

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
Mestrado em Ciências da Saúde

**PLASMÓDIOS TRANSFECTADOS COM A PROTEÍNA DE
FLUORESCÊNCIA VERDE (GFP) PARA ENSAIOS DE QUIMIOTERAPIA
EXPERIMENTAL.**

por

BRUNO ANTONIO MARINHO SANCHEZ

Belo Horizonte - MG
Fevereiro de 2007

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

PLASMÓDIOS TRANSFECTADOS COM A PROTEÍNA DE FLUORESCÊNCIA
VERDE (GFP) PARA ENSAIOS DE QUIMIOTERAPIA EXPERIMENTAL.

por

Bruno Antonio Marinho Sanchez

Dissertação apresentada
com vistas à obtenção do
Título de Mestre em
Ciências da Saúde na área
de Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientadora: Dra. Luzia Helena Carvalho

Belo Horizonte – MG
Fevereiro de 2007

“FICHA CATALOGRÁFICA”

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

S211p
Ano

Sanchez, Bruno Antonio Marinho.

Plasmódios transfectados com a Proteína de Fluorescência Verde (GFP) para ensaios de quimioterapia experimental / Bruno Antonio Marinho Sanchez. – Belo Horizonte, 2007.

xi, 50 f: il.; 210 x 297 mm.

Bibliografia: f. 42 - 49

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Quimioterapia 2. Malária 3. GFP I. Título. II. Carvalho, Luzia Helena (Orientação)

CDD – 22. ed. – 616.936 2

Trabalho realizado no Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“Pessoalmente, sinto-me capaz de atingir o mais alto grau de felicidade possível, através das grandes obras de arte. Delas recebo dons espirituais de tal força que coisa alguma poderia proporcionar-me idênticas sensações. Em minha vida, as visões artísticas têm desmedida influência. Afinal, o trabalho de pesquisadores e cientistas germina no campo da imaginação e da intuição”.

Albert Einstein

À Luzia Helena Carvalho pela orientação, amizade, estímulo e dedicação pelo meu ingresso na atividade científica.

Aos meus pais, minha Vó,
irmãos, sobrinhos e minha
namorada pelo amor, apoio e
carinho em todos os momentos.

Agradecimentos

À Deus pelo dom da vida.

À Karlinha por todo amor, apoio, cumplicidade, incentivos constantes e pela companhia nos Sábados, Domingos e feriados no laboratório.

Aos meus familiares.

Ao meu amigo, Carnot Guedes de Sete Lagoas, pela amizade e incentivos .

Ao amigos do Laboratório de Imunologia, CPqRR, e pelo uso do Facscalibur.

À Tiza do Laboratório de Imunologia pelo auxílio com o Facscalibur.

À Dra. Cristiana Brito e Dr. Luciano Moreira pela amizade e pelos ensinamentos.

Aos amigos do laboratório Antônio, Armando, Bruno Rocha, Cristiane, Flávia Alessandra, Flávia Rodrigues, Isabela Cerávolo, Isabela Oliveira, Júnia, Maíra, Paloma, Thaís, Thiago, Geraldo, e em especial a Alice e ao Fernando pelo carinho, companheirismo e pela alegria ao longo de nossa convivência.

Aos Mestres por todo os ensinamentos.

À Marialice de Sales Antunes, Secretária do Laboratório de Malária, pelo apoio dado.

Ao Geraldo Felício pela amizade e ajuda técnica.

Aos amigos do CPqRR, Alysson, Dany, Ricardo Barata, Sú, e Gustavo pela amizade.

À todos que compõe o Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), na pessoa do seu diretor, o Dr. Álvaro José Romanha.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Àqueles que de alguma forma contribuíram não apenas para a realização deste trabalho, mas também, para o meu crescimento pessoal.

INDICE

RESUMO	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Situação atual da malária humana.....	1
1.2. Ciclo biológico da malária humana.....	3
1.3. Antimaláricos utilizados para o tratamento da malária.....	4
1.4. A resistência dos parasitos aos antimaláricos.....	8
1.5. Testes antimaláricos para esquizonticidas sanguíneos.....	10
1.5.1. Testes esquizonticidas sanguíneos <i>in vivo</i>	10
1.5.2. Testes esquizonticidas sanguíneos <i>in vitro</i>	11
1.6. Métodos alternativos para detecção de parasitas da malária.....	12
1.7. Emprego da Proteína de Fluorescência Verde (GFP) como marcador para identificar e quantificar os parasitos.....	13
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Animais.....	17
3.2. Cepas de <i>Plasmodium</i>	17
3.2.1. <i>Plasmodium berghei</i>	17
3.2.2. <i>Plasmodium falciparum</i>	17
3.3. Ensaio <i>in vivo</i>	18
3.3.1. Infecção.....	18
3.3.2. Determinação das parasitemias <i>in vivo</i>	18
3.3.2.1. Por microscopia óptica.....	18
3.3.2.2. Pela técnica de Citometria de fluxo.....	18
3.3.3. Tratamento antimalárico.....	20
3.3.4. Avaliação da virulência das cepas de <i>P. berghei</i>	21
3.4. Ensaio <i>in vitro</i>	22
3.4.1. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Plasmodium falciparum</i>	22
3.4.2. Sincronização da cultura.....	22
3.4.3. Microteste utilizando citometria de fluxo.....	23
3.4.4. Microteste usando radiomarcagem.....	24

3.5. Análise de dados.....	25
4. RESULTADOS.....	26
4.1 Resultados <i>in vivo</i>	26
4.1.1. Sensibilidade da cepa transfectada à pirimetamina.....	26
4.1.2. Virulência da cepa GFP- <i>P. berghei</i>	27
4.1.3. Susceptibilidade da cepa GFP- <i>P. berghei</i> aos principais antimaláricos..	28
4.1.4. Avaliação da cepa GFP- <i>P. berghei</i> na citometria de fluxo.....	29
4.1.5. Avaliação da cepa GFP- <i>P. berghei</i> em ensaios quimioterápicos.....	31
4.2. Ensaios <i>in vitro</i>	33
4.2.1. Avaliação da especificidade da cepa GFP- <i>P. falciparum</i> na citometria de fluxo	33
4.2.2. Ensaios quimioterápicos.....	

