S- metil-N,N-dietilditilcarbamato sulfóxido e sulfona, poderosos agentes causadores de carbamilação em grupos sulfidrilas, podendo assim inibir enzimas com cisteínas em seus sítios ativos (NAGENDRA *et al.*, 1994).

LOO e colaboradores em 2004 mostraram que os metabólitos do dissulfiram exercem efeitos inibitórios sobre a Pgp. Eles provaram que estes efeitos não estão relacionados à inibição da síntese da proteína, mas à interação do dissulfiram com duas cisteínas localizadas em domínios dos sítios ligantes de ATP da proteína.

Seguindo essa linha de raciocínio, resolvemos avaliar o efeito da combinação destes fármacos sobre a proliferação de *P. falciparum*, tendo em vista a suscetibilidade que este parasito apresenta frente a alterações do equilíbrio redox durante a sua fase de vida intraeritrocítica (BECKER *et al.*, 2004; MÜLLER, 2004). Além disso, as principais defesas antioxidantes do *P. falciparum* são a enzima superóxido dismutase e os sistemas glutatona/glutatona redutase e tiorredoxina/tiorredoxina redutase (MÜLLER, 2004).

Para avaliar a combinação entre fármacos, é extremamente importante levar em consideração as interações medicamentosas que essas duas substâncias podem apresentar. As interações medicamentosas são eventos farmacológicos em que os efeitos de um fármaco podem ser modificados pela presença de outro. Ao administrar concomitantemente dois medicamentos, eles podem agir de forma independente ou interagir com aumento ou diminuição de efeito terapêutico ou tóxico de um ou ambos. Essa interação pode ser danosa quando promove aumento da toxicidade ou, algumas vezes, através da redução e até mesmo do aumento da eficácia de um dos fármacos. Entretanto, existem interações que são extremamente benéficas e úteis (HOEFLER,

2012). Dentre as diversas interações, as de maior interesse nos estudos de quimioterapia são as interações de efeito, que podem ser classificadas como: aditivas e sinérgicas.

Ao realizarmos a combinação dos compostos, inicialmente através da avaliação da FIC (combinação inibitória fracionada), observamos um efeito extremamente promissor e interessante, pois os valores de  $IC_{50}$  das drogas foram drasticamente reduzidos, bem como todas as FICs apresentaram uma interação sinérgica (HALLANDER *et al.*, 1982). Com base nos nossos dados e comparando com a literatura, a combinação entre curcumina e os tiocarbamatos (dissulfiram e DETC) apresenta um efeito extremamente sinérgico.

Outro instrumento utilizado para avaliar interações é o isoblograma, que avalia diferentes compostos independente do seu mecanismo de ação ou da natureza de suas relações dose-resposta (BERENBAUM, 1989). Ao traçarmos o isoblograma da combinação entre o dissulfiram, o DETC e a curcumina, observamos que mais de 75% das combinações propostas apresentaram um efeito sinérgico. Esses dados são de extrema relevância, pois as interações *in vitro* demonstradas pelo isoblograma fornecem uma base essencial para os estudos clínicos. Entretanto vale ressaltar que esses estudos não determinam a eficácia do composto no hospedeiro, tendo em vista que a mesma depende de relações farmacocinéticas, de absorção, dentre outras (FIVELMAN, ADAGU e WARHURST, 2004). Contudo o fato de estes compostos terem efetividade comprovada em diferentes modelos, inclusive em humanos com parâmetros adequados de biodisponibilidade indica, fortemente, sua aplicabilidade.

Além da avaliação da eficácia das drogas, é fundamental considerarmos a citotoxicidade em estudos que visem ao desenvolvimento de quimioterápicos. Esses testes realizados *in vitro* são fundamentais para analisarmos possíveis efeitos tóxicos em células de mamíferos e como preditivos dos efeitos *in vivo*. São testes utilizados antes do uso de animais de laboratório para evitar o uso desnecessário dos mesmos.

A curcumina apresentou-se três vezes mais eficaz para *P. falciparum* em relação aos esplenócitos. Os tiocarbamatos avaliados apresentaram maior toxicidade para células de mamíferos que contra as culturas do parasito. Quando utilizados em combinação, observamos

que a curcumina diminui os efeitos tóxicos causados pelo DETC em esplenócitos murinos. Entretanto o DETC promoveu um incremento na toxicidade da curcumina, contudo manteve a mesma em concentração 2 vezes maior que a dose necessária para matar o parasito, possibilitando assim uma margem de segurança. Ao procedermos à avaliação do efeito da curcumina combinada com o dissulfiram, não conseguimos encontrar concentrações que tivessem uma relação dose-resposta, impossibilitando assim determinar a  $IC_{50}$ . A porcentagem de inibição ficou sempre em torno de 20% para todas as concentrações testadas.

Vale ressaltar que a curcumina é utilizada na dieta, entretanto em doses possivelmente baixas. A curcumina é reconhecida como segura pelo FDA (Food and Drug Administration) dos EUA e tem sido aceita uma ingestão diária de 0,1 a 3mg/kg pelo Comité Misto FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/OMS) em aditivos alimentares (STRIMPAKOS e SHARMA, 2008). Um estudo pré-clínico do Instituto Nacional do Câncer demonstrou que a curcumina não apresentou efeitos citotóxicos em ratos, cães e macacos com doses de 3,5g/kg por dia durante 90 dias (NCI, DCPC, 1996). A curcumina é extraída do açafrão e empregada em diferentes formulações para diferentes finalidades (revisto em GUPTA *et al.*, 2012), não apenas com baixa toxicidade, mas também revertendo efeitos tóxicos de outras drogas. Sendo assim, mesmo apresentando efeitos citotóxicos, a curcumina já demonstrou ser segura para uso humano, já sendo utilizada na dieta e em testes clínicos com doses extremamente altas.

DETC é o primeiro metabólito do dissulfiram, é metilado para formar S-metil N,N-dietilditiocarbamato (MeDDC) (GLAUSER *et al.*, 1993). O MeDDC é primeiramente oxidado para formar um intermediário denominado MeDDC sulfeto, que é convertido em S-metil N,N-dietilditiocarbamato sulfóxido e pequenas quantidade de MeDDC (MADAN *et al.*, 1998).

O dissulfiram e o DETC são utilizados contra *Mycobacterium tuberculosis* persistente, como agente quimio-preventivo no câncer, adjunto na quimioterapia convencional do câncer e em terapia experimental da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (BYRNE *et al.*, 2007; PANDE e RAMOS 2003; PANG *et al.*, 2007). Vale salientar que DETC pode ter atividade microbicida e hemolítica (AGAR *et al.*, 1991), mas o efeito hemolítico não foi observado nas condições empregadas aqui, possivelmente pela combinação com a curcumina e/ou dosagens utilizadas.

DETC e dissulfiram têm, respectivamente, demonstrada capacidade de proteger animais dos efeitos tóxicos da cis-diaminodicloroplatina (II) na terapia antitumoral (BORCH *et al.*, 1980; GRINGERI *et al.*, 1988) e da infecção pelo *Trypanosoma rhodesiense* (WYSOR *et al.*, 1982). Tanto DETC como dissulfiram são capazes de reduzir os efeitos tóxicos do acetaminofen (HAZAI *et al.*, 2002), bem como a toxicidade do cádmio (ONO *et al.*, 1997) níquel (CHRISTENSEN, 1982; BRADBERRY e VALE, 1999) e cromo (SUSA *et al.*, 1998). É sabido que o dissulfiram tem ação protetora frente aos efeitos tóxicos da isoniazida (BURMAN *et al.*, 2002), entretanto pode promover a genotoxicidade do acetaldeído (MADRIGAL-BUJAJIDAR *et al.*, 2002). Ambos reduzem a toxicidade do  $\alpha$ -naftilisotiocianato (TRAIGER *et al.*, 1984) e pode ser hepatoprotetor (MASUDA e NAKAYAMA, 1982; JENNISCHE e HANSSON, 1984; LAURIAULT *et al.*, 1992) e nefroprotetor (MASUDA e NAKAYAMA, 1983). Pesquisas também evidenciaram que o dissulfiram e outros ditiocarbamatos possuem efeito significativo no tratamento contra o câncer (SAUNA, SHUKLA & AMBUDKAR, 2005).

Pelo exposto, a combinação de curcumina e disulfiram/DETC constitui uma estratégia segura para o tratamento da malária e conseqüentemente para uso em seres humanos. Este estudo demonstrou que a combinação dos fármacos apresenta índices de seletividades em torno de 10.000 para a curcumina com o DETC e 1000 para a curcumina com o dissulfiram. Estudos apontam que índices superiores a 3 são considerados extremamente seletivos (BÉZIVIN *et al.*, 2003; PRAYONG *et al.*, 2008). Em termos comparativos, o índice de seletividade encontrado para a artemisinina no nosso estudo foi extremamente inferior ao dos compostos combinados. O uso da combinação das substâncias em cultura de *P. falciparum* é mais seletivo que a própria artemisinina, nas condições testadas. A artemisinina é atualmente a droga de escolha para o tratamento da malária.

Avaliamos se o efeito dos compostos era citostático ou citotóxico, e tendo em vista que a literatura associava possíveis mecanismos de ação dos fármacos vinculados a vias de estresse oxidativo, utilizamos o antioxidante urato. A curcumina apresentou efeito citotóxico, por esse motivo, provavelmente, que em combinações cuja concentração dessa droga é mantida fixa a efetividade é maior. O DETC e o dissulfiram apresentaram efeito citostático. A pré-incubação com o antioxidante urato somente protegeu as células do efeito do DETC, indicando que a

atividade desse composto está relacionada ao estresse oxidativo, o mesmo não foi observado para a curcumina e o dissulfiram, sugerindo que essa não é a principal via de ação das drogas. Esses dados apontam para uma lesão irreversível, no caso da curcumina e interferência em vias menos lesivas para o DETC e dissulfiram.

O *Plasmodium falciparum* é um parasito intracelular e depende da sobrevivência da célula hospedeira para manter e completar o seu ciclo de vida. Sendo assim, avaliamos se os compostos utilizados no nosso estudo tinham a capacidade de destruir as hemácias, isolados ou combinados, levando o parasito à morte pela impossibilidade de completar o ciclo. Observamos que nas concentrações testadas nenhuma das drogas foi capaz de causar lise nas hemácias. Esses dados apontam para um efeito sobre o parasito e não sobre a célula hospedeira.

A microscopia eletrônica apresenta-se como uma excelente ferramenta para estudos quimioterápicos (ADADE e SOUTO-PADRÓN, 2010, 2011; VANNIER-SANTOS e DE CASTRO, 2009; SOEIRO *et al.*, 2009). A mesma possibilita a identificação de alvos celulares e de possíveis mecanismos de ação dos compostos antiparasitários. Sendo assim, avaliamos, através dessa técnica, os efeitos celulares causados pelos compostos sobre o *Plasmodium falciparum*.

Ao avaliarmos as células tratadas com o dissulfiram e com o DETC, observamos a formação de cristais de hemozoína delgados, além da presença de membranas na periferia do vacúolo digestivo, em continuidade com o retículo endoplasmático do envoltório nuclear, o qual demonstrou extensa dilatação. Observamos também a presença de figuras de mielina e de estruturas compatíveis com vacúolos autofágicos, vinculadas ao vacúolo digestivo.

O dissulfiram foi utilizado por mais de meio século para o tratamento do alcoolismo. O seu mecanismo de ação (gerado pelos seus metabólitos) é dependente da inibição da enzima aldeído desidrogenase. Essa inibição gera a diminuição do metabolismo do acetaldeído, um produto do metabolismo do etanol, o que leva ao seu acúmulo no organismo e aos efeitos da droga (HALD & JACOBSEN, 1948). A sua farmacocinética tem sido estudada com frequência e foi demonstrado que ele é bastante seguro.

A inibição da Cu,Zn-SOD, induzida pelo DETC, ocorre através da ligação e remoção dos íons Cu(II) do sítio ativo da enzima. A SOD está presente em *Plasmodium falciparum*. A inibição destes sistemas pode vir a permitir o acúmulo de radicais livres, o que posteriormente pode causar peroxidação lipídica da membrana celular, bem como outros danos oxidativos estruturais e em macromoléculas (WALKER *et al.*, 1987).

Ao observarmos os resultados da microscopia eletrônica, procedemos à execução de técnicas de detecção de estresse oxidativo, tendo em vista que os resultados da microscopia eletrônica e os dados da literatura apontavam para uma possível atuação tanto do DETC quanto do dissulfiram por vias relacionadas à função redox. Avaliamos através da sonda DHE (dihidroetídio) a produção de espécies reativas pelo parasito, quando incubadas com drogas. Observamos que o DETC promove um aumento nos níveis de espécies reativas quando comparado com o controle DMSO e a co-incubação com o antioxidante NAC (N-acetil-cisteína) não foi capaz de impedir os efeitos oxidativos do DETC.

Pela microscopia ótica, observamos que a fluorescência emitida pela sonda DHE estava vinculada à presença do *Plasmodium*. Isso é de grande relevância, pois, a presença de marcação na hemácia poderia servir como fator de confusão na interpretação dos dados por citometria de fluxo.

Na citometria foi possível observar a presença de 3 populações distintas, é importante relatar que não conseguimos identificar que populações eram essas, pois não é possível fazer separação das células infectadas da população total. Entretanto é sabido que o *P. falciparum* pode causar poliparasitismo (mais de um trofozoíto infectando uma hemácia) o que poderia ser responsável, ao menos em parte, pelas diferentes populações. Observamos que a incubação com o DETC e com a curcumina aumenta a intensidade da fluorescência. A combinação manteve os níveis de intensidade de fluorescência semelhantes ao das drogas isoladas, entretanto promoveu um aumento na população marcada, mostrando que a combinação promove aumento no número de parasitos sobre estresse oxidativo. Isso nós mostra que os compostos promovem o aumento no estresse oxidativo dos parasitos, corroborando com os dados da literatura. Observamos células

fluorescentes também no controle. Entretanto o parasito vive em um ambiente consideravelmente oxidante, e a presença de espécies reativas ocorre em condições fisiológicas (MULLER, 2004).

Como o aumento nos radicais livres intracelulares promove a peroxidação lipídica, avaliamos a presença da mesma através da técnica de TBARS. Somente o DETC aumentou significativamente os níveis de peroxidação lipídica celular, o que demonstra que o mecanismo de ação desta droga está possivelmente associado à produção de radicais livres.

Com base nos dados encontrados para a dosagem de espécies reativas, é coerente supor que a extensa dilatação do retículo endoplasmático que delimita os núcleos dos trofozoítas pode ter sido devida ao estresse oxidativo, já que este processo aumenta os níveis de cálcio citoplasmático, podendo ser esta uma via de sinalização para diferentes vias de morte celular (ERMAK e DAVIES, 2002).