RESUMO

A resistência do *Plasmodium falciparum* aos principais antimaláricos ainda é o principal problema no controle da malária humana. Essa situação gera uma necessidade de se desenvolver novos medicamentos contra a malária bem como ensaios que acelerem o processo de triagem de novas drogas. Recentemente, parasitos da malária transfectados com a Proteína de Fluorescência Verde (GFP) têm sido produzidos em sistema de transformação estável. Isso permite utilizar a fluorescência como um marcador para identificar os parasitos. Assim, buscou-se neste estudo determinar o uso potencial de parasitas da malária murina (*P. berghei*) e da malária humana (*P.falciparum*) transfectados com a GFP para os ensaios de quimioterapia experimental. Para os experimentos *in vivo*, utilizou-se a cepa GFP-*P. berghei* que apresenta um gene exógeno de fluorescência verde e resistência à pirimetamina (Sultan et al. 1999). Camundongos suíço-albinos ou BALB/c foram infectados com a cepa GFP-*P. berghei* ou a cepa não transformada (NK65), por via intraperitoneal. Excluindo as drogas com mecanismo de ação similar ao da pirimetamina, os resultados iniciais demonstraram que a susceptibilidade a diferentes classes de antimaláricos foi semelhante entre a cepa GFP-*P. berghei* e a cepa *P. berghei* NK65. Demonstrou-se ainda que a virulência *in vivo* da cepa GFP-*P. berghei* foi similar a da cepa não transformada. A próxima etapa foi validar a cepa GFP-*P. berghei* em um ensaio fluorimétrico para avaliar drogas antimaláricas. Para tal, os animais foram infectados com a cepa GFP-*P. berghei*, tratados com antimaláricos convencionais, e as parasitemias avaliadas pela citometria de fluxo ou pelo método convencional de microscopia óptica. A parasitemia determinada pela citometria de fluxo se correlacionou com aquela determinada pela microscopia óptica. Assim, os resultados permitiram concluir que a cepa GFP-*P. berghei* foi adequada para a triagem de drogas *in vivo* podendo substituir a técnica convencional de microscopia óptica. Buscando agora validar um protocolo fluorimétrico *in vitro* para substituir o método de referência de triagem de drogas com hipoxantina tritiada, utilizou-se a cepa GFP-*P.falciparum* que apresenta fluorescência verde e resistência ao metotrexato (kadekoppala et al. 2000). A cepa GFP-*P.falciparum* foi mantida em cultivo contínuo e as parasitemias das culturas foram analisadas, em paralelo, por citometria de fluxo e microscopia óptica. Os resultados obtidos *in vitro* também demonstraram que a quantificação da parasitemia obtida por citometria de fluxo era específica. Finalmente, em ensaios quimioterápicos *in vitro*, utilizando antimaláricos convencionais, o método fluorimétrico foi similar ao da hipoxantina tritiada. Portanto, os resultados *in vitro* permitiram concluir que o método fluorimétrico com a cepa GFP-*P. falciparum* se mostrou apto a substituir o método radioativo. A vantagem em se utilizar parasitos transfectados com a GFP em ensaios de triagem de drogas é a simplicidade e facilidade da técnica, não sendo necessário qualquer preparação prévia das amostras para a leitura da fluorescência. O modelo descrito neste trabalho pode funcionar como uma importante ferramenta para acelerar o processo de desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da malária.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Situação atual da malária humana

A malária é causada por um protozoário do filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*. Sabe-se que hoje existem aproximadamente 150 espécies do parasito causadoras da malária em diferentes hospedeiros vertebrados, sendo que somente quatro espécies infectam o homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*.

A malária humana é uma doença endêmica nas áreas tropicais e subtropicais do mundo, incluindo Américas Central e do Sul, Sudeste Asiático e a África. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), a doença afeta cerca de 600 milhões de indivíduos, causando acima de um milhão de mortes anualmente (Snow et al. 2005). A África concentra 90% dos casos de malária do mundo sendo que a mortalidade é maior do que em outras regiões devido, principalmente, ao limitado acesso ao tratamento nas vilas (Miller et al. 2002). Nos últimos anos, a doença vem se propagando para as áreas urbanas devido ao intenso e não planejado processo de urbanização, e estima-se que, apenas no continente africano, haja uma incidência de 25 - 103 milhões de casos por ano (Keiser et al. 2004). No Brasil, o mesmo processo vem ocorrendo em cidades como Manaus, Porto Velho e Belém, que apresentam áreas de aglomerados urbanos nas regiões da periferia. Estas áreas têm sido importantes focos de infecção por receberem um fluxo intenso de pessoas provindas de outros municípios que buscam oportunidades de trabalho (Secretaria de Vigilância em Saúde 2005).

No Brasil, a malária é endêmica na Amazônia legal, onde as condições naturais são favoráveis ao desenvolvimento da doença. Nesta área, a transmissão está associada com a ocupação intensificada da região, que ocorreu principalmente nas décadas de 70 e 80. Indivíduos provenientes de áreas não endêmicas foram atraídos para o local devido aos projetos de colonização, expansão de fronteiras agrícolas, construção de estradas e hidroelétricas, extração de madeira e mineração (Marques 1986). As precárias condições de saneamento e moradia, a carência médica e educacional e o alto desequilíbrio ecológico, expandiram os focos de malária já existentes, levando a doença a assumir proporções alarmantes nas últimas décadas. Como consequência deste

processo, cerca de 600 mil casos da doença foram registrados no final da década de 90, sendo 99,7% destes na Amazônia legal, na qual se encontram regiões de risco variado (FUNASA 2002).

Nos últimos anos, o Brasil vem adotando as diretrizes divulgadas na Conferência Ministerial de Amsterdã, de 1992, que objetivou prevenir a mortalidade, a morbidade e avaliar as perdas sociais e econômicas produzidas pela doença. O Ministério da Saúde, diante da grave situação epidemiológica apresentada no ano de 1999, lançou em 20 de julho de 2000 o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal (PIACM). A estratégia estava centrada na mobilização política, estruturação dos sistemas locais de saúde, diagnóstico e tratamento precoce, educação em saúde, capacitação de recursos humanos e ações interinstitucionais (Ministério da Saúde 2003). Como consequência, em 2001, foram registrados cerca de 400 mil casos de malária, que representou uma redução de cerca de 40% (FUNASA 2002). Em alguns estados da região endêmica, como Amazonas, Acre e Roraima, a redução foi superior a 50%, quando comparado com 1999.

Embora tenha havido uma redução significativa do número de casos de malária até 2002, a partir desse ano houve um aumento progressivo, refletindo as dificuldades na sustentabilidade das estratégias utilizadas até então para o controle da malária. Esse aumento pode ser atribuído, principalmente, às epidemias nas cidades de Porto Velho, Manaus e municípios nos arredores de Cruzeiro do Sul no Acre (Secretaria de Vigilância em Saúde 2005). Atualmente, na perspectiva de manter a malária em números aceitáveis no Brasil, como os observados na década de 1970 (IPA 3,9/1.000), e consolidar o processo de descentralização do sistema de saúde, inclusive na região extra-amazônica, o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) tem como objetivos a redução da incidência de malária, a redução da mortalidade e das formas graves da doença, a eliminação da transmissão em áreas urbanas e manter a ausência da transmissão da doença nos locais onde ela foi interrompida. Para alcançar tais objetivos o programa propõe estratégias como apoio à estruturação dos serviços locais de saúde, diagnóstico e tratamento precoce, fortalecimento da vigilância da malária, capacitação de recursos humanos, Educação em saúde, Comunicação e Mobilização social (ESMS), controle seletivo de vetores, pesquisa, monitoramento do PNCM, sustentabilidade

política, e ainda, a participação da população e uma abordagem multi-setorial dos órgãos públicos para tornar mais efetivo o controle da doença (Tauil 2006).

1.2. Ciclo biológico dos parasitos da malária humana

O ciclo vital dos parasitos da malária humana compreende duas fases: uma fase sexuada ou esporogônica, que se passa em fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles* e outra assexuada ou esquizogônica que se passa nos hospedeiros vertebrados. Durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, o mosquito infectado deposita esporozoítos, vasodilatadores e anticoagulantes sob a pele. Na picada são depositados aproximadamente de 15 a 200 esporozoítos, os quais podem permanecer na área por várias horas até atingirem a corrente sanguínea (Yamamauchi et al. 2006). Recentemente, alguns autores descreveram uma nova rota de migração dos esporozoítos, em que os mesmos, após atravessarem o epitélio do hospedeiro vertebrado, podem também atingir o sistema linfático. Entretanto, os parasitos não parecem atingir o fígado por esta via (Amino et al. 2006). Uma vez dentro do sistema circulatório, os esporozoítos atingem o fígado, onde eles infectam hepatócitos. Na malária de mamíferos, não está claro o mecanismo pelo qual os esporozoítos passam dos capilares sinusóides do fígado até os hepatócitos: se é através das células de Kupffer ou através das células do endotélio dos vasos sanguíneos (Pradel & Frevet 2001, Mota et al. 2002).

O processo de invasão de hepatócitos é complexo e depende de várias interações do tipo ligante-receptor. Recentemente foi demonstrado que os esporozoítos invadem vários hepatócitos, migrando através deles, antes de se desenvolverem dentro de um hepatócito (Revisto por Mota & Rodrigues 2004). Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale* algumas populações de parasitos se desenvolvem rapidamente nos hepatócitos, enquanto outras formas, as responsáveis pelos casos de recaídas, permanecem em estado de latência no fígado, estas são denominadas hipnozoítas (Krotoski 1985). Uma vez dentro dos hepatócitos os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos que, após sofrerem várias divisões por esquizogonia, formam os esquizontes. Os esquizontes maduros liberam os merozoítos teciduais através de um processo de brotamento de vesículas (merosomas), que após atingirem a corrente sanguínea, repletos de parasitas, liberam os merozoítos (Sturm et al. 2006). Os merozoítos teciduais invadem as

hemácias iniciando assim a fase eritrocítica. Para que o merozoíto invada o eritrócito é necessário que haja também o reconhecimento inicial de receptores específicos (Revisto por Barnewell & Galinski 1998). Após varias gerações de merozoítos sanguíneos, alguns se diferenciam dando origem a formas sexuadas, os gametócitos masculinos e femininos, os quais amadurecem sem sofrer divisão celular. Ao serem ingeridos pelo mosquito susceptível, inicia-se a jornada do parasita no hospedeiro invertebrado onde ocorrerá o ciclo sexuado ou esporogônico.

Dentro do estômago do mosquito, os gametócitos masculinos e femininos se diferenciam transformando-se em gametas, os quais sofrem influência das condições do ambiente em que se encontra o hospedeiro invertebrado, bem como fatores internos do mosquito (revisto por Vlachou et al. 2006). Aproximadamente um dia após a fecundação, o zigoto se desloca com movimentos amebóides, passando a se denominar oocineto. O oocineto por sua vez atravessa a matriz peritrófica (membrana que envolve o alimento) e, por um mecanismo trans-celular (Zieler & Dvorak 2000, Vlachou et al. 2004, Baton & Ranford-Cartwright 2004), atinge as células do intestino médio, onde se aloja entre o epitélio e a membrana basal. Então o parasita se encista, e passa a denominar-se oocisto. Inicia-se o processo de multiplicação esporogônica, e em aproximadamente duas semanas, a parede do mesmo se rompe liberando esporozoítos que invadem a hemolinfa do inseto. Assim, muitos parasitas migrarão até atingir as glândulas salivares, completando o ciclo evolutivo dos plasmódios no hospedeiro invertebrado.

1.3. Antimaláricos utilizados para o tratamento da malária

A maior parte das drogas antimaláricas usadas na rotina para o tratamento da doença humana são denominadas esquizotomicidas sanguíneos, pois apresentam ação sobre os estágios assexuados sanguíneos do parasito, que são responsáveis pelas manifestações clínicas da doença. Neste grupo, incluem, por exemplo, a cloroquina, quinina, mefloquina e derivados da artemisinina.