Uma possível via de atuação do dissulfiram pode ser a sua capacidade de interagir com os sítios das ATPases através de reações com as cisteínas, influenciando assim na atividade da enzima (SAUNA, SHUKLA & AMBUDKAR, 2005; STARLING, EAST e LEE, 1996). É sabido que o vacúolo digestivo do *Plasmodium* apresenta ATPases responsáveis por manter o pH ideal para as funções das proteínas (WUNDERLICH, ROHRBACH e DALTON, 2012). Uma alteração na função dessa enzima bloquearia a atividade enzimática, e isso iria interferir nos processos fisiológicos associados à organela, como degradação de hemoglobina, síntese de hemozoína e armazenamento de cálcio.

Vale salientar que o possível aumento do cálcio, sugerido pela acentuada dilatação do retículo endoplasmático que delimita os núcleos dos parasitos, pode estar relacionada à permeabilização do vacúolo digestivo, uma vez que este compartimento acumula  $\text{Ca}^{2+}$  no protozoário (BIAGINI *et al.*, 2003). O aumento descontrolado no cálcio livre intracelular pode levar à lesão celular e morte por apoptose e necrose. O estresse oxidativo gerado dentro de uma célula pode levar à destruição do sistema de incorporação do cálcio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). As alterações encontradas nestas podem estar relacionadas com possível interferência na

homeostasia do cálcio, o que também estaria envolvida no aumento do estresse oxidativo gerado na célula.

Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio apresentam capacidade de modular diferentes respostas celulares. Em baixas concentrações, essas moléculas funcionam como sinalizadores celulares. Entretanto, em altos níveis, eles causam danos em organelas, principalmente à mitocôndria. Esses danos mitocondriais podem resultar em déficit energético, acúmulo de mediadores citotóxicos e morte celular. Estudos recentes demonstraram que a principal resposta celular a este desequilíbrio redox é a autofagia (LEE, GIORDANO e ZHANG, 2012).

Tendo em vista a correlação existente entre o processo autofágico e a geração de radicais livres e danos mitocondriais, aferimos através da sonda MitoSox a presença de radical superóxido mitocondrial no parasito, quando incubado com o DETC. Observamos que a incubação com o DETC aumentou significativamente os níveis de superóxido mitocondrial em comparação ao controle DMSO. Foi possível observar também que a pré-incubação com o antioxidante tocoferol reverteu o superóxido mitocondrial ao nível do controle. A co-incubação com a curcumina manteve os níveis mais elevados em relação ao controle, entretanto a combinação diminuiu a produção de superóxido mitocondrial, em relação ao DETC.

Sendo assim, o tratamento do parasito com o DETC leva a um aumento nos níveis de espécies reativas, incluindo superóxido mitocondrial. As espécies reativas ao oxigênio são moléculas/íons formadas pela incompleta redução do oxigênio. As principais EROs são o superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $\cdot OH$ ). Eles são, sobretudo, produzidos através de reações em cadeia. O superóxido é majoritariamente produzido via complexos mitocondriais durante o processo de respiração. Ele é então convertido a peróxido de hidrogênio via enzima superóxido dismutase, e o  $H_2O_2$  pode ser transformado em radical hidroxil pelo metal  $Fe^{2+}$  e íon  $Cu^+$  (CHEN, AZAD e GIBSON, 2009). Vários estudos já relacionaram a presença dessas espécies reativas à indução de autofagia e morte (CHEN, AZAD e GIBSON, 2009; SCHERZ-SHOUVAL *et al.*, 2007; KIFFIN, BANDYOPADHYAY e CUERVO, 2006; KIRKLAND *et al.*, 2002; LEMASTERS *et al.*, 1998).

A autofagia é um processo celular fisiológico, que degrada constituintes celulares via lisossomo. É um mecanismo de sobrevivência bastante utilizado quando as células estão sob privação nutricional, podendo ainda ser considerado como uma morte celular programada (LOCKSHIN e ZAKERI, 2004). O vacúolo autofágico é formado a partir do retículo endoplasmático, formando uma estrutura circundada por dupla membrana. Posteriormente ocorre a fusão com lisossomos, cujas enzimas hidrolíticas irão degradar o conteúdo do compartimento (XIE e KLIONSKY, 2007).

O processo de autofagia é utilizado na degradação e reciclagem de proteínas e organelas citoplasmáticas. Este processo é essencial na regulação de parte do crescimento e manutenção da homeostasia de organismos multicelulares. Ocorre formação de vacúolos autofágicos em resposta adaptativa a vários estímulos extracelulares e intracelulares. Entretanto, em algumas circunstâncias, os eventos celulares de sinalização podem induzir uma resposta celular que culmina com morte autofágica (DENTON, NICOLSON e KUMAR, 2012).

Pelo exposto, podemos supor que o tratamento do *Plasmodium falciparum* com tiocarbamatos induz alterações celulares relacionadas ao equilíbrio redox do parasito, que culmina com alterações celulares indicativas de processo autofágico.

Ao avaliarmos por microscopia eletrônica de transmissão os efeitos causados pela curcumina no *Plasmodium falciparum*, observamos intensa vacuolização citoplasmática, compartimentos eletrondensos com conteúdo bastante semelhante à hemácia, cristais de hemozoína completamente alterados, alguns dispersos no citoplasma celular, presença de vacúolos com estruturas membranares. A combinação da curcumina com o DETC e o dissulfiram apresentou, por microscopia eletrônica, efeito similar ao das drogas isoladas, isso é importante para demonstrar que as drogas não atuam de forma inibitória quando combinadas.

Durante seu ciclo de vida eritrocítico, o *Plasmodium* degrada em torno de 80% da hemoglobina da hemácia (KRUGLIAK, ZHANG e GINSBURG, 2002). Este processo ocorre dentro do vacúolo digestivo do parasito (EGAN, 2008). A degradação de hemoglobina era entendida como uma fonte de aminoácidos para o parasito, entretanto foi demonstrado que apenas uma pequena

fração desses aminoácidos é efetivamente utilizada (KRUGLIAK, ZHANG e GINSBURG, 2002). Sugere-se então que a degradação da hemoglobina também é importante para a manutenção do equilíbrio osmótico, além de permitir o crescimento do parasito dentro do eritrócito (EGAN, 2008).

O processo de degradação da hemoglobina libera o heme como subproduto. Este heme (ferriprotoporfirina IX) é uma molécula pleiotrópica. Ela desempenha papéis chave em diversos processos biológicos, dentre eles, transporte de oxigênio, respiração e outros (PONKA, 1999). Entretanto, ele também possui a capacidade de causar danos às células, devido a características anfifílicas. Ele pode ligar-se a membranas e assim promover a alteração de características de permeabilidade, levando à lise celular (SCHMITT, FREZZATTI e SCHEREIER, 1993). Também possui a habilidade de gerar radicais livres (GUTTERIDGE e SMITH, 1988).

Tendo em vista a importância da degradação da hemoglobina, bem como da síntese de hemozoína no *Plasmodium falciparum*, e frente aos resultados observados através da microscopia eletrônica para a curcumina e para os tiocarbamatos, partimos para analisar se a curcumina teria a propriedade de interferir com a formação da hemozoína, e para as concentrações testadas, não houve inibição. Tendo em vista a discordância entre os dados da microscopia eletrônica, que apontavam um menor número de cristais bem como extensos vacúolos com conteúdo eritrocítico, avaliamos a inibição da formação do cristal com extrato do parasito e observamos que a IC<sub>50</sub> da curcumina inibe a formação do cristal no parasito em níveis semelhantes à cloroquina. AKHTAR, RIZVI e KAR em 2012 observaram que a curcumina possuía a capacidade de inibir a formação do cristal de hemozoína sobre homogenato de *Plasmodium yoelii*. Os tiocarbamatos não interferiram no processo de formação do cristal.

Baseado nesses dois dados é possível supor que a curcumina provavelmente inibe algum processo anterior à síntese do cristal ou dependente de componentes parasitários e, por isso, a sua capacidade inibitória não foi detectada quando utilizamos a técnica *in vitro*, mas somente quando fizemos uso da técnica com o homogenato do parasito. Além disso, a interferência no processo de formação da hemoglobina justificaria a presença de alguns cristais no citoplasma do parasito, tendo em vista que como citado anteriormente, o heme possui características anfifílicas e isso

permitiria a ele interagir com a membrana do vacúolo e permeabilizá-la. A atividade pró-oxidante, provocando lipoperoxidação, pode acentuar tal efeito.

Uma vez que a curcumina inibiu a formação de hemozoína com a mesma eficiência que a cloroquina, é possível que os anéis heme livres exerçam elevado efeito pró-oxidante nos parasitos incubados com os fármacos combinados. A geração de heme livre pela curcumina e combinações pode ocasionar a ruptura da membrana do vacúolo digestivo, como relatado no tratamento de hemácias infectadas por *P. falciparum* e tratadas com cloroquina (CH'NG *et al.*, 2011), evidenciado por microscopia de fluorescência e eletrônica.

Como a literatura também relata que o heme é capaz de produzir espécies reativas avaliamos, através da sonda DHE, se o tratamento com a curcumina aumentaria os níveis de EROs no parasito, e observamos através da microscopia de fluorescência que existe um aumento nas células tratadas quando comparado ao controle, e que a co-incubação com o NAC, de forma análoga ao que ocorre com o DETC, não é capaz de inibir o processo. A capacidade da curcumina em gerar espécies reativas em culturas de *Plasmodium falciparum* já havia sido previamente relatada (REDDY *et al.*, 2005). Por citometria de fluxo, observamos que a curcumina também leva a um aumento na produção de EROs. Entretanto ela não aumenta a população. Uma explicação para isso poderia estar no fato que o tratamento com a curcumina levou a um aumento de células mortas.

Na tentativa de mostrar que uma das principais formas de efeito das drogas avaliadas sobre culturas de *P. falciparum* era por ação nas vias oxidativas celulares, realizamos a pré-incubação das culturas com o antioxidante urato e posteriormente colocamos as culturas sobre pressão das drogas. Observamos que o urato protegeu, mas não de forma significativa, os parasitos da ação do DETC e do dissulfiram. Entretanto o mesmo não foi observado para o tratamento com a curcumina. Sendo assim, é possível concluir que vias de estresse oxidativo estão diretamente associadas ao mecanismo de ação dos tiocarbamatos, mas que o mesmo não acontece com a curcumina.

O uso de modelos animais para estudos comparativos com doenças humanas tem sido bastante discutido na literatura. Entretanto estudos têm usado esses modelos para auxiliar na compreensão

da patogênese da doença, biologia do parasito, resposta imune. Além disso, estes modelos são bastante utilizados em testes pré-clínicos para o desenvolvimento de drogas e vacinas (WYKES e GOOD, 2009).

A partir dos resultados obtidos *in vitro*, avaliamos então o efeito desses compostos sobre a sobrevivência de camundongos infectados por *Plasmodium berghei*. Após a confirmação da infecção, realizada através de esfregaço, tratamos os animais por via oral durante 5 dias. Nos camundongos tratados com o dissulfiram, observamos que a dose de 5mg/kg foi a que apresentou melhor taxa de sobrevivência, a mesma ficou em torno de 20%. Já com o DETC, notamos que a dose de 100mg/kg foi a mais efetiva, mantendo uma taxa de sobrevivência de 45%. Foi possível observar também que o tratamento com a droga aumentou o tempo de sobrevivência do animal, em comparação ao controle negativo, em 6 dias. O tratamento com a curcumina a 25mg/kg aumentou a sobrevivência dos animais em 12 dias e manteve uma taxa de sobrevivência em torno de 28%. Ao combinarmos 25mg/kg de curcumina com 100mg/kg de DETC (compostos e doses que apresentaram os melhores efeitos) notamos uma taxa de sobrevivência de 41,66% e um aumento na sobrevivência do animal em 6 dias. Ao compararmos os dados, observamos que a combinação não promoveu, em modelos animais, um incremento significativo nem na sobrevivência e nem na sobrevivência dos animais. Entretanto, é importante considerar que se faz necessária uma avaliação mais detalhada das doses e, além disso, a combinação de drogas para o tratamento da malária é sempre recomendada, pois diminui as chances de seleção de resistência.

Nosso grupo observou que em combinações com outro fármaco (depósito de patente aprovado no dia 30/03/2009, sob o número PI 0900881-0) o DETC mostrou efeito cardioprotetor, hepatoprotetor e nefroprotetor, uma vez que os tratamentos associados reduziram, respectivamente, os níveis de creatina cinase (CK), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e ureia. Assim sendo, essa combinação associa não apenas compostos de toxicidade muito baixa, mas compostos citoprotetores, capazes de reduzir efeitos tóxicos em numerosos tecidos e órgãos. Frente a todos esses resultados, é coerente concluir que a combinação da curcumina com os tiocarbamatos (DETC e dissulfiram) surge como uma nova possibilidade no desenvolvimento de alternativas terapêuticas para o tratamento da malária.

## 8. CONCLUSÃO

---

- A utilização de drogas que interfiram em mecanismos oxidantes bem como na síntese da hemozoína é bastante promissora na quimioterapia da malária em virtude do *P. falciparum* ser extremamente sensível a alterações nesses processos metabólicos;
- As dosagens bioquímicas bem como a análise ultraestrutural indicam que tanto a curcumina quanto o DETC promovem um aumento no estresse oxidativo;
- A interferência da curcumina com o processo de síntese da hemozoína leva à lesão de membrana do vacúolo digestivo e culmina com autólise e perda de compartimentalização celular;
- O efeito sinérgico entre DETC-curcumina em *P. falciparum* aponta para uma importante ferramenta terapêutica, tendo em vista que, além de diminuir a concentração das drogas, leva a uma diminuição na possibilidade do microorganismo adquirir resistência.

## 9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

---

ADADE, C.M.; SOUTO-PADRÓN, T. Contributions of ultrastructural studies to the cell biology of trypanosomatids: targets for anti-parasitic drugs. The Open Parasitology Journal, v.4, p.178-187, 2010.

ADITYA, N.P.; CHIMOTE, G.; GUNALAN, K.; BANERJEE, R.; PATANKAR, S.; MADHUSUDHAN, B. Curcuminoids-loaded liposomes in combination with artemether protects against *Plasmodium berghei* infection in mice. Experimental Parasitology, v.131, n.3, p.292-9, 2012.

AGAR, N.S.; MAHONEY, J.R.; EATON, J.W. Hemolytic and microbicidal actions of diethyldithiocarbamic acid. Biochemical Pharmacology, v.41, n.6-7, p.985-93, 1991.

AKHTAR, F.; RIZVI, M.M.; KAR, S.K. Oral delivery of curcumin bound to chitosan nanoparticles cured *Plasmodium yoelii* infected mice. Biotechnology Advances, v.30, n.1, p.310-20, 2012.

ALLALUNIS-TURNER, M.J.; CHAPMAN, J.D. Evaluation of diethyldithiocarbamate as a radioprotector of bone marrow. International journal of radiation oncology, biology, physics, v.10, n.9, p.1569-73, 1984.