As drogas antimaláricas podem ser classificadas de acordo com seu grupo químico: 4-aminoquinolinas (cloroquina e amodiaquina), aril-aminoálcoois (quinina, mefloquina, halofantrina e lumefantrina), 8-aminoquinolinas (primaquina), peróxido de

lactona sesquiterpênica (derivados da artemisinina), naftoquinonas (atovaquona) e os antibióticos (tetraciclina, doxiciclina e clindamicina). A Cloroquina foi utilizada como antimalárico por mais de 30 anos e teve grande importância, pois além da eficácia e baixo custo, era pouco tóxica para os pacientes. Apesar da resistência atual das cepas do *P. falciparum* a esse composto, a cloroquina ainda é o antimalárico utilizado como de escolha para tratamento de infecções por *P. vivax*. (Levy et al. 1991,WHO 2006). O mecanismo de ação da cloroquina ainda não é totalmente esclarecido, sendo fonte de profundas investigações para os pesquisadores. Tem sido sugerido que as quinolinas atuem dentro do vacúolo digestivo promovendo uma alteração do gradiente de pH entre o meio interno e externo deste. A droga também inibe a cristalização da hemozoína dentro do vacúolo (revisto por Bell 2005, revisto por O'Neill et al. 2006).

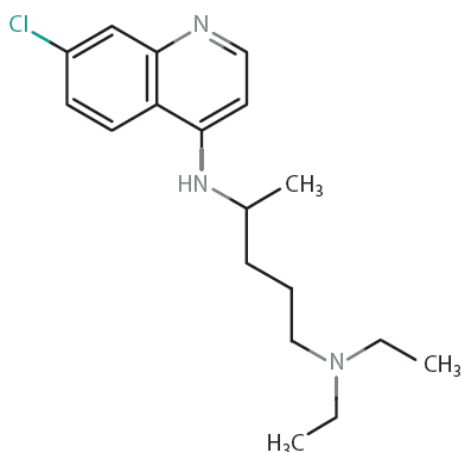


Figura 1. Estrutura molecular da cloroquina.

A quinina, outro composto que pertence ao grupo dos aril-aminoálcoois, é amplamente utilizada, principalmente, no tratamento da malária por *P. falciparum* (Meshnick 1998a). A quinina é um alcalóide que ocorre naturalmente em cascas de árvores denominadas cinchonas, que são nativas da América do Sul. Como a cloroquina, o mecanismo de ação da quinina tem sido amplamente estudado, mas ainda permanece incompleto. Estudos mostram que a quinina, como outros aril-aminoálcoois, agem nos fosfolípides da membrana do vacúolo digestivo. Essa interação com a membrana do vacúolo inibe algumas vias de transporte de íons, como a de cálcio, comprometendo a degradação da hemoglobina (heme) levando à morte do parasito (Fitch 2004).

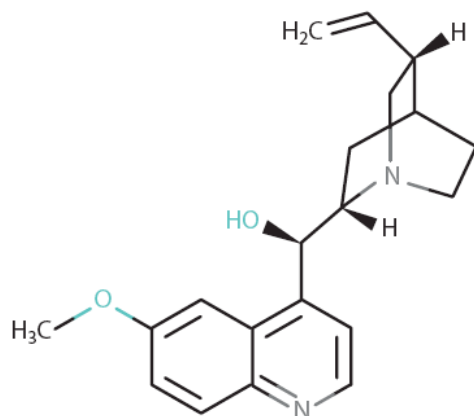


Figura 2. Estrutura molecular da quinina

A mefloquina, outro antimalárico de grande importância no tratamento da doença, é um aril-aminoálcool quimicamente relacionado com a quinina. É um potente esquizotocida sanguíneo, de ação prolongada bastante utilizado no tratamento de pacientes contra o *P. falciparum* (Ministério da Saúde 2001). A descoberta do composto foi em decorrência de uma parceria da Organização mundial de Saúde e a Hoffman-La Roche, que buscavam um novo composto ativo contra a malária (Milhous & Kyle 1998). A mefloquina, como outras quinolinas, tem afinidade pelos fosfolípidos de membrana do vacúolo parasitóforo e, alguns estudos têm sugerido que a droga iniba a endocitose da hemoglobina para dentro do vacúolo, causando a morte do parasito (Hoppe et al. 2004).

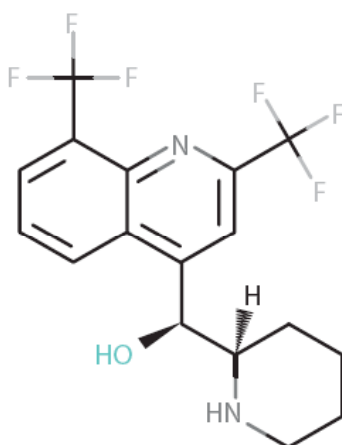


Figura 3. Estrutura molecular da mefloquina.

A lumefantrina é um aril-aminoálcool quimicamente relacionado com a quinina e a mefloquina. É um importante antimalárico para o tratamento da doença, já que a

OMS, em decorrência da resistência às monoterapias convencionais, o inseriu em terapias multimedicamentosas, contendo derivados da artemisinina (ACT – associações terapêuticas à base de artemisinina) (WHO 2006). Desde 2001, 56 países já adotaram como recomendação da OMS o tratamento em associação com a artemisinina (ACTs). O Brasil, como outros países endêmicos de malária, está adotando a associação entre Lumefantrina/artemeter (Coartem®) como alternativa para o tratamento da doença (WHO/RBM 2006).

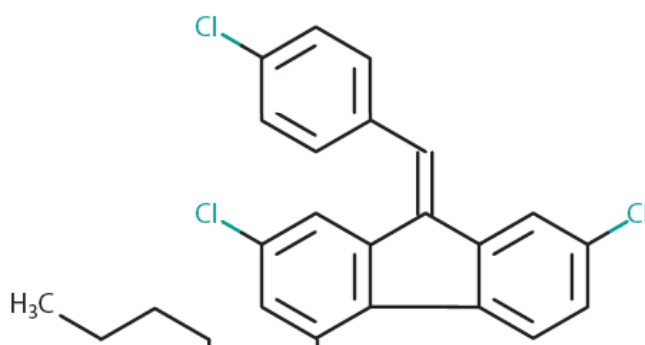


Figura 4. Estrutura molecular da lumefantrina.

A primaquina, uma 8-aminoquinolina, foi desenvolvida durante o período da Segunda Guerra Mundial, pelas forças armadas norte americanas, diante da necessidade de encontrar uma droga que fosse ativa contra os casos de recaída de malária que sofriam os soldados. Apesar de ter sido descoberta neste período a fase clínica de teste da droga foi realizada somente na Guerra da Coreia (Baird & Hoffman 2004). A primaquina é a única droga usada na rotina que age contra as fases latentes de *P. vivax* e *P. ovale*. Além disso, a primaquina é utilizada contra gametócitos de *P. falciparum*.