ALLAM, G. Immunomodulatory effects of curcumin treatment on murine schistosomiasis mansoni. Immunobiology, v.214, n.8, p.712-27, 2009.

ALVES, L.V.; DO CANTO-CAVALHEIRO, M.M.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; LEON, L. *In vitro* antiproliferative effects of several diaryl derivatives on *Leishmania* spp. Biological & Pharmaceutical Bulletin, v.26, n.4, p.453-6, 2003.

AMINO, R.; THIBERGE, S.; MARTIN, B.; CELLI, S.; SHORTE, S; FRISCHKNECHT, F.; MÉNARD, R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. Nature Medicine, v.12, n.2, p.220 – 224, 2006.

ANGELINI ,A.; IEZZI, M.; DI FEBBO, C.; DI ILIO, C.; CUCCURULLO, F.; PORRECA, E. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human sarcoma MES-SA/Dx-5 cells by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Current Oncology Reports, v.20, n.4, p.731-5, 2008.

ARESE, P.; SCHWARZER, E. Malarial pigment (haemozoin): a very active 'inert' substance. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, v. 91, n.5, p.501-16, 1997.

ARNELLE, D.R.; DAY, B.J.; STAMLER, J.S. Diethyl dithiocarbamate-induced decomposition of S-nitrosothiols. Nitric Oxide, v.1, n.1, p.56-64, 1997.

ATAIE, A.; SABETKASAEI, M.; HAGHPARAST, A.; MOGHADDAM, A.H.; KAZEMINEJAD, B. Neuroprotective effects of the polyphenolic antioxidant agent, Curcumin, against homocysteine-induced cognitive impairment and oxidative stress in the rat. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, v. 96, n.4, p. 378-85, 2010.

BALAKIREV, M.Y.; ZIMMER, G. Mitochondrial injury by disulfiram: two different mechanisms of the mitochondrial permeability transition. Chemico-biological Interactions, v.138, n.3, p.299-311, 2001.

BARNES, K.I.; WATKINS, W.M.; WHITE, N.J. Antimalarial dosing regimens and drug resistance. Trends in Parasitology, v.24, n.3, p.127-134, 2008.

BECKER, K.; TILLEY, L.; VENNERSTROM, J.L.; ROBERTS, D.; ROGERSON, S.; GINSBURG, H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. International Journal of Parasitology Research, v.34, n.2, p.163-89, 2004.

BERENBAUM, M.C. What is synergy? Pharmacological Review, v.41, n.2-3, p.93 – 141, 1989.

BÉZIVIN, C.; TOMASI, S.; LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT, F.; BOUSTIE, J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. Phytomedicine, v.10, n.6-7, p.499-503, 2003.

BIAGINI, G.A.; BRAY, P.G.; SPILLER, D.G.; WHITE, M.R.; WARD, S.A. The digestive food vacuole of the malaria parasite is a dynamic intracellular  $Ca^{2+}$  store. Journal of biological chemistry, v. 278, n.30, p.27910-5, 2003.

BORCH, R.F.; KATZ, J.C.; LIEDER, P.H.; PLEASANTS, M.E. Effect of diethyldithiocarbamate rescue on tumor response to cis-platinum in a rat model. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.77, n.9, p.5441-4, 1980.

BORST, P.; OUELLETTE, M. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. Annual Review of Microbiology, v.49, p.427-60, 1995.

BRADBERRY, S.M.; VALE, J.A. Therapeutic review: do diethyldithiocarbamate and disulfiram have a role in acute nickel carbonyl poisoning? Journal of toxicology. Clinical Toxicology, v. 37, n.2, p.259-64, 1999.

BROUET, I.; OHSHIMA, H. Curcumin, an anti-tumour promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.206, p.533–540, 1995.

BRUCE-CHWATT, L.J. Malaria Research and Eradication in the USSR. Bulletin Organisation mondiale de la Santé - Bulletin of the World Health Organization, v.21, p. 737 – 772, 1959.

BUNIK, V.I. 2-Oxo acid dehydrogenase complexes in redox regulation. European Journal of Biochemistry, v.270, p.1036-42, 2003.

BURKITT, M.J.; BISHOP, H.S.; MILNE, L.; TSANG, S.Y.; PROVAN, G.J.; NOBEL, C.S.; ORRENIUS, S.; SLATER, A.F. Dithiocarbamate toxicity toward thymocytes involves their copper-catalyzed conversion to thiuram disulfides, which oxidize glutathione in a redox cycle without the release of reactive oxygen species. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 353, n.1, p.73-84, 1998.

BURMAN, W.J.; TERRA, M.; BREESE, P.; COHN, D.; REVES, R. Lack of toxicity from concomitant directly observed disulfiram and isoniazid-containing therapy for active tuberculosis. Bulletin of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, v.6, n.9, p.839-42, 2002.

BYRNE, S.T.; GU, P.; ZHOU, J.; DENKIN, S.M.; CHONG, C.; SULLIVAN, D.; LIU, J.O.; ZHANG, Y. Pyrrolidine dithiocarbamate and diethyldithiocarbamate are active against growing and nongrowing persister *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents Chemotherapy, v. 51, p.4495-4497, 2007.

CAESAR, I.; JONSON, M.; NILSSON, K.P.; THOR, S.; HAMMARSTRÖM, P. Curcumin promotes A-beta fibrillation and reduces neurotoxicity in transgenic *Drosophila*. PLoS One, v.7, n.2, p.314-24, 2012.

CAMPS, M.; BOOTHROYD, J.C. Toxoplasma gondii: selective killing of extracellular parasites by oxidation using pyrrolidine dithiocarbamate. Experimental Parasitology, v. 98, n.4, p.206-14, 2001.

CANALES-AGUIRRE, A.A.; GOMEZ-PINEDO, U.A.; LUQUIN, S.; RAMÍREZ-HERRERA, M.A.; MENDOZA-MAGAÑA, M.L.; FERIA-VELASCO, A. Curcumin protects against the oxidative damage induced by the pesticide parathion in the hippocampus of the rat brain. Nutritional Neuroscience, v.15, n.2, p.62-9, 2012.

CEN, D.; GONZALEZ, R.I.; BUCKMEIER, J.A.; KAHN, R.S.; TOHIDIAN, N.B.; MEYSKENS, JR. F.L. Disulfiram induces apoptosis in human melanoma cells: a redox-related process. Molecular Cancer Therapeutics, v.1, n.3, p.197-204, 2002.

\_\_\_\_\_. CENTERES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Disponível em <[http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/M-R/Malaria/body\\_Malaria\\_il1.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/M-R/Malaria/body_Malaria_il1.htm)> Acessado em 10 de abril de 2011.

CERNÝ, D.; LEKIĆ, N.; VÁŇOVÁ, K.; MUCHOVÁ, L.; HOŘÍNEK, A.; KMONÍČKOVÁ, E.; ZÍDEK, Z.; KAMENÍKOVÁ, L.; FARGHALI, H. Hepatoprotective effect of curcumin in lipopolysaccharide/-galactosamine model of liver injury in rats: relationship to HO-1/CO antioxidant system. Fitoterapia, v.82, n.5, p.786-91, 2011.

CHAVALI, A.K.; BLAZIER, A.S.; TLAXCA, J.L.; JENSEN, P.A.; PEARSON, R.D.; PAPIN, J.A. Metabolic network analysis predicts efficacy of FDA-approved drugs targeting the causative agent of a neglected tropical disease. BMC Systems Biology, v.6, n.27, p.2-16, 2012.

CH'NG, J.H.; LIEW, K.; GOH, A.S.; SIDHARTHA, E.; TAN, K.S. Drug-induced permeabilization of parasite's digestive vacuole is a key trigger of programmed cell death in *Plasmodium falciparum*. Cell Death & Disease, v.2, e216, 2011.

CHEN, Y.; AZAD, M.B.; GIBSON, S.B. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. Cell Death and Differentiation, v.16, p.1040-1052, 2009.

CHRISTENSEN, J.D. Disulfiram treatment of three patients with nickel dermatitis. Contact Dermatitis, v. 8, n.2, p.105-8, 1982.

CLARK, I.A.; HUNT, N.H. Evidence for reactive oxygen intermediates causing hemolysis and parasite death in malaria. Infection and Immunity, v.39, n.1, p.1-6, 1983.

\_\_\_\_\_.ClinicalTrials. Disponível em  
<<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=curcumin&pg=1>>. Acessado em 11 de abril de 2011.

CONDE DE FELIPE, M.M.; LEHMANN, M.M.; JEROME, M.E.; WHITE, M.W. Inhibition of *Toxoplasma gondii* growth by pyrrolidine dithiocarbamate is cell cycle specific and leads to population synchronization. Molecular and Biochemical Parasitology, v.157, n.1, p.22-31, 2008.

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. Journal of Ethnopharmacology, v.106, n.3, p.290-302, 2006

COURA, J.R.; SUÁREZ-MUTIS, M.; LADEIA-ANDRADE, S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic Plasmodium infection - A Review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.101, n.3, p.229-237, 2006.

COWMAN, A.F.; CRABB, B.S. Invasion of red blood cell by malaria parasites. Cell, v.124, p. 755 – 766, 2006.

CUI, L.; MIAO, J.; CUI, L. Cytotoxic Effect of Curcumin on Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*: Inhibition of Histone Acetylation and Generation of Reactive Oxygen Species. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.51, n.2, p.488–494, 2007.

DANDAPANI, S.; COMER, E.; DUVALL, J.R.; MUNOZ, B. Hits, leads and drugs against malaria through diversity-oriented synthesis. Future Medicinal Chemistry - Future Science, v.4, n.18, p. 2279 – 2294, 2012.

DASARI, P.; BHAKDI, S. Pathogenesis of malaria revisited. Medical Microbiology and Immunology, v.201, n.4, p.599-604, 2012.

DASARI, P.; HEBER, S.D.; BEISELE, M.; TORZEWSKI, M.; REIFENBERG, K.; ORNING, C.; FRIES, A.; ZAPF, A.L.; BAUMEISTER, S.; LINGELBACH, K.; UDOMSANGPETCH, R.; BHAKDI, S.C.; REISS, K.; BHAKDI, S. Digestive vacuole of *Plasmodium falciparum* released during erythrocyte rupture dually activates complement and coagulation. Blood, v.119, n.18, p.4301-10, 2012.

DATTANI, J.J.; RAJPUT, D.K.; MOID, N.; HIGHLAND, H.N.; GEORGE, L.B.; DESAI, K.R. Ameliorative effect of curcumin on hepatotoxicity induced by chloroquine phosphate. Environmental Toxicology and Pharmacology, v.30, n.2, p.103-9, 2010.

DEANE, L.M. Malaria vectors in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.81, S.II, p. 5-14, 1986.

DEHARO, E.; BARKAN, D.; KRUGLIAK, M.; GOLENSER, J.; GINSBURG, H. Potentiation of the antimalarial action of chloroquine in rodent malaria by drugs known to reduce cellular glutathione levels. Biochemical Pharmacology, v. 66, n.5, p.809-17, 2003.

DESJARDINS, R.; CANFIELD, C. J.; HAYNES, J. D.; CHULAY, J. D. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.16, p.710-718, 1979.

DEL PILAR CRESPO, M.; AVERY, T.D.; HANSSEN, E.; FOX, E.; ROBINSON, T.V.; VALENTE, P.; TAYLOR, D.K.; TILLEY, L. Artemisinin and a series of novel endoperoxide antimalarials exert early effects on digestive vacuole morphology. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.52, n.1, p.98-109, 2008.

DENTON, D.; NICOLSON, S.; KUMAR, S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. Cell Death and Differentiation, v.19, p. 87 – 95, 2012.

DIKSHIT, M.; RASTOGI, L.; SHUKLA, R.; SRIMAL, R.C. Prevention of ischaemia-induced biochemical changes by curcumin & quinidine in the cat heart. Indian Journal of Medical Research, v.101, p.31–35, 1995.

DONDORP, A.M.; YEUNG, S.; WHITE, L.; NGUON, C.; DAY, N.P.J.; SOCHEAT, D; VON SEIDLEIN, L. Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. Nature Reviews Microbiology, online, 8 de março de 2010.

EGAN, T. Haemozoin formation. Molecular & Biochemical Parasitology, v.157, p.127–136, 2008.

EGAN, T.J.; COMBRINCK, J.M.; EGAN, J.; HEARNE, G.R.; MARQUES, H.M.; NTENTENI, S.; SEWELL, B.T.; SMITH, P.J.; TAYLOR, D.; VAN SCHALKWYK, D.A.; WALDEN, J.C.,. Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Biochemistry, v.365, p.343–347, 2002.

ERMAK, G.; DAVIES, K.J. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. Molecular Immunology, v. 38, n.10, p.713-21, 2002.

FANG, J.; LU, J.; HOLMGREN, A. Thioredoxin reductase is irreversibly modified by curcumin. The journal of biological chemistry, v.280, n.26, p. 25284-25290, 2005.

FAROOQ, U.; MAHAJAN, R.C. Drug resistance in malaria. Journal of Vector Borne Diseases, v.41, p.45-53, 2004.

FIVELMAN, Q.L.; ADAGU, I.S.; WARHURST, D. C. Modified fixed-ratio isobologram method for studying *in vitro* interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.48, n.11, p. 4097-4102, 2004.

FITCH, C.D. Involvement of heme in the antimalarial action of chloroquine. Transactions of the American Clinical and Climatological Association, v.109, p. 97-106, 1998.

FRANCIS, S.E.; SULLIVAN, J.R.D.J.; GOLDBERG, D.E. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Annual Review of Microbiology, v.51, p.97-123, 1997.

FLETCHER, K.A.; BARTON, P.F.; KELLY, J.A. Studies on the mechanisms of oxidation in the erythrocyte by metabolites of primaquine. Biochemical Pharmacology, v. 37, n.13, p.2683-90, 1988.

FREVERT, U.; SINNIS, P.; CERAMI, C.; SHREFFLER, W.; TAKACS, B.; NUSSENZWEIG, V. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. The Journal of Experimental Medicine, v.177, p.1287-1298, 1993.

FÖLLER, M.; HUBER, S.M.; LANG, F. Erythrocyte programmed cell death. IUBMB Life, v.60, n.10, p.661-8, 2008.

GALLO, V.; SCHWARZER, E.; RAHLFS, S.; SCHIRMER, R.H.; van ZWIETEN, R.; ROOS, D.; ARESE, P.; BECKER, K. Inherited glutathione reductase deficiency and *Plasmodium falciparum* malaria – a case study. Plos One, v.4, n.10, p.1 -9, 2009.

GANTA, S.; AMIJI, M. Coadministration of Paclitaxel and curcumin in nanoemulsion formulations to overcome multidrug resistance in tumor cells. Molecular Pharmacology, v. 6, n.3, p.928-39, 2009.