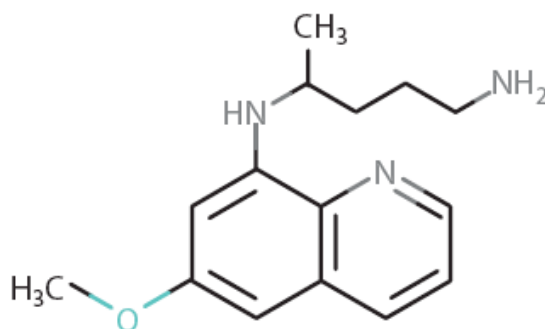


Figura 5. Estrutura molecular da primaquina.

A artemisinina e seus derivados, drogas do grupo dos peróxidos de lactona sesquiterpênica, têm sido utilizadas pela medicina tradicional chinesa, mas só em meados da década de 80 foi que pesquisadores passaram a estudar o potencial fitoterápico da *Artemisia annua* como antimalárico (Meshnick 1998b). O mecanismo de ação da artemisinina parece relacionado a sua capacidade química de gerar radicais livres que são prejudiciais ao parasito. Recentemente, foi sugerido um mecanismo de ação alternativo, o qual se baseia na inibição de cálcio ATPase do parasito (*sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase*, SERCA) (Woodrow et al. 2005).

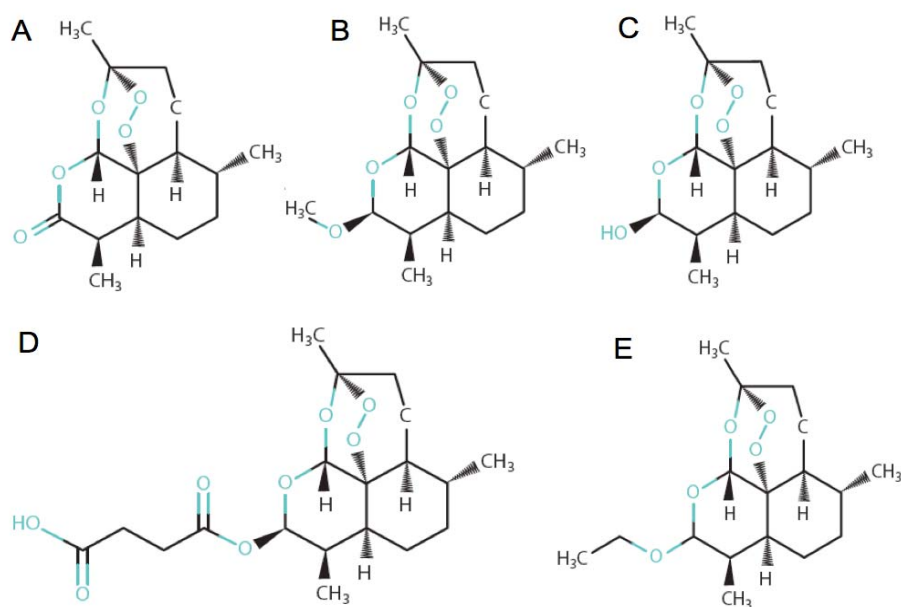


Figura 6. Estrutura molecular da artemisinina e seus derivados. (A) artemisinina, (B) artemeter, (C) dihidroartemisinina, (D) artesunato e (E) artemotil.

1.4. A resistência dos parasitos aos antimaláricos

O conceito de resistência, segundo a OMS, é a capacidade do parasito em sobreviver e/ou multiplicar, apesar da administração apropriada e da absorção do antimalárico nas dosagens recomendadas (WHO 2006). Os primeiros relatos de resistência do plasmódio à cloroquina surgiram no início da década de 60, no Sudeste Asiático e na América do Sul (Moore et al. 1961, Harinasuta et al. 1965). O relato de resistência no continente africano só surgiu em meados da década de 80, onde foram

descritas cepas de *P. falciparum* resistentes principalmente à cloroquina (Ambroise-Thomas & Rossignol 1986).

Os mecanismos pelos quais os parasitos da malária tornam-se resistentes a um determinado antimalárico e/ou a vários antimaláricos (multiresistência) são complexos e variam de acordo com o antimalárico. Geralmente, estes mecanismos podem ocorrer por dois processos: por mutações nos alvos onde atuam as drogas (como é o caso dos antifolatos e da atovaquona), ou por mutações em transportadores envolvidos na distribuição da droga no parasito dentro do eritrócito (genes *pfcr1* e *pfmdr1* para a cloroquina e mefloquina, respectivamente) (revisto por Woodrow & Krishna 2006). Mais especificamente, o gene *pfmdr 1* (*P. falciparum multi-drug resistance 1*) está localizado no cromossomo 5 e codifica uma proteína de 162 kDa, estruturalmente homóloga a glicoproteína P de células tumorais. Esta proteína é denominada Pgh1 (glicoproteína homologa 1) e é expressa na membrana do vacúolo digestivo do parasito, ao longo do seu desenvolvimento intraeritrocítico (Cowman et al. 1991). Estudos demonstraram uma expressiva associação entre mutações nos alelos do gene *pfmdr1* e a alteração da sensibilidade à mefloquina e artemisinina (Duraisingh et al. 2000a; 2000b). Já o gene *pfcr1* (*P. falciparum chloroquine resistance transporter*) está localizado no cromossomo 7 e codifica uma proteína de transporte também é expressa na membrana do vacúolo digestivo do parasito. É uma proteína que está relacionada com o acúmulo de cloroquina e a conversão da hematina solúvel para hemozoína no vacúolo digestivo (Bray et al. 1998). Estudos demonstraram que mutações no gene *Pfcr1* estão associadas a resistência a cloroquina (Vieira et al. 2001).