GARCIA, L. S., Malaria. Clinics in Laboratory Medicine, v.30, p.93-129, 2010.

GARCIA-GOMES, A.S.; CURVELO, J.A.; SOARES, R.M.; FERREIRA-PEREIRA, A. Curcumin acts synergistically with fluconazole to sensitize a clinical isolate of *Candida albicans* showing a MDR phenotype. Medical Mycology, v. 50, n.1, p.26-32, 2012.

GAUR, D.; MAYER, G.; MILLER, L.H. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. International Journal for Parasitology, v.34, p.1413-1429, 2004.

GEARY, T.G.; JENSEN, J.B.; GINSBURG, H. Uptake of [3H]chloroquine by drug-sensitive and -resistant strains of the human malarial parasite *Plasmodium falciparum*. Biochemical Pharmacology, v. 35, p.3805-3812, 1986.

GETHING, P.W.; PATIL, A.P.; SMITH, D.L.; GUERRA, C.A.; ELYAZAR, I.R.F.; 4, JOHNSTON, TATEM, A.J.; HAY, S.I. A new world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2010. Malaria Journal, v.10, n. 360, p.1-16, 2011.

GIRISH, C.; PRADHAN, S.C. Hepatoprotective activities of picroliv, curcumin, and ellagic acid compared to silymarin on carbon-tetrachloride-induced liver toxicity in mice. Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics, v.3, n.2, p. 149-55, 2012.

GLAUSER, T.A., NELSON, A.N., ZEMBOWER, D.E., LIPSKY, J.J. AND WEINSHILBOUM, R.M. Diethyldithiocarbamate S-methylation: Evidence for catalysis by human liver thiol methyltransferase and thiopurine methyltransferase. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v.266, p.23-32, 1993.

GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A.B.; AGGARWAL, B.B. Curcumin as “Curcumin”: From kitchen to clinic. Biochemical Pharmacology, v. 75, p. 787 – 809, 2008.

GRINGERI, A.; KENG, P.C.; BORCH, R.F. Diethyldithiocarbamate inhibition of murine bone marrow toxicity caused by cis-diamminedichloroplatinum(II) or diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato) platinum(II). Cancer Research, v. 48, n.20, p.5708-12, 1988.

GUEIRARD, P.; TAVARES, J.; THIBERGE, S.; BERNEX, F.; ISHINO, T.; MILON, G.; FRANKE- FAYARD, B.; JANSE, C.J.; MÉNARD, R.; AMINO, R. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. PNAS, v.107, n.43, p.18640-19645, 2010.

GUIGUEMDE, W.A.; SHELAT, A.A.; GARCIA-BUSTOS, J.F.; DIAGANA, T.T.; GAMO, F.J.; GUY, R.K. Global Phenotypic Screening for Antimalarials. Chemistry & Biology, v.19, p.116 - 129, 2012.

GUTTERIDGE, J.M.; SMITH, A. Antioxidant protection by haemopexin of haem stimulated lipid peroxidation. Biochemical Journal, v.256, p.861–865, 1988.

GUPTA, S.C.; PATCHVA, S.; KOH, W.; AGGARWAL, B.B. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, v.39, n.3, p.283-99, 2012.

HADDAD M, SAUVAIN M, DEHARO E. Curcuma as a parasitocidal agent: a review. Planta Medica, v.77, n.6, p.672-8, 2011.

HALD, J., AND JACOBSEN, E. The formation of acetaldehyde in the organism after ingestion of Antabuse (tetraethylthiuramdisulphide) and alcohol. Acta Pharmacologica et Toxicologica, v.4, p.305 – 310, 1948.

HALLANDER, H.O.; DORNBUSCH, K.; GEZELIUS, L.; JACOBSON, K.; KARLSSON, I. Synergism between aminoglycosides and cephalosporins with antipseudomonal activity: interaction index and killing curve method. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.22, n.5, p.743-752, 1982.

HALDAR, K.; MURPHY, S.C.; MILNER, JR. D.A.; TAYLOR, T.E. Malaria: Mechanisms of Erythrocytic Infection and Pathological Correlates of Severe Disease. Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease, v.2, p.217–249, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3th: Ed. Oxford University press: 1999.

HAR-EL, R.; MARVA, E.; CHEVION, M.; GOLENSER, J. Is hemin responsible for the susceptibility of Plasmodia to oxidant stress? Free Radical Research Communications, v.18, n.5, p.279-90, 1993.

HAZAI, E.; VERECZKEY, L.; MONOSTORY, K. Reduction of toxic metabolite formation of acetaminophen. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.291, n.4, p.1089-94, 2002.

HEEBA, G.H.; MAHMOUD, M.E.; EL HANAFY, A.A. Anti-inflammatory potential of curcumin and quercetin in rats: Role of oxidative stress, heme oxygenase-1 and TNF- $\alpha$ . Toxicology and Industrial Health, Sep 28, 2012.

HEIKKILA, R.E.; CABBAT, F.S.; COHEN, G. Inactivation of superoxide dismutase by several thiocarbamic acid derivatives. Experientia, v. 34, n.12, p. 1553-4, 1978.

HEMPELMANN, E. Hemozoin biocrystallization in Plasmodium falciparum and the antimalarial activity of crystallization inhibitors. Parasitology Research, v.100, n.4, p.671-6, 2007.

HILL, D.E.; FETTERER, R.H. The effect of disulfiram on egg shell formation in adult *Trichuris muris*. The Journal of Parasitology, v.83, n.5, p.938-42, 1997.

HOEFLER, R. Interações medicamentosas. Secretaria de ciência, tecnologia e Insumos estratégicos/ms – Ftn. Disponível em <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/multimedia/paginacartilha/docs/intMed.pdf>> Acessado em 20 de dezembro de 2012.

HOLDER, G.M.; PLUMMER, J.L.; RYAN, A.J. The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5dione) in the rat. Xenobiotic, v.8, p.761-768, 1978.

IMLAY, J.A. Pathways of oxidative damage. Annual Review of Microbiology, v.57, p.395-418, 2003.

ISACCHI, B.; BERGONZI, M.C.; GRAZIOSO, M.; RIGHESCHI, C.; PIETRETTI, A.; SEVERINI, C.; BILIA, A.R. Artemisinin and artemisinin plus curcumin liposomal formulations: enhanced antimalarial efficacy against *Plasmodium berghei*-infected mice. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v.80, n.3, p.528-34, 2012.

JENNISCHE, E.; HANSSON, H.A. Disulfiram is protective against postischemic cell death in the liver. Acta Physiologica Scandinavica, v.122, n.2, p.199-201, 1984.

JIANG, T.; ZHI, X.L.; ZHANG, Y.H.; PAN, L.F.; ZHOU, P. Inhibitory effect of curcumin on the Al(III)-induced A $\beta$ <sub>42</sub> aggregation and neurotoxicity in vitro. Biochimica et Biophysica Acta, v.1822, n.8, p.1207-15, 2012.

JONGWUTIWES, S.; PUTAPORNTIP, C.; IWASAKI, T.; SATA, T. E; KANBARA, H. Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human, Thailand. Emerging Infectious Diseases, v.10, p.2211- 2213, 2004.

JØRGENSEN, C.H.; PEDERSEN, B.; TØNNESEN, H. The efficacy of disulfiram for the treatment of alcohol use disorder. Alcoholism: Clinical & Experimental Research, v. 35, n.10, p.1749-58, 2011.

KALPANA, C.; MENON, V.P. Curcumin ameliorates oxidative stress during nicotine-induced lung toxicity in Wistar rats. Italian Journal of Biochemistry, v. 53, n.2, p.82-6, 2004.

KANG, J.; CHEN, J.; SHI, Y.; JIA, J.; ZHANG, Y. Curcumin-induced histone hypoacetylation: the role of reactive oxygen species. Biochemical Pharmacology, v.69, n.8, p.1205-13, 2005.

KANYILE, K.; EGAN, T. J. A colorimetric high-throughput b-hematin inhibition screening assay for use in the search for antimalarial compounds. Analytical Biochemistry, v.338, p.306–319, 2005.

KAUR, K.; JAIN, M.; REDDY, R. P.; JAIN, R. Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. European Journal of Medicinal Chemistry, v.45, p.3245-3264, 2010.

KHALAFALLA, R.E.; MÜLLER, U.; SHAHIDUZZAMAN, M.; DYACHENKO, V.; DESOUKY, A.Y.; ALBER, G.; DAUGSCHIES, A. Effects of curcumin (diferuloylmethane) on *Eimeria tenella* sporozoites in vitro. Parasitology Research, v.108, n.4, p.879-86, 2011.

KHOURI, R.; NOVAIS, F.; SANTANA, G.; DE OLIVEIRA, C.I.; VANNIER DOS SANTOS, M.A.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; VAN WEYENBERGH, J. DETC induces *Leishmania* parasite killing in human in vitro and murine in vivo models: a promising therapeutic alternative in Leishmaniasis. PLoS One, v.5, n.12, e14394, 2010.

KIFFIN, R.; BANDYOPADHYAY, U.; CUERVO, A.M. Oxidative stress and autophagy. Antioxidant Redox Signal, v.8, p.152–162, 2006.

KIRKLAND, R.A.; ADIBHATLA, R.M.; HATCHER, J.F.; FRANKLIN, J.L. Loss of cardiolipin and mitochondria during programmed neuronal death: evidence of a role for lipid peroxidation and autophagy. Neuroscience, v.115, p.587–602, 2002.

KISO, Y.; SUZUKI, Y.; WATANABE, N.; OSHIMA, Y.; HIKINO, H. Antihepatotoxic principles of *Curcuma longa* rhizomes. Planta Medica, v.49, p.185–187, 1983.

KIZHAKKAYIL, J.; THAYYULLATHIL, F.; CHATHOTH, S.; HAGO, A.; PATEL, M.; GALADARI, S. Glutathione regulates caspase-dependent ceramide production and curcumin-induced apoptosis in human leukemic cells. Free Radical Biology & Medicine, v. 52, n.9, p.1854–64, 2012.

KONA, F.R.; BUAC, D.M.; BURGER, A. Disulfiram, and disulfiram derivatives as novel potential anticancer drugs targeting the ubiquitin-proteasome system in both preclinical and clinical studies. Current Cancer Drug Targets, v.11, n.3, p.338-46, 2011.

KOUADIO, I.K.; ALJUNID, S.; KAMIGAKI, T.; HAMMAD, K.; OSHITANI H. Infectious diseases following natural disasters: prevention and control measures. Expert Review of Anti-infective Therapy, v.10, n.1, p.95-104, 2012.

KOUYATÉ, B.; SIE, A.; YÉ, M.; DE ALLEGRI, M.; MÜLLER, O. The Great Failure of Malaria Control in Africa: A District Perspective from Burkina Faso. PLoS Medicine, v.4, n.6, p.997 – 1000, 2007.

KRNAJSKI, Z.; GILBERGER, T.W.; WALTER, R.D.; COWMAN, A.F.; MÜLLER, S. Thioredoxin reductase is essential for the survival of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages. The Journal of Biological Chemistry, v.277, n.29, p. 25970 – 25975, 2002.

KROGSTAD, D.J.; GLUZMAN, I.Y.; KYLE, D.E.; ODUOLA, A.M.; MARTIN, S.K.; MILHOUS, W.K.; SCHLESINGER, P.H. Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. Science, v.238, p.1283-5, 1987.

KROGSTAD, D. J.; SCHLESINGER, P.H.; GLUZMAN, I.Y. Antimalarials increase vesicle pH in *Plasmodium falciparum*. The Journal of Cell Biology , v.101, p.2302-2309, 1985.

KROTOSKI, W.A.; GARNHAM, P.C.; BRAY, R.S.; KROTOSKI, D.M.; KILLICK-KENDRICK, R.; DRAPER, C.C.; TARGETT, G.A.; GUY, M.W. Observations on early and late post-sporozoite tissue stages in primate malaria. I. Discovery of a new latent form of *Plasmodium cynomolgi* (the hypnozoite), and failure to detect hepatic forms within the first 24 hours after infection. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v.31, p.24-35, 1982.

KRUGLIAK, M.; ZHANG, F.; GINSBURG, H. Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins. Molecular Biochemical Parasitology, v. 119, p.249–56, 2002.

KUTNER, S.; BREUER, W.V.; GINSBURG, H.; ALEY, S.B.; CABANTCHIK, Z.I. Characterization of permeation pathways in the plasma membrane of human erythrocytes infected with early stages of *Plasmodium falciparum*: association with parasite development. Journal of Cellular Physiology, v. 125, n. 3, p. 521 – 527.

KWOLEK-MIREK, M.; ZADRAG-TECZA, R.; BARTOSZ, G. Ascorbate and thiol antioxidants abolish sensitivity of yeast *Saccharomyces cerevisiae* to disulfiram. Cell Biology and Toxicology, v.28, n.1, p.1-9, 2012.

LABBOZZETTA, M.; NOTARBARTOLO, M.; POMA, P.; MAURICI, A.; INGUGLIA, L.; MARCHETTI, P.; RIZZI, M.; BARUCHELLO, R.; SIMONI, D.; D'ALESSANDRO, N. Curcumin as a possible lead compound against hormone-independent, multidrug-resistant breast cancer. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1155, p.278-83, 2009.

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. Journal of Parasitology, v.65, p.418-420, 1979.

LANE, J.E.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; SUAREZ, C.C.; BOGITSH, B.J.; JONES, M.M.; SINGH, P.K.; CARTER, C.E. *In vitro* trypanocidal activity of tetraethylthiuram disulfide and sodium diethylamine-N-carbodithioate on *Trypanosoma cruzi*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 55, n.3, p.263-6, 1996.

LANG, F.; GULBINS, E.; LANG, P.A.; ZAPPULLA, D.; FÖLLER, M. Ceramide in suicidal death of erythrocytes. Cellular Physiology and Biochemistry, v.26, n.1, p.21-8, 2010.

LAURIAULT, V.V.; KHAN, S.; O'BRIEN, P.J. Hepatocyte cytotoxicity induced by various hepatotoxins mediated by cytochrome P-450IIE1: protection with diethyldithiocarbamate administration. Chemico-Biological Interactions, v. 81, n.3, p.271-89, 1992.

LEE, J.; GIORDANO, S.; ZHANG, J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling. Biochemical Journal, v.441, p.523 – 540, 2012.

LEMASTERS, J.J.; NIEMINEN, A.L.; QIAN, T.; TROST, L.C.; ELMORE, S.P.; NISHIMURA, Y.; CROWE, R.A.; CASCIO, W.E.; BRADHAM, C.A.; BRENNER, D.A.; HERMAN, B. Mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. Biochimica et Biophysica Acta, v.1366, p.177–196, 1998.

LEONG, P.K.; CHIU, P.Y.; KO, K.M. Prooxidant-induced glutathione antioxidant response in vitro and in vivo: a comparative study between schisandrin B and curcumin. Biological and Pharmaceutical Bulletin, v.35, n.4, p.464-72, 2012.

LIMTRAKUL, P. Curcumin as chemosensitizer. Advances in Experimental Medicine and Biology, v.595, p.269-300, 2007.

LIOCHEV, S.I.; FRIDOVICH, I. Superoxide and iron: partners in crime. IUBMB Life, v.48, p.157-61, 1999.

LOCKSHIN, R.A.; ZAKERI, Z.. Apoptosis, autophagy, and more. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, v.36, p.2405–2419, 2004.

LOO, T.W.; BARTLETT, M.C.; CLARKE, D.M. Disulfiram metabolites permanently inactivate the human multidrug resistance Pglycoprotein. Molecular Pharmacology, v.1, p.426-33, 2004.

LOU, J; LUCAS, R.; GRAU, G.E. Pathogenesis of Cerebral Malaria: Recent Experimental Data and Possible Applications for Humans. Clinical Microbiology Reviews, v.14, p.810-820, 2001.

MADAN,A., PARKINSON, A. and FAIMAN, M.D. Identification of the human P-450 enzymes responsible for the sulfoxidation and thiono-oxidation of diethyldithiocarbamate methyl ester: Role of P-450 enzymes in disulfiram bioactivation. Alcoholism: Clinical & Experimental Research, v.22, p.1212-1219, 1998.

MADRIGAL-BUJAJIDAR, E.; VELAZQUEZ-GUADARRAMA, N.; MORALES-RAMIREZ, P.; MENDIOLA, M.T. Effect of disulfiram on the genotoxic potential of acetaldehyde in mouse spermatogonial cells. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, v. 22, n.2, p.83-91, 2002.

MANGOYI, R.; HAYESHI, R.; NGADJUI, B.; NGANDEU, F.; BEZABIH, M.; ABEGAZ, B.; RAZAFIMAHEFA, S.; RASOANAIVO, P.; MUKANGANYAMA, S. Glutathione transferase from *Plasmodium falciparum*--interaction with malagashanine and selected plant natural products. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, v. 25, n.6, p.854-62, 2010.

MARTIN, S.K.; ODUOLA, A.M.; MILHOUS, W.K. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. Science, v.235, p.899-901, 1987.

MARTINELLI, A.; RODRIGUES, L.A.; CRAVO, P. *Plasmodium chabaudi*: efficacy of artemisinin + curcumin combination treatment on a clone selected for artemisinin resistance in mice. Experimental Parasitology, v.119, n.2, p.304-7, 2008.

MARTINS, F.S.V.; CASTIÑEIRAS, T.M.P.P.; PEDRO, L.G.F. Malária. Centro de Informações em Saúde para Viajantes (CIVES). Disponível em: <<http://www.cives.ufrj.br/informacao/malaria/mal-iv.html>> Acessado em: 10 de janeiro de 2012.

MASUDA, Y.; NAKAYAMA, N. Protective action of diethyldithiocarbamate and carbon disulfide against renal injury induced by chloroform in mice. Biochemical Pharmacology, v.32, n.21, p.3127-35, 1983.

MASUDA, Y.; NAKAYAMA, N. Protective effect of diethyldithiocarbamate and carbon disulfide against liver injury induced by various hepatotoxic agents. Biochemical Pharmacology, v.31, n.17, p.2713-25, 1982.

MATSUNO, T.; KARIYA, R.; YANO, S.; MORINO-KOGA, S.; TAURA, M.; SUICO, M.A.; SHIMAUCHI, Y.; MATSUYAMA, S.; OKAMOTO, Y.; SHUTO, T.; KAI, H.; OKADA, S. Diethyldithiocarbamate induces apoptosis in HHV-8-infected primary effusion lymphoma cells via inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway. International Journal of Oncology, v.40, n.4, p.1071-8, 2012.

- MESHNICK, S.R.; SCOTT, M.D.; LUBIN, B.; RANZ, A.; EATON, J.W. Antimalarial activity of diethyldithiocarbamate. Potentiation by copper. Biochemical Pharmacology, v.40, n.2, p.213-6, 1990.
- MEUNIER, B.; ROBERT, A. Heme as trigger and target for trioxane-containing antimalarial drugs. Accounts of Chemical Research, v.43(11): 1444-51, 2010.
- MILAS, L.; HUNTER, N.; ITO, H.; PETERS, L.J. *In vivo* radioprotective activities of diethyldithiocarbamate (DDC). International Journal of Radiation Oncology, v.10, n.12, p.2335-43, 1984.
- MILLER, L.H.; BARUCH, D.I.; MARSH, K.; DOUMBO, O.K. The pathogenic basis of malaria. Nature, v.415, n.6872, p.673-9, 2002.
- MILLER, L.H.; GOOD, M.F.; MILON, G. Malaria Pathogenesis. Science, v.264, p.1878-1883, 1994.
- MILLINGTON, O.R.; DI LORENZO, C.; PHILLIPS, R.S.; GARSIDE, P.; BREWER, J.M. Suppression of adaptive immunity to heterologous antigens during Plasmodium infection through hemozoin-induced failure of dendritic cell function. Journal of Biology, v.5, n.2, p.5, 2006.
- MIMCHE, P.N.; TARAMELLI, D.; VIVAS, L. The plant-based immunomodulator curcumin as a potential candidate for the development of an adjunctive therapy for cerebral malaria. Malaria Journal, v.10, n.1, S10, 2011.
- MINISTERIO DA SAÚDE. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde – Relatório de Situação: Maranhão Brasília, DF, 2009. Disponível em <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/002\\_ma\\_relatorio\\_de\\_situacao.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/002_ma_relatorio_de_situacao.pdf)> Acessado em 05 de dezembro de 2012.
- MOTA, M.A.; HAFALLA, J. C.R.; RODRIGUEZ, A. Migrations through host cells activates Plasmodium sporozoites for infection. Nature Medicine, v.8, n.11, p.1318-1322, 2002.
- MÜLLER, S. Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Molecular Microbiology, v.53, p.1291-305, 2004.
- MULLER, S.; LIEBAU, E.; WALTER, R.D.; KRAUTH-SIEGEL, R.L. Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. Trends in Parasitology, v.19, p.320–328, 2003.
- NAGAJYOTHI, F.; ZHAO, D.; WEISS, L.M.; TANOWITZ, H.B. Curcumin treatment provides protection against *Trypanosoma cruzi* infection. Parasitology Research, v.110, n.6, p.2491-9, 2012.
- NAGENDRA, S.N.; SHETTY, K.T.; RAO, K.M.; RAO, B.S. Effect of disulfiram administration on rat brain glutathione metabolism. Alcohol, v.11, n.1, p7-10, 1994.

NAIR, C.R.; CHAUHAN, D.P.; GUPTA, P.H.; BHATIA, A.; VINAYAK, V.K. Mechanism of diethyl-dithiocarbamate induced elevation of parasitemia in *Plasmodium berghei* infection. Indian Journal of Medical Research, v.75, p.205-11, 1982.

NAMAZI, M.R. Potantial utility of disulfiram against leishmaniasis. Indian Journal of Medical Research, v.127, n.2, p.193-4, 2008.

NANDAKUMAR, D.N.; NAGARAJ, V.A.; VATHSALA, P.G.; RANGARAJAN, P.; PADMANABAN, G. Curcumin-artemisinin combination therapy for malaria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.50, n.5, p.1859-60, 2006.

NASH, T.; RICE, W.G. Efficacies of zinc-finger-active drugs against *Giardia lamblia*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.42, n.2, p.1488-92, 1998.

NCI D. Clinical development plan: curcumin. Journal of Cellular Biochemistry, v. 26, p.72–85, 1996.

NINGARAJ, N.S.; SCHLOSS, J.V.; WILLIAMS, T.D.; FAIMAN, M.D. Glutathione carbamoylation with S-methyl N,N-diethylthiolcarbamate sulfoxide and sulfone. Mitochondrial low Km aldehyde dehydrogenase inhibition and implications for its alcohol-deterrent action. Biochemical Pharmacology, v. 55, n.6, p.749-56, 1998.

OGUZTURK, H.; CIFTCI, O.; AYDIN, M.; TIMURKAAN, N.; BEYTUR, A.; YILMAZ, F. Ameliorative effects of curcumin against acute cadmium toxicity on male reproductive system in rats. Andrologia, v.44, n.4, p.243-9, 2012.

OLIVEIRA, M.F.; SILVAB, J.R.; DANSA-PETRETSKIB, M.; DE SOUZA, W.; BRAGAD, C.M.S.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, P.L. Haemozoin formation in the midgut of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*, FEBS Letters, v.477, n.1-2, p.95-98, 2000.

ONO, H.; FUNAKOSHI, T.; SHIMADA, H.; KOJIMA, S. Comparative effects of disulfiram and diethylthiocarbamate against testicular toxicity in rats caused by acute exposure to cadmium. Journal of Toxicology and Environmental Health, v.50, n.4, p.389-99, 1997.

\_\_\_\_.ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Guidelines for the treatment of malaria, 2006.

\_\_\_\_.ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Global Malaria programme. Q&A on malaria mortality estimates, 2012.

\_\_\_\_.ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE. Disponível em <[http://new.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&task=view&id=2155&Itemid=1912&language=en](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=view&id=2155&Itemid=1912&language=en)> Acessado em 17 de outubro de 2010.

\_\_\_\_.ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Disponível em <[http://www.who.int/gho/mdg/diseases/malaria/situation\\_trends\\_mortality/en/index.html](http://www.who.int/gho/mdg/diseases/malaria/situation_trends_mortality/en/index.html)> Acessado em 17 de outubro de 2010.

\_\_\_\_\_.ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Malaria epidemics detection and control forecasting and prevention. NAJERA, J.A.; KOUMETSOV, R.L.; DELACOLLETTE, C. Division of Control of Tropical Diseases, WHOh4AL198.1084, 1998.

PABÓN, A.; CARMONA, J.; BURGOS, L.C.; BLAIR, S. Oxidative stress in patients with non-complicated malaria. Clinical Biochemistry, v.36, p.71-8, 2003.

PANDE, V.; RAMOS, M.J. Nuclear factor kappa B: a potential target for anti-HIV chemotherapy. Current Medicinal Chemistry, v.10, p.1603–1615, 2003.

PANG, H.; CHEN, D.; CUI, Q.C.; DOU, Q.P. Sodium diethyldithiocarbamate, an AIDS progression inhibitor and a copper-binding compound, has proteasome-inhibitory and apoptosis-inducing activities in cancer cells. International Journal of Molecular Medicine, v.19, n.5, p.809-16, 2007.

PÉREZ-ARRIAGA, L.; MENDOZA-MAGAÑA, M.L.; CORTÉS-ZÁRATE, R.; CORONA-RIVERA, A.; BOBADILLA-MORALES, L.; TROYO-SANROMÁN, R.; RAMÍREZ-HERRERA, M.A. Cytotoxic effect of curcumin on *Giardia lamblia* trophozoites. Acta Tropica, v.98, n.2, p.152-61, 2006.

PERKINS, D.J.; WERE, T.; DAVENPORT, G.C.; KEMPAIAH, P.; HITTNER, J.B.; ONG'ECHA, J.M. Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. International Journal of Biological Sciences, v.7, n.9, p.1427-42, 2011.

PETERS, W. The chemotherapy of rodent malaria. X. Dynamics of drug resistance. II. Acquisition and loss of chloroquine resistance in *Plasmodium berghei* observed by continuous bioassay. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, v.64, p.25-40, 1970.

PINLAOR, S.; YONGVANIT, P.; PRAKOBWONG, S.; KAEWSAMUT, B.; KHOONTAWAD, J.; PINLAOR, P.; HIRAKU, Y. Curcumin reduces oxidative and nitrative DNA damage through balancing of oxidant-antioxidant status in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*. Molecular Nutrition & Food Research, v.53, n.10, p.1316-28, 2009.

PONKA, P. Cell biology of haem. The American Journal of the Medical Sciences, v.318, p.241–256, 1999.

PRAYONG, P.; BARUSRUX, S.; WEERAPREEYAKUL, N. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. Fitoterapia, v.79, n.7-8, p.598-601, 2008.

PRADEL, G.; GARAPATY, S.; FREVERT, U. Kupffer and stellate cell proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. Comparative Hepatology, v.3, n.1, S47, 2004.

PRADEL, G.; GARAPATY, S.; FREVERT, U. Proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. Molecular Microbiology, v.45, p.637–651, 2002.

PRUDÊNCIO, M.; RODRIGUEZ, A.; MOTA, M.M. The silent path to thousands of merozoites: the plasmodium liver stage. Nature Reviews Microbiology, v.4, p.849-856, 2006.

RAHDEN-STARONÍ, I.; GROSICKA-MACIĄG, E.; KURPIOS-PIEC, D.; CZECZOT, H.; GRZELA, T.; SZUMIŁO, M. The effects of sodium diethyldithiocarbamate in fibroblasts V79 cells in relation to cytotoxicity, antioxidative enzymes, glutathione, and apoptosis. Archives of Toxicology, v.86, n.12, p.1841-50, 2012.

RAVINDRANATH, V.; CHANDRASEKHARA, N. Metabolismo of curcumin: studies with [3H] curcumin. Toxicology, v.22, p.251-257, 1981.

REDDY RC, VATSALA PG, KESHAMOUNI VG, PADMANABAN G, RANGARAJAN PN. Curcumin for malaria therapy. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.326, n.2, p.472-4, 2005.

REISINGER, E.C.; KERN, P.; ERNST, M.; BOCK, P.; FLAD, H.D.; DIETRICH, M. Inhibition of HIV progression by dithiocarb. German DTC Study Group. Lancet, v.335, n.8691, p.679-82, 1990.

ROGERS, N.M.; STEPHENSON, M.D.; KITCHING, A.R.; HOROWITZ, J.D.; COATES, P.T. Amelioration of renal ischaemia-reperfusion injury by liposomal delivery of curcumin to renal tubular epithelial and antigen-presenting cells. British Journal of Pharmacology, v.166, n.1, p.194-209, 2012.

SACHS, J.; MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. Nature, v.415, p.680-685, 2002.

SAID, D.E.; ELSAMAD, L.M.; GOHAR, Y.M. Validity of silver, chitosan, and curcumin nanoparticles as anti-Giardia agents. Parasitology Research, v.111, n.2, p.545-54, 2012.

SALEM, M.M.; WERBOVETZ, K.A. Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. Current Medicinal Chemistry, v.13, n.21, p.2571-98, 2006.

SAMIM, M.; NAQVI, S.; ARORA, I.; AHMAD, F.J.; MAITRA, A. Antileishmanial activity of nanocurcumin. Therapeutic Delivery, v.2, n.2, p.223-30, 2011.

SAUNA, Z.E.; SHUKLA, S.; AMBUDKAR, S.V. Dissulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human cancers and fungal infections. Molecular BioSystems, v.1, p.127-134, 2005.