Diante dessa problemática, a Organização Mundial de Saúde (OMS) passou a adotar como medida de tratamento, em áreas onde potencialmente haja resistência do parasita, o tratamento com novas drogas e a combinação de drogas já existentes, porém o problema de resistência vem se acentuando de forma cada vez mais expressiva (Lopes et al 2002, revisto por Hyde 2005). Recentemente, a OMS criou um banco de dados mundial onde estão sendo armazenados dados sobre o mecanismo de ação das drogas, interação entre drogas, alelos envolvidos na resistência às drogas, entre outros (revisto por Sibley & Ringwald 2006). Tendo em mãos essa quantidade enorme de informações, foram criados os Programas Nacionais de Vigilância, como o Programa IMPACT-Tz (*Interdisciplinary Monitoring Project for Antimalarial Combination Therapy in*

Tanzania), que junto com outras instituições de pesquisas do mundo avaliam a combinação de drogas para o tratamento da doença em áreas de transmissão intensa (revisto por Sibley & Ringwald 2006). Também com o objetivo de estabelecer protocolos adequados de tratamento, a OMS criou redes regionais para a vigilância de tratamento contra a malária. Foram criadas várias redes na África, Ásia e América do Sul.

Com o objetivo de utilizar as drogas e esquemas de tratamentos seguros e eficazes para a redução da morbimortalidade por malária, principalmente considerando que a estratégia atual de controle está baseada no diagnóstico precoce e no tratamento adequado e oportuno dos casos, foi criada, em 2001, a Rede Amazônica de Vigilância da Resistência às Drogas Antimaláricas (RAVREDA). Fazem parte da rede amazônica Bolívia, Brasil, Equador, Colômbia, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela. O projeto é coordenado regionalmente pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e apoiado com recursos da USAID (*United States Agency for International Development*) (Secretaria de Vigilância em Saúde 2005).

Devido ao grave problema de resistência, a busca de novos medicamentos antimaláricos que possam substituir ou melhorar os atuais tem sido uma necessidade médica e uma prioridade da pesquisa em malária (Ridley 2002). Dentro desta linha, grande ênfase tem sido dada à busca novos ensaios que facilitem e acelerem o desenvolvimento de novas substâncias antimaláricas contra as formas sanguíneas do parasito.

1.5. Testes antimaláricos para esquizontídeos sanguíneos

1.5.1. Testes esquizontídeos sanguíneos *in vivo*

Dentre os procedimentos mais utilizados nos ensaios para teste de novos esquizontídeos sanguíneos está o uso de modelos *in vivo* utilizando roedores e símios. Para os modelos murinos são freqüentemente usados o *Plasmodium berghei* e/ou *Plasmodium yoelli*. Já os modelos em símios utilizam principalmente o *P. cynomolgi* e/ou *P. knowlesi*, mas estes animais também podem ser infectados pelos plasmódios humanos, *P. falciparum* e *P. vivax*. Nestes modelos de primatas não humanos já foram

avaliados um grande número de compostos, como a quinina, cloroquina, pirimetamina, bem como suas respectivas avaliações de toxicidade (Gysin 1998). Porém o alto custo e a dificuldade na criação de símios limita o modelo para ensaios de quimioterapia de rotina. Mesmo que o modelo murino possua algumas limitações, há um consenso de que essa etapa seja fundamental nos estudos que avaliam a atividade de novas moléculas e/ou novas estratégias terapêuticas (Landau & Gautret 1998).

Existem dois testes principais utilizando os plasmódios de roedores na avaliação de compostos com atividade esquizonticida sanguínea: o teste de Rane, descrito por Osdene et al. (1967) e o teste supressivo de quatro dias, descrito por Peters (1965). O teste de Rane é um método baseado em um inóculo padrão de *P. berghei* capaz de matar os camundongos num prazo de uma semana. A droga é administrada em dose única e avaliada pela maior sobrevivência dos animais tratados em relação aos controles. Apesar de não ser mais utilizado para a triagem de novas drogas, este método foi amplamente utilizado no programa de busca de novos antimaláricos conduzido pelo Instituto de Pesquisa das Forças Armadas Norte Americanas (WRAI), onde foi possível avaliar uma quantidade enorme de compostos (Kinnamon & Rothe 1975).

O teste supressivo, mais sensível para ser usado na rotina laboratorial, é baseado na redução da parasitemia dos animais tratados, após a administração da droga por quatro dias consecutivos. Entretanto, uma das dificuldades para a triagem de drogas empregando-se a malária murina é que o método de rotina requer a contagem de esfregaços sanguíneos em microscópio ótico, o que é extremamente lento e trabalhoso. Além disso, esse método depende fundamentalmente de uma boa preparação e coloração das lâminas, bem como um microscopista experiente.

1.5.2. Testes esquizonticidas sanguíneos *in vitro*

A metodologia de cultivar a fase eritrocítica do *P. falciparum in vitro* (Trager & Jansen 1976) vem sendo amplamente aplicada nos estudos de malária desde a sua padronização na década de 70. Tal descoberta possibilitou grandes avanços nas áreas de quimioterapia, parasitologia, imunologia e bioquímica dos parasitas (Trager & Jansen 1997). Após o estabelecimento do cultivo contínuo, uma nova técnica denominada “Microteste” (Rieckmann et al. 1978) foi desenvolvida para testes de sensibilidade do

P. falciparum às drogas. A técnica recebeu essa nomenclatura por apresentar o mesmo princípio do teste previamente desenvolvido por Rieckmann et al. (1968), o “Macroteste”, onde o sangue parasitado pelo *P. falciparum* era incubado em solução de glicose contendo diferentes concentrações das drogas. O estabelecimento do cultivo permitiu que o novo ensaio (Microteste) pudesse ser realizado em placas de 96 poços, utilizando meio de cultura apropriado, o qual substituiu a solução glicosada do Macroteste.

Com o objetivo de se automatizar a triagem de drogas antimaláricas, Desjardins et al. (1979) descreveram um método rápido, semi-automatizado, no qual se pode verificar a atividade antimalárica de um grande número de compostos. Atualmente, este é o método mais utilizado nos programas de quimioterapia *in vitro*. O método se baseia na incorporação da hipoxantina radioativa, que é um precursor de ácidos nucleicos. Entretanto, as desvantagens dessa metodologia incluem a capacitação profissional para o manuseio de material radioativo e a geração de resíduos radioativos, cuja eliminação gera custo.