SCHAEFERS, M.M.; BRESHEARS, L.M.; ANDERSON, M.J.; LIN, Y.C.; GRILL, A.E.; PANYAM, J.; SOUTHERN, P.J.; SCHLIEVERT, P.M.; PETERSON, M.L. Epithelial proinflammatory response and curcumin-mediated protection from staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1. PLoS One, v. 7, n.3, e32813, 2012.

SCHEIBEL, L.W.; ADLER, A.; TRAGER, W. Tetraethylthiuram disulfide (Antabuse) inhibits the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.76, n.10, p.5303-7, 1979.

SCHERZ-SHOVAL, R.; SHVETS, E.; FASS, E.; SHORER, H.; GIL, L.; ELAZAR, Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. EMBO Journal, v.26, p.1749–1760, 2007.

SCHMITT, T.H.; FREZZATTI JR, W.A.; SCHEREIER, S. Heme-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cells lysis. Archives of Biochemistry and Biophysics, v.307, p.96–103, 1993.

SCHMIDT, T.J.; KHALID, S.A.; ROMANHA, A.J.; ALVES, T.M.; BIAVATTI, M.W.; BRUN, R.; DA COSTA, F.B.; DE CASTRO, S.L.; FERREIRA, V.F.; DE LACERDA, M.V.; LAGO, J.H.; LEON, L.L.; LOPES, N.P.; DAS NEVES AMORIM, R.C.; NIEHUES, M.; OGUNGBE, I.V.; POHLIT, A.M.; SCOTTI, M.T.; SETZER, W.N.; DE N C SOEIRO, M.; STEINDEL, M.; TEMPONEM, A.G. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part I. Current Medicinal Chemistry, v.19, n.14, p.2128-75, 2012.

SCHMIDT, T.J.; KHALID, S.A.; ROMANHA, A.J.; ALVES, T.M.; BIAVATTI, M.W.; BRUN, R.; DA COSTA, F.B.; DE CASTRO, S.L.; FERREIRA, V.F.; DE LACERDA, M.V.; LAGO, J.H.; LEON, L.L.; LOPES, N.P.; DAS NEVES AMORIM, R.C.; NIEHUES, M.; OGUNGBE, I.V.; POHLIT, A.M.; SCOTTI, M.T.; SETZER, W.N.; DE N C SOEIRO, M.; STEINDEL, M.; TEMPONEM, A.G.. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part II. Current Medicinal Chemistry, v.19, n.14, p.2176-228, 2012.

SCHUMANN, R.R. Malarial fever: hemozoin is involved but Toll-free. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.104, n.6, p.1743-4, 2007.

SCHWARZER, E.; SKOROKHOD, O.A.; BARRERA, V.; ARESE, P. Hemozoin and the human monocyte--a brief review of their interactions. Parassitologia, v.50, n.1-2, p.143-5, 2008.

SHAHIDUZZAMAN, M.; DYACHENKO, V.; KHALAFALLA, R.E.; DESOUKY, A.Y.; DAUGSCHIES, A. Effects of curcumin on *Cryptosporidium parvum* *in vitro*. Parasitology Research, v.105, n.4, p.1155-61, 2009.

SHOBA, G.; JOY, D.; JOSEPH, T.; MAJEED, M.; RAJENDRAN, R.; SRINIVAS, P.S. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. Planta Medica, v.64, p.353-356, 1998.

SIES H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Experimental Physiology, v.82, p.291-5, 1997.

SINGH, B.; SUNG, L.K.; MATUSOP, A.; RADHAKRISHNAN, A.; SHAMSUL, S.S.G.; COX-SINGH, J.; THOMAS, A.; CONWAY, D.J. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. The Lancet, v.363, n.1017-1024, 2004.

SOEIRO, M.DE N.; DANTAS, A.P.; DALIRY, A.; SILVA, C.F.; BATISTA, D.G.; DE SOUZA, E.M.; OLIVEIRA, G.M.; SALOMÃO, K.; BATISTA, M.M.; PACHECO, M.G.; SILVA, P.B.; SANTA-RITA, R.M.; BARRETO, R.F.; BOYKIN, D.W.; CASTRO, S.L. Experimental chemotherapy for Chagas disease: 15 years of research contributions from *in vivo* and *in vitro* studies. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.104, n.1, p.301-310, 2009.

SOMERS, P.K., MEDFORD, R.M., SAXENA, U. Dithiocarbamates: effects of lipid hydroperoxides and vascular inflammatory gene expression. Free Radical Biology & Medicine, v.28, p.1532– 1537, 2000.

SOOD, P.K.; NAHAR, U.; NEHRU, B. Stress proteins and glial cell functions during chronic aluminium exposures: protective role of curcumin. Neurochemical Research, v. 37, n.3, p.639-46, 2012.

SOUZA, A.V.; PETRETSKI, J.H.; DEMASI, M.; BECHARA, E.J.; OLIVEIRA, P.L. Urate protects a blood-sucking insect against hemin-induced oxidative stress. Free Radical Biology & Medicine, v.22, n.1-2, p.209-14, 1997.

SREEJAYAN, R.M.N. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. Journal of Pharmacy and Pharmacology, v.49, p.105–7, 1997.

SREENIVASAN, S.; RAVICHANDRAN, S.; VETRIVEL, U.; KRISHNAKUMAR, S. *In vitro* and *In silico* studies on inhibitory effects of curcumin on multi drug resistance associated protein (MRP1) in retinoblastoma cells. Bioinformation, v. 8, n.1, p.13-9, 2012.

STARLING, A.P.; EAST, J.M.; LEE, A.G. Stimulation of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum by disulfiram. Biochemical Journal, v.320, p.101-105, 1996.

STIEBLER, R.; SOARES, J.B.; TIMM, B.L.; SILVA, J.R.; MURY, F.B.; DANSA-PETRETSKI, M.; OLIVEIRA, M.F. On the mechanisms involved in biological heme crystallization. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, v.43, n.1, p.93-9, 2011.

STRIMPAKOS, A.S.; SHARMA, R.A. Curcumin: Preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. Antioxidants & Redox signaling, v.10, p.511-545, 2008.

SULLIVAN, D.J. Theories on malarial pigment formation and quinoline action. International Journal for Parasitology, v.32, n.13, p.1645-53, 2002.

SUNAGAWA, Y.; MORIMOTO, T.; WADA, H.; TAKAYA, T.; KATANASAKA, Y.; KAWAMURA, T.; YANAGI, S.; MARUI, A.; SAKATA, R.; SHIMATSU, A.; KIMURA, T.; KAKEYA, H.; FUJITA, M.; HASEGAWA, K. A natural p300-specific histone acetyltransferase inhibitor, curcumin, in addition to angiotensin-converting enzyme inhibitor, exerts beneficial effects on left ventricular systolic function after myocardial infarction in rats. Circulation Journal, v.75, n.9, p.2151-9, 2011.

SUSA, N.; UENO, S.; FURUKAWA, Y. Protective effect of diethyldithiocarbamate pretreatment on chromium (VI)-induced cytotoxicity and lipid peroxidation in primary cultures of rat hepatocytes. Journal of Veterinary Medical Science, v. 60, n.1, p.71-6, 1998.

SWAMY, A.V.; GULLIAYA, S.; THIPPESWAMY, A.; KOTI, B.C.; MANJULA, D.V. Cardioprotective effect of curcumin against doxorubicin-induced myocardial toxicity in albino rats. Indian Journal of Pharmacology, v. 44, n.1, p.3-7, 2012.

TAGBOTO, S.; TOWNSON, S. Antiparasitic properties of medicinal plants and other naturally occurring products. Advances in Parasitology, v. 50, p.199-295, 2001.

TAMEZ, P.A.; LANTVIT, D. ; LIM, E. ; PEZZUTO, J.M. Chemosensitizing action of cepharanthine against drug-resistant human malaria, *Plasmodium falciparum*. Journal of Ethnopharmacology, v.98, p. 137–142, 2005.

TRAGER, W.; JENSEN, J. Human malaria parasites in continuous culture. Science, v.193, p.673-675, 1976.

TRAIGER, G.J.; VYAS, K.P.; HANZLIK, R.P. Effect of thiocarbonyl compounds on alpha-naphthylisothiocyanate-induced hepatotoxicity and the urinary excretion of [35S]alpha-naphthylisothiocyanate in the rat. Toxicology and Applied Pharmacology, v.72, n.3, p.504-12, 1984.

THE BRITISH MEDICAL JOURNAL. Indian in 1908, p. 1300 – 1301, 28 de julho de 1910.

TURRENS, J.F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. Molecular Aspects of Medicine, v.25, p.211–220, 2004.

URBAN, B.C.; TODRYK, S. Malaria pigment paralyzes dendritic cells. Journal of Biology, v. 5, n.2, p.4, 2006.

VAN GORP, R.M.; VAN DAM-MIERAS, M.C.; HORNSTRA, G.; HEEMSKERK, J.W. Effect of membrane-permeable sulfhydryl reagents and depletion of glutathione on calcium mobilisation in human platelets. Biochemical Pharmacology, v.53, n.10, p.1533-42, 1997.

VATHSALA, P.G.; DENDE, C.; NAGARAJ, V.A.; BHATTACHARYA, D.; DAS, G.; RANGARAJAN, P.N.; PADMANABAN, G. Curcumin-artether combination therapy of *Plasmodium berghei*-infected mice prevents recrudescence through immunomodulation. PLoS One, v.7, n.1, e29442, 2012.

WALKER, E.M., CANNON, D.J., REIFSTECK, M.E., HOBBS, K.A., HARDIN, H.F., JONES, M.M. AND SKEELES, J.K. Effects of diethyldithiocarbamate and structural analogs in mice with systemic candidal infections. Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, v.56, n.2, p.253-263, 1987.

WANG, M.E.; CHEN, Y.C.; CHEN, I.S.; HSIEH, S.C.; CHEN, S.S.; CHIU, C.H. Curcumin protects against thioacetamide-induced hepatic fibrosis by attenuating the inflammatory response and inducing apoptosis of damaged hepatocytes. The Journal of Nutritional Biochemistry, v.23, n.10, p.1352-66, 2012.

WANG, C.; QIN, X.; HUANG, B.; HE, F.; ZENG, C. Hemolysis of human erythrocytes induced by melamine-cyanurate complex. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.402, p.773-777, 2010.

WILLIAMSON, J.; SCOTT-FINNIGAN, T.J. Trypanocidal activity of antitumor antibiotics and other metabolic inhibitors. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.13, n.5, p.735-44, 1978.

WIRTH, C.C.; PRADEL, G. Molecular mechanism of host cell egress by malariaparasites. International Journal of Medical Microbiology, v.302, p. 172– 178, 2012.

WITKOWSKI, B.; LELIÈVRE, J.; NICOLAU-TRAVERS, M.L.; IRIART, X.; NJOMNANG SOH, P.; BOUSEJRA-ELGARAH, F.; MEUNIER, B.; BERRY A.; BENOIT-VICAL, F. Evidence for the contribution of the hemozoin synthesis pathway of the murine *Plasmodium yoelii* to the resistance to artemisinin-related drugs. PLoS One, v. 7, n.3, e32620, 2012.

WRIGHT, C.W. Recent developments in research on terrestrial plants used for the treatment of malaria. Natural Product Reports, v.27, n.7, p.961-8, 2010.

WUNDERLICH, J.; ROHRBACH, P.; DALTON, J.P. The malaria digestive vacuole. Frontiers in Bioscience (Schol Ed), v.1, n.4, p.1424-1448, 2012.

WYKES, M.N.; GOOD, M.F. What have we learnt from mouse models for the study of malaria? European Journal of Immunology, v.39, p.1991–2058, 2009.

WYSOR MS, ZWELLING LA, SANDERS JE, GRENAN MM. Cure of mice infected with *Trypanosoma rhodesiense* by cis-diamminedichloroplatinum (II) and disulfiram rescue. Science, v.217, n.4558, p.454-6, 1982.

XIAO, H.; XIAO, Q.; ZHANG, K.; ZUO, X.; SHRESTHA, U.K. Reversal of multidrug resistance by curcumin through FA/BRCA pathway in multiple myeloma cell line MOLP-2/R. Annals of Hematology, v.89, n.4, p.399-404, 2010.

XIE, Z.; KLIONSKY, D.J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. Nature Cell Biology, v.9, n.10, p.1102-1109, 2007.

YAYON, A.; CABANTCHIK, Z.I.; GINSBURG, H. Identification of the acidic compartment of *Plasmodium falciparum* infected human erythrocytes as the target of the antimalarial drug chloroquine. The EMBO Journal, v.3, n.11, p.2695-2700, 1984.

YEUNG, S.; VAN DAMME, W.; SOCHEAT, D.; WHITE, N. J.; MILLS, A. Access to artemisinin combination therapy for malaria in remote areas of Cambodia. Malaria Journal, v.7, p.96, 2008.

YING, P.; SHAKIBAEI, M.; PATANKAR, M.S.; CLAVIJO, P.; BEAVIS, R.C.; CLARK, G.F.; FREVERT, U. The Malaria Circumsporozoite Protein: Interaction of the Conserved Regions I and II-Plus with Heparin-like Oligosaccharides in Heparan Sulfate. Experimental Parasitology, v.85, p.168–182, 1997.

ZIEGLER, J.; LINCK, R.; WRIGHT, D.W. Heme Aggregation inhibitors: antimalarial drugs targeting an essential biomineralization process. Current Medicinal Chemistry, v. 8, n.2, p.171-89, 2001.