1.6. Métodos alternativos para detecção de parasitas da malária

Métodos alternativos para se quantificar os parasitos da malária têm sido desenvolvidos baseados, principalmente, na coloração de parasitas intra-eritrocíticos com diferentes corantes de ácidos nucleicos, seguidos pela análise por citometria de fluxo (Jacobberger et al. 1983, Van Vianen et al. 1993, Barkan et al. 2000, Saito-Ito et al. 2001, Jimenez-Dias et al. 2005). Esta técnica de análise celular automatizada, baseada em laser, permite a avaliação simultânea de múltiplas propriedades físicas e bioquímicas individuais de células suspensas em meio líquido. Os métodos fluorimétricos podem ser utilizados ainda para quantificar outros microrganismos, como por exemplo a *Salmonella typhimurium* (Winson & Davey 2000). Na malária, entretanto, os métodos fluorimétricos não tem uma aplicação difundida, pois exigem diversas etapas na preparação do sangue, tais como fixação, permeabilização, coloração e hemólise. Além disso, são comuns reações falso-positivas nos ensaios com modelos murinos (Janse & Van Vianen 1994).

Com o objetivo de se quantificar os parasitas da malária, outras metodologias já foram descritas, porém, são métodos que possuem limitações principalmente por apresentar um custo elevado. Entre estes, os métodos colorimétricos, que se baseiam no uso de anticorpos monoclonais para a detecção de enzimas, metabólitos e/ou proteínas do parasita, são os métodos mais bem caracterizados (Makler & Hinrichs 1993; Makler et al. 1993, Noedl et al. 2005). Métodos colorimétricos que não utilizam anticorpos monoclonais também já foram descritos, porém as limitações destas técnicas são principalmente o grande número de etapas na preparação das reações. Um exemplo é o método de inibição da β -hematina que se baseia na quantificação do grupamento heme da hemoglobina (Ncokasi & Egan, 2005). Entretanto, este protocolo só pode ser utilizado para se testar compostos cujo mecanismo de ação esteja relacionado com a degradação da hemoglobina.

1.7. Emprego da Proteína de Fluorescência Verde (GFP) como marcador para identificar e quantificar os parasitas

A proteína GFP foi descoberta em 1961 pelo Dr. Osamu Shimomura (Shimomura 2005) e seu gene foi clonado pela primeira vez por Prasher et al. (1992), de uma água viva de nome científico *Aequorea victoria*. Além de esclarecer a biologia da bioluminescência do organismo, a clonagem do gene da GFP permitiu expandir sua aplicação para inúmeras áreas da pesquisa biológica, já que o mesmo poderia ser usado como um marcador genético para identificar células e organismos vivos. Inicialmente, a proteína GFP foi usada para se observar células vivas por microscopia de fluorescência, o que permitiu monitorar a localização de proteínas de interesse e visualizar eventos celulares (Misteli & Spector 1997). A utilização da GFP tem sido cada vez mais ampla em estudos de biologia celular, biogênese de organelas, divisão celular de vários organismos, como por exemplo, do *Toxoplasma gondii*, parasito do grupo dos apicomplexa (Gubbels & Striepen 2004), e tripanossomatídeos, como as leishmanias (Há et al. 1996).

Durante muito tempo, o único marcador utilizado para selecionar plasmódios transfectados era a resistência à pirimetamina, devido à integração de plasmídeos que conferem resistência a esse antimalárico no genoma do parasita (Wu et al. 1996). Recentemente, a transformação genética com a proteína GFP tem sido obtida para

várias espécies de *Plasmodium* (van Dijk 1996, VanWye 1997, Sultan et al. 1999, Mota et al. 2001, Ono et al. 2006). Até o momento, essa técnica foi utilizada principalmente para o estudo de genes que codificam proteínas de interesse cuja função é desconhecida.

No caso dos plasmódios, os plasmídeos integram exclusivamente no genoma haplóide por recombinação homóloga, facilitando procedimentos que visem atingir genes alvos. Os clones alvos são principalmente os estágios eritrocíticos que podem ser eficientemente selecionados em um período curto de tempo (24 - 48 horas). Além disso, estes estudos têm mostrado que os parasitas transfectados mantêm a capacidade de produzir um ciclo normal, isto é, induzir a formação de gametócitos e completar o ciclo no mosquito (Franke-Fayard et al. 2004). Kadekoppala et al. (2000) produziram em um sistema de transformação estável, o *Plasmodium falciparum*, parasita de malária humana, como uma ferramenta potencial para estudos de expressão gênica, localização e expressão de proteínas além de estudos de dinâmicas de organelas do parasita. Os parasitas da malária murina, *P. berghei* e *P. yoelli*, transfectados com a proteína GFP, também têm sido produzidos em sistema de transformação estável (Sultan et al. 1999, Ono et al. 2006). A grande vantagem dos parasitos transfectados com a GFP é que os estágios sanguíneos podem ser rapidamente detectados pela sua auto-fluorescência sem a necessidade de qualquer coloração prévia ou marcação radioativa.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A resistência do *Plasmodium falciparum* aos antimaláricos é o principal problema no controle da malária humana. Durante as últimas décadas, o aparecimento e a disseminação de parasitos resistentes aos antimaláricos têm motivado os pesquisadores à desenvolverem novos medicamentos, bem como métodos que acelerem o processo para a triagem de novas drogas. O Laboratório de Malária do CPqRR vem a vários anos conduzindo uma linha de pesquisa na área de quimioterapia antimalárica com a participação de diversos grupos de fitoquímicos, botânicos e farmacologistas. O protocolo atualmente utilizado para a triagem inicial de compostos antimalárico é o método *in vitro* de captação de [³H]-hipoxantina (Desjardins et al. 1979). Em uma segunda etapa, os compostos ativos *in vitro* são testados *in vivo* no modelo da malária murina. A metodologia *in vitro* possui limitações devido, principalmente, a geração de resíduos radioativos. Por outro lado, a metodologia *in vivo* depende da contagem de esfregaços sanguíneos pela microscopia óptica. Visando encontrar métodos para a triagem de drogas que sejam diretos, específicos e que tenham baixo custo, esse estudo propõe um novo método em que se utiliza parasitos transformados com a proteína de fluorescência verde (GFP).

OBJETIVO GERAL

Validar o uso de parasitos da malária humana (*P. falciparum*) e da malária murina (*P. berghei*) transfectados com a Proteína de Fluorescência Verde (GFP) em ensaios de quimioterapia experimental.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

(a) Comparar a virulência e susceptibilidade às drogas entre a cepa GFP-*P. berghei* e a cepa *P. berghei* não transformada.