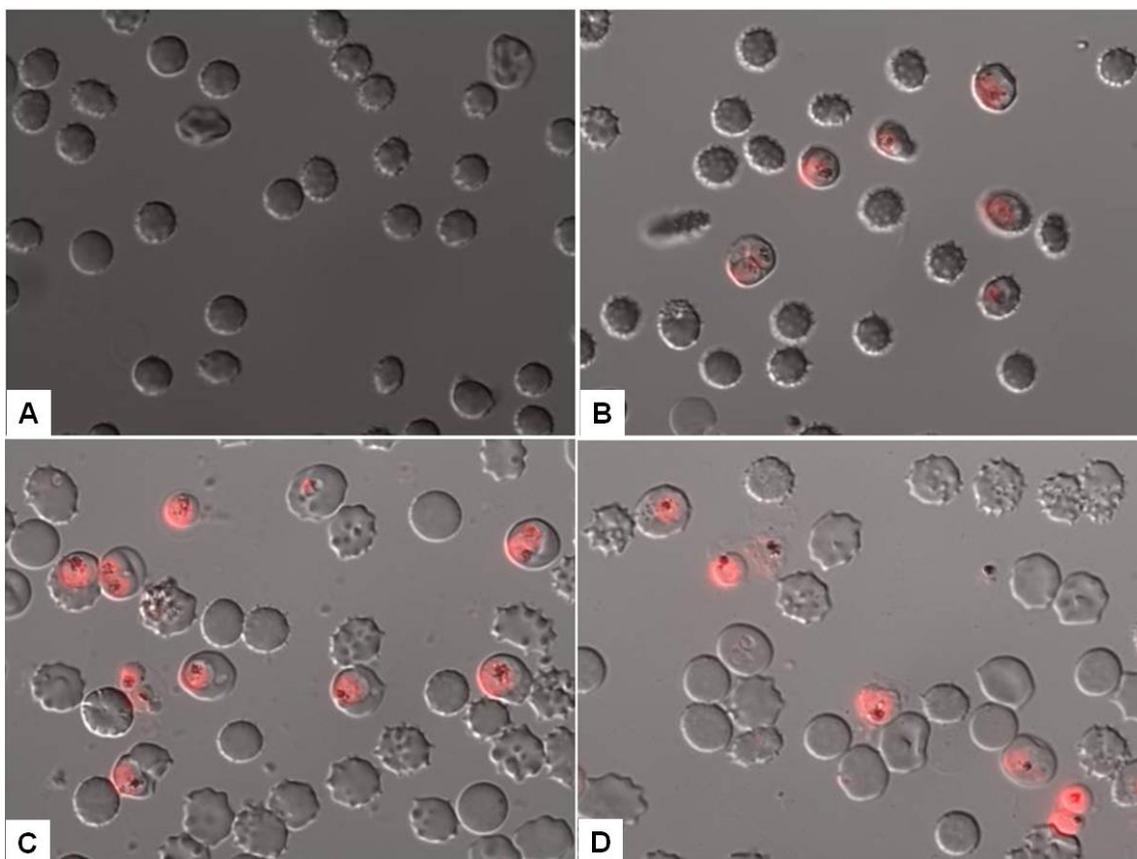
## 10. APÊNDICE

---

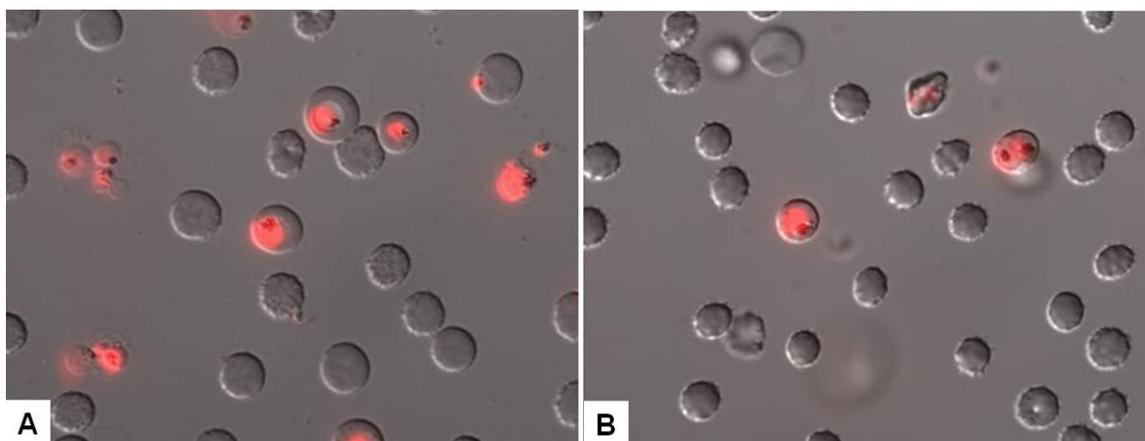
### Apêndice A

#### A1 Colocalização das células positivas para espécies reativas ao oxigênio por fluorescência com contraste interferencial

É possível observar nas figuras abaixo que a marcação para a sonda DHE é restrita às áreas onde existe o *P. falciparum*. É importante essa verificação, tendo em vista que o *P. falciparum* é um parasito intracelular, e na leitura por citometria de fluxo podemos garantir que toda a fluorescência é proveniente do parasito, pois como mostram as imagens abaixo, as hemácias não são marcadas.



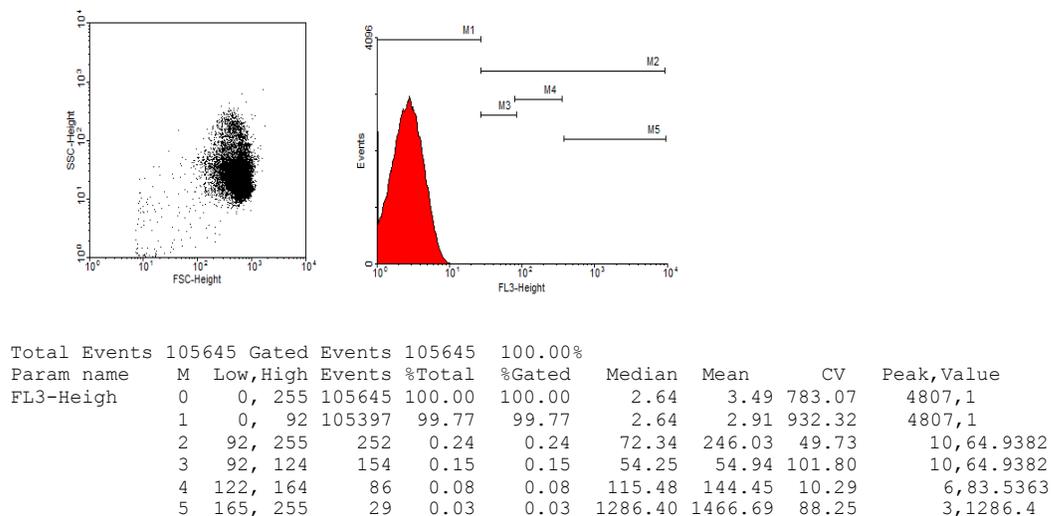
**Figura A.1 1 Colocalização da sonda DHE, contraste interferencial e fluorescência.** A- Sobreposição de imagem de contraste interferencial e marcação por DHE em célula não infectada. B – marcação por DHE em hemácias infectadas com *P. falciparum* na fase de trofozoíto do controle com o DMSO para a sonda DHE. Hemácias infectadas com *P. falciparum* na fase de trofozoíto tratadas com DDC a 10µg/mL (C) e curcumina a 10µg/mL (D) por 2 horas com a sonda DHE.



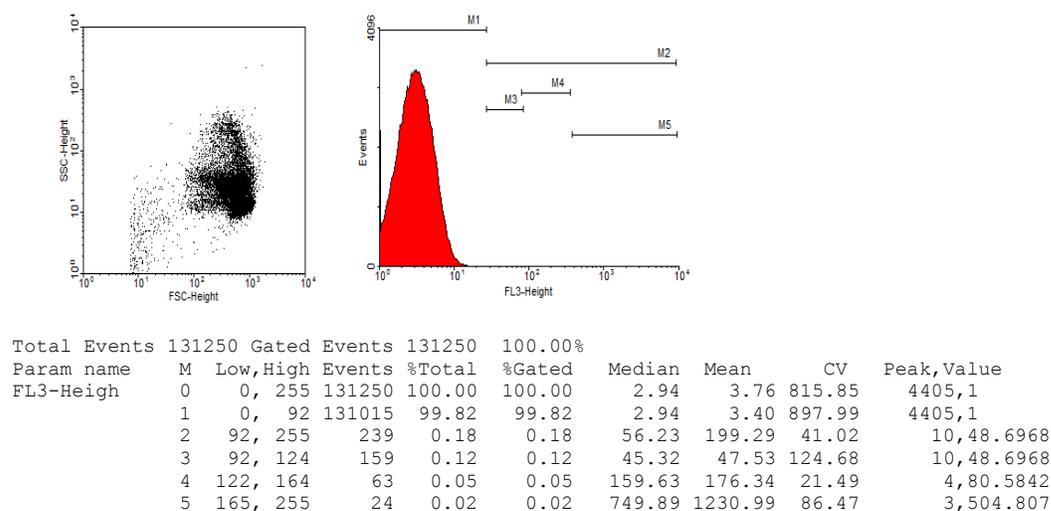
**Figura A.1 2: Colocalização da sonda DHE, contraste interferencial e fluorescência**  
Sobreposição de imagem de contraste interferencial e marcação por DHE em hemácias infectadas com *P. falciparum* na fase de trofozoítos tratadas com *N*-acetil-cisteína a 10µg/mL e coincubadas por 2 horas com DETC a 10µg/mL (A) ou com curcumina a 10µg/mL (B).

## A.2 Histogramas e dot plot da detecção citométrica de espécies reativas ao oxigênio

Os gráficos abaixo apresentam os histogramas e dados do citometro de fluxo referentes à avaliação dos níveis de EROs apresentados pelas hemácias infectadas por *P. falciparum*, quando submetidas ao tratamento do DETC, curcumina e a combinação dos compostos. É importante observar nos dados a média da intensidade de fluorescência, a porcentagem da população expressando a fluorescência (% do gate) e o coeficiente de variação (CV) dos dados.

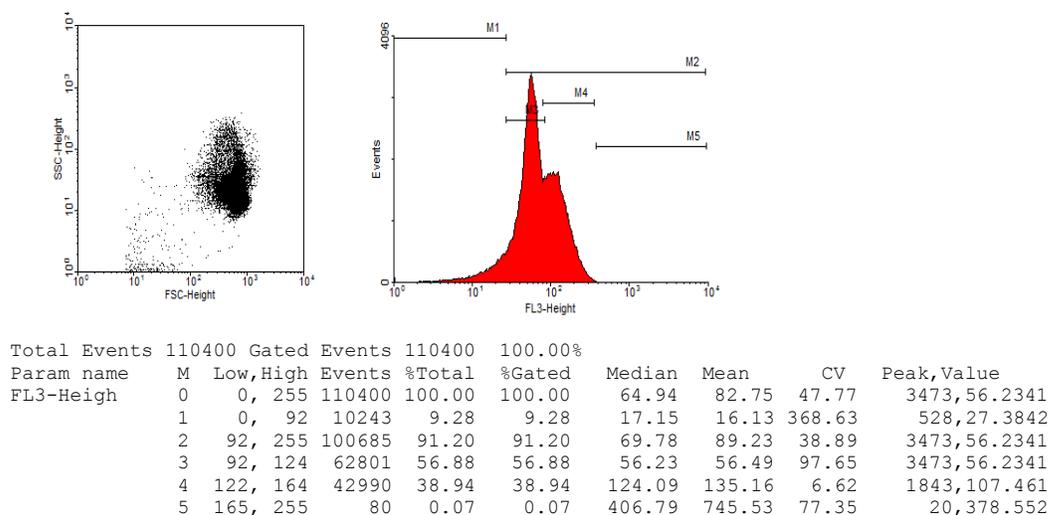


**Figura A.2 1: Hemácia não infectada.** Citometria de fluxo utilizada para observação de hemácias não infectadas por *Plasmodium falciparum* e sem utilização da sonda DHE, observando assim o padrão expresso pela célula. É possível observar que 99,77% da população estão apresentando uma média de 2,91, mostrando um baixo índice de autofluorescência.

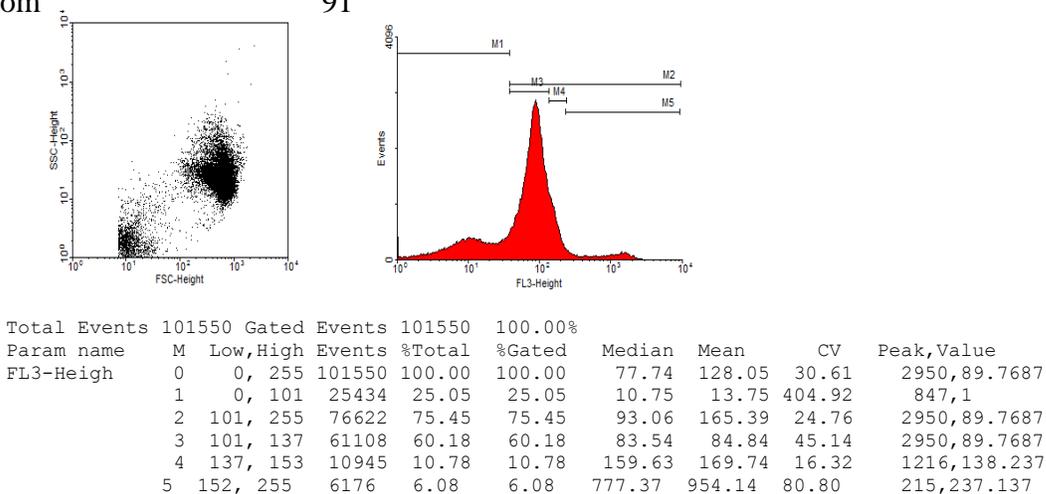


**Figura A.2 2 Hemácia infectada sem DHE.** Citometria de fluxo utilizada para análise de hemácias infectadas por *Plasmodium falciparum* sem utilização da sonda DHE, revelando assim o padrão expresso pelas células infectadas. É possível observar que 99,82% da população estão apresentando uma média de 3.40, mostrando um baixo índice de autofluorescência. Sendo

possível também observar que o padrão é bastante semelhante ao encontrado nas células não infectadas.

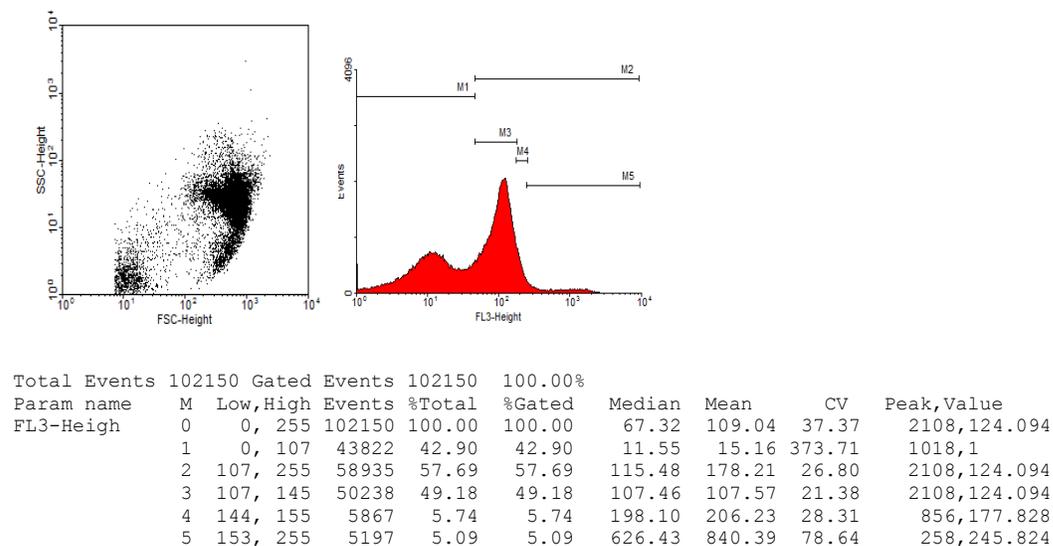


**Figura A.2 3 Hemácia infectada incubada com a sonda DHE.** Citometria de fluxo de hemácias infectadas por *Plasmodium falciparum*, utilizando a sonda DHE, observando assim o padrão de fluorescência das células infectadas após incubação com a sonda. É possível verificar a alteração do posicionamento do histograma, demonstrando a presença de espécies reativas ao oxigênio nas células infectadas. Esta observação corrobora as informações da microscopia de fluorescência. Observamos então três populações distintas (M3; M4; M5), com diferentes expressões de fluorescência. A população M2 (população total) apresenta uma media de 89.23, com

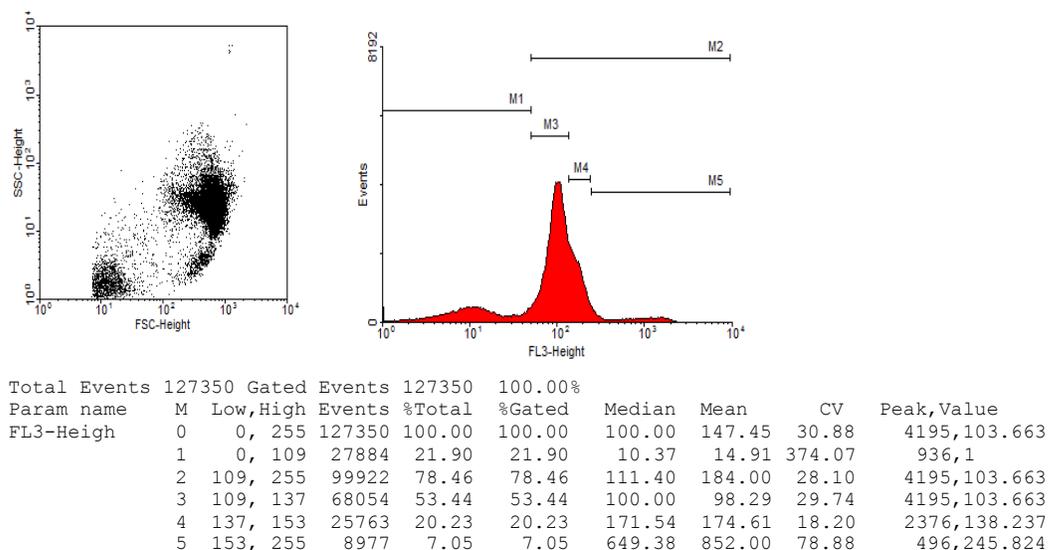


**Figura A.2 4 Hemácia infectada incubada com 10µg/mL de DETC por 2 horas e 10µM de DHE.** Citometria de fluxo de hemácias infectadas por *Plasmodium falciparum*, utilizando a sonda DHE e tratadas com DETC 10 µg/mL por 2 horas. A população M2 (população total) apresentou uma média de 165.39 com uma porcentagem de 75,45 do gate. É possível observar

que houve um aumento na intensidade de fluorescência. Entretanto houve uma diminuição na população M3. Sendo possível concluir que houve um aumento na intensidade de fluorescência das células infectadas quando tratadas com o DETC, em comparação às células infectadas sem pressão de droga.



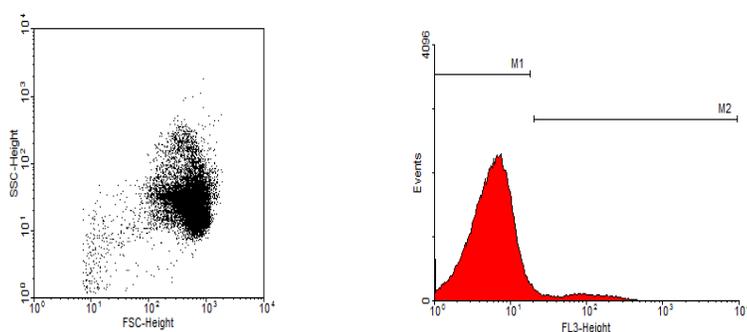
**Figura A.2 5 Hemácia infectada incubada com 10µg/mL de curcumina por 2 horas e 10µM de DHE.** Citometria de fluxo de hemácias infectadas por *Plasmodium falciparum*, utilizando a sonda DHE e tratadas com curcumina 10µg/mL por 2 horas. A população M2 (população total) apresentou uma media de 178.21 com uma porcentagem de 57,69 do *gate*. Nota-se que houve um aumento na intensidade de fluorescência. Entretanto uma diminuição nas populações M2, M3 e M4. Porém o tratamento com a curcumina causou um aumento muito pronunciado na população M1, que representa a população quando não incubada com a sonda, o que pode significar que o tratamento com a droga aumentou o número de células mortas e que pode estar relacionado com a diminuição das outras populações.



**Figura A.2 6 Hemácia infectada tratada com 10µg/mL de DETC combinado com 10µg/mL de curcumina por 2 horas e 10µM de DHE.** Citometria de fluxo de hemácias infectadas por *Plasmodium falciparum* utilizando a sonda DHE e tratadas com Curcumina 10µg/mL e com DETC a 10µg/mL por 2 horas. A população M2 (população total) apresenta uma media de 184.00 com uma porcentagem de 78,46 do gate. Observamos que em comparação com a curcumina, a intensidade de fluorescência manteve-se bastante parecida. Entretanto houve um aumento na população que apresentava marcação. Quando comparado com o DETC sozinho, a combinação levou a um aumento na intensidade de fluorescência. Porém a população manteve-se muito próxima.

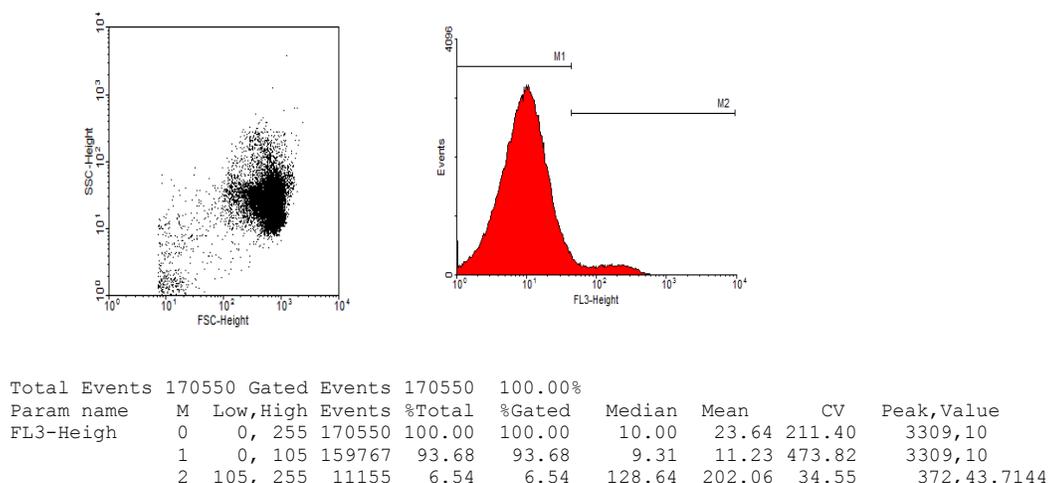
### A.3 Histogramas e dot plot da detecção de superóxido mitocondrial por citometria de fluxo

Os gráficos abaixo apresentam os histogramas e dados do citômetro de fluxo referentes à avaliação dos níveis de superóxido mitocondrial apresentados pelas hemácias infectadas por *P. falciparum*, quando submetidas ao tratamento do DETC, curcumina e a combinação dos compostos. É importante observar nos dados a mediana, a média da intensidade de fluorescência, a porcentagem da população expressando a fluorescência (% do gate) e o coeficiente de variação (CV) dos dados.

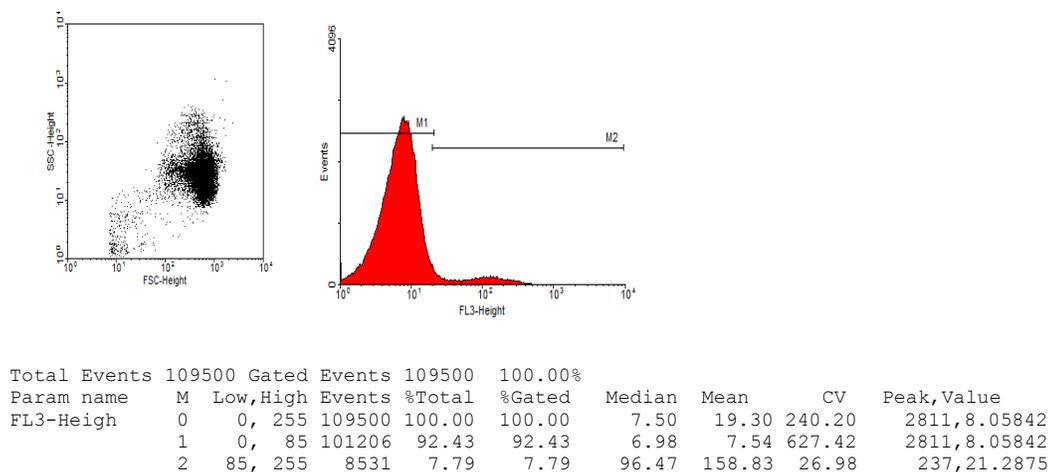


Param name	M	Low, High	Events	%Total	%Gated	Median	Mean	CV	Peak, Value
Total Events			103200	100.00	100.00%				
Gated Events			103200	100.00					
FL3-Heigh	0	0, 255	103200	100.00	100.00	6.26	16.22	279.52	2369,7.49894
	1	0, 81	94815	91.88	91.88	5.83	6.34	690.03	2369,7.49894
	2	84, 255	7883	7.64	7.64	80.58	134.78	20.94	198,20.5353

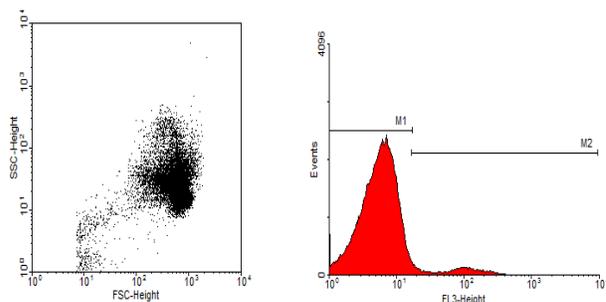
**Figura A.3 1: Citometria de fluxo de hemácia infectada com a sonda MitoSox.** Citometria de fluxo de hemácias infectadas por *Plasmodium falciparum* utilizando a sonda MitoSox a 10 $\mu$ M por 10 minutos, para avaliar os níveis de superóxido mitocondrial basal. É possível observar que a população M2 corresponde a 7,64% do total e apresenta uma mediana de 80,58 e uma média de 134,78. Mostrando assim o comportamento da célula em seu estágio basal.



**Figura A.3 2: Citometria de fluxo de hemácia infectada tratadas com DETC com a sonda MitoSox.** Citometria de fluxo de hemácias infectadas com *P. falciparum* tratado com DETC 10 $\mu$ g/mL durante 2 horas e posteriormente incubadas com a sonda MitoSox. É possível observar, se comparado aos dados do controle, que houve um aumento significativo da mediana e da média da intensidade de fluorescência dessas células, indicando assim que o DETC aumenta a produção de superóxido no compartimento mitocondrial.

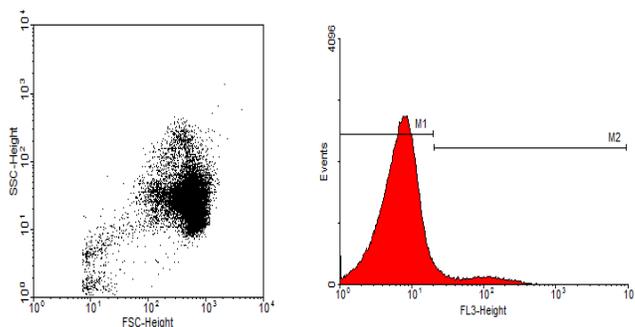


**Figura A.3 3: Citometria de fluxo de hemácia infectada tratadas com DETC e curcumina com a sonda MitoSox.** Citometria de fluxo de hemácias infectadas com *Plasmodium falciparum* tratadas com DETC 10 $\mu$ g/mL e curcumina 10 $\mu$ g/mL durante 2 horas e posteriormente incubado com a sonda MitoSox. É possível observar que, em comparação aos dados do controle, houve um aumento da mediana e da média da intensidade de fluorescência dessas células. Entretanto, quando comparado com o tratamento com o DETC, observamos que ocorre um declínio na intensidade de fluorescência e que, de certa forma, para o O<sub>2</sub><sup>-</sup>, a curcumina apresenta um efeito protetor, mas não suficiente para reverter ao nível do controle.



Param name	M	Low, High	Events	%Total	%Gated	Median	Mean	CV	Peak, Value
Total Events			102000	100.00%					
Gated Events			102000	100.00%					
FL3-Heigh	0	0, 255	102000	100.00	100.00	6.04	16.27	272.42	2497, 7.23394
	1	0, 79	94430	92.58	92.58	5.62	6.15	703.28	2497, 7.23394
	2	78, 255	8062	7.90	7.90	83.54	134.81	23.43	262, 16.5482

**Figura A.3 4 : Citometria de fluxo de hemácia infectada tratadas com DETC e tocoferol com a sonda MitoSox.** Citometria de fluxo de hemácias infectadas com *Plasmodium falciparum* tratadas com DETC a 10µg/mL na presença de tocoferol a 10µg/mL. Podemos observar que o tocoferol apresenta um efeito protetor para as células, retornando os níveis de  $O_2^-$  mitocondrial ao nível do controle.



Param name	M	Low, High	Events	%Total	%Gated	Median	Mean	CV	Peak, Value
Total Events			115200	100.00%					
Gated Events			115200	100.00%					
FL3-Heigh	0	0, 255	115200	100.00	100.00	7.50	18.78	250.03	2821, 8.05842
	1	0, 83	104560	90.76	90.76	6.98	7.41	633.95	2821, 8.05842
	2	84, 255	10640	9.24	9.24	69.78	130.53	22.23	361, 20.5353

**Figura A.3 5: Citometria de fluxo de hemácia infectada tratadas com DETC, curcumina e tocoferol com a sonda MitoSox.** Citometria de fluxo de hemácias infectadas com *Plasmodium falciparum* tratadas com DETC a 10µg/mL e curcumina a 10µg/mL na presença de tocoferol a 10µg/mL. Podemos observar que o tocoferol apresenta um efeito protetor para as células, revertendo os níveis de  $O_2^-$  mitocondrial abaixo do nível do controle. Possivelmente uma reação conjunta com a curcumina.