(b) Em camundongos infectados com a cepa GFP-*P. berghei* determinar se a proporção de eritrócitos fluorescentes, detectada pela citometria de fluxo, corresponde a parasitemia determinada em esfregaços sanguíneos.

(c) Validar o método fluorimétrico com a cepa GFP-*P. berghei* em ensaios quimioterápicos.

(d) Em culturas infectadas com a cepa GFP-*P. falciparum* determinar se a proporção de eritrócitos fluorescentes, detectada pela citometria de fluxo, corresponde a parasitemia determinada em esfregaços sanguíneos.

(e) Comparar o método fluorimétrico utilizando a cepa GFP-*P. falciparum* com o método semi-automatizado de incorporação de hipoxantina radioativa, em ensaios quimioterápicos .

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais. Para os experimentos *in vivo* foram utilizados camundongos suíço-albinos ou BALB/c - fêmeas de 18g-20g - procedentes do biotério do Centro de Pesquisas René Rachou. Os animais receberam água e ração própria para roedores *ad libidum*.

3.2. Cepas de *Plasmodium*

3.2.1. *Plasmodium berghei*. A construção da linhagem de *P. berghei* transfectada com uma variante da *Green Fluorescent Protein* (GFP) (GFPmu2) foi obtida após a integração homóloga de um plasmídeo de inserção no gene da TRAP (*thrombospondin-related anonymous protein*), conforme previamente descrito (Sultan et al. 1999). O cassete de expressão que foi inserido no genoma do parasito, denominado pPyrFlu-TRAP, contém uma região que confere resistência a pirimetamina e dirige o sinal de fluorescência via proteína de fusão existente (GFP). A cepa do *P. berghei* não transformada NK-65 (Yoeli 1965) foi utilizada como controle em alguns experimentos. Essas cepas foram gentilmente cedida por Maria M. Mota (Instituto Gulbenkian de Ciências, Portugal), e tem sido mantidas no Laboratório de Malária do CPqRR por passagens semanais de sangue infectado em camundongos suíços/albinos, por via intraperitoneal.

3.2.2. *Plasmodium falciparum*. A construção de uma linhagem de *P. falciparum* transfectada com uma variante da proteína de fluorescência verde (GFP) foi obtida após a integração de um plasmídeo que codifica para uma proteína quimérica da dihidrofolato redutase humana (DHFR) e GFP. A dihidrofolato redutase humana expressa no *P. falciparum* confere resistência ao metotrexato ou WR99210, conforme previamente descrito (Kadekoppala et al. 2000). A cepa transformada foi gentilmente cedida pelo banco de cepas do *Malaria Research and Reference Reagent Resource Center* (MR4), código: MRA-317. A cepa tem sido mantida em cultivo contínuo (item 3.4.1).

3.3. Ensaios *in vivo*.

3.3.1. Infecção. Os camundongos foram infectados com a cepa GFP-*P. berghei* e, em alguns experimentos, com a cepa não transformada. O inóculo para cada cepa foi preparado a partir de sangue de camundongos infectados, de modo que cada animal recebesse 10^6 hemácias parasitadas por via intraperitoneal. Resumidamente, para a preparação do inóculo, o animal selecionado, com parasitemia em torno de 5% a 12%, foi sangrado pelo plexo orbital e o sangue foi recebido em heparina como anticoagulante. Para se determinar o número de hemácias por microlitro de sangue, 10 μ l de sangue foram diluídos 200x em salina tamponada (PBS - 137 mM NaCl; 10 mM Na_2HPO_4 ; 1,76 mM KH_2PO_4 ; 2,7 mM KCl; pH 7,4) e colocados na câmara de Neubauer para a contagem em microscópio óptico (400x). O sangue, em seguida, foi diluído adequadamente em meio de cultura RPMI (RPMI -1640 Sigma, 25 mM de Bicarbonato de Sódio, pH 7,2) para que cada animal recebesse 1×10^6 hemácias parasitadas em um volume de 0,2 ml.

3.3.2. Determinação das parasitemias *in vivo*

3.3.2.1. Por microscopia óptica. A partir do terceiro dia pós-infecção, os esfregaços sangüíneos foram preparados coletando uma gota de sangue da cauda dos animais. Os esfregaços foram secos ao ar e fixados com metanol por 2 minutos, sendo a coloração realizada pelo método tradicional de Giemsa. Resumidamente, duas gotas da solução 0,75% de Giemsa foram diluídas para cada ml de água tamponada (fosfato de potássio 6,8 mM, fosfato de sódio dibásico 0,8 mM, pH 7,2) e colocadas sobre os esfregaços por 10 minutos. Após a coloração, as lâminas foram lavadas em água corrente, secas ao ar e codificadas para a leitura. A percentagem de hemácias parasitadas foi determinada ao microscópio óptico após avaliação de cerca de 1000 células. Cada lâmina codificada foi contada pelo menos duas vezes.

3.3.2.2. Pela técnica de Citometria de fluxo. A partir do terceiro dia pós-infecção, 3 μ l de sangue foram coletados da cauda dos camundongos, com o auxílio de uma pipeta automática, e diluídos em meio de cultura para aproximadamente 1×10^6 hemácias/ml (RPMI-1640 sem vermelho de fenol, Sigma, 25 mM de Bicarbonato de Sódio, pH 7,2). As suspensões sangüíneas foram processadas imediatamente no

citômetro de fluxo (FACScalibur, Becton Dickison), equipado com um *laser* de Argônio, e analisadas com programa CellQuest, para Macintosh, ou Winmdi, para Windows. A análise das hemácias foi feita pela seleção da população de interesse (R1), que apresenta uma distribuição característica em gráficos de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC), onde foram analisadas 5.000-10.000 células dentro do “Gate” R1 para cada amostra (Figura 8). Os resultados foram expressos como porcentagem de hemácias fluorescentes para cada amostra, através do estabelecimento de um limiar de positividade o qual permitiu a separação dos agrupamentos de hemácias positivas e negativas em função da intensidade de fluorescência. Para cada ensaio foram incluídos controles negativo (hemácias não parasitadas) e positivo. Com o objetivo de se determinar reprodutibilidade do ensaio, cada amostra foi analisada em duplicata ou triplicata.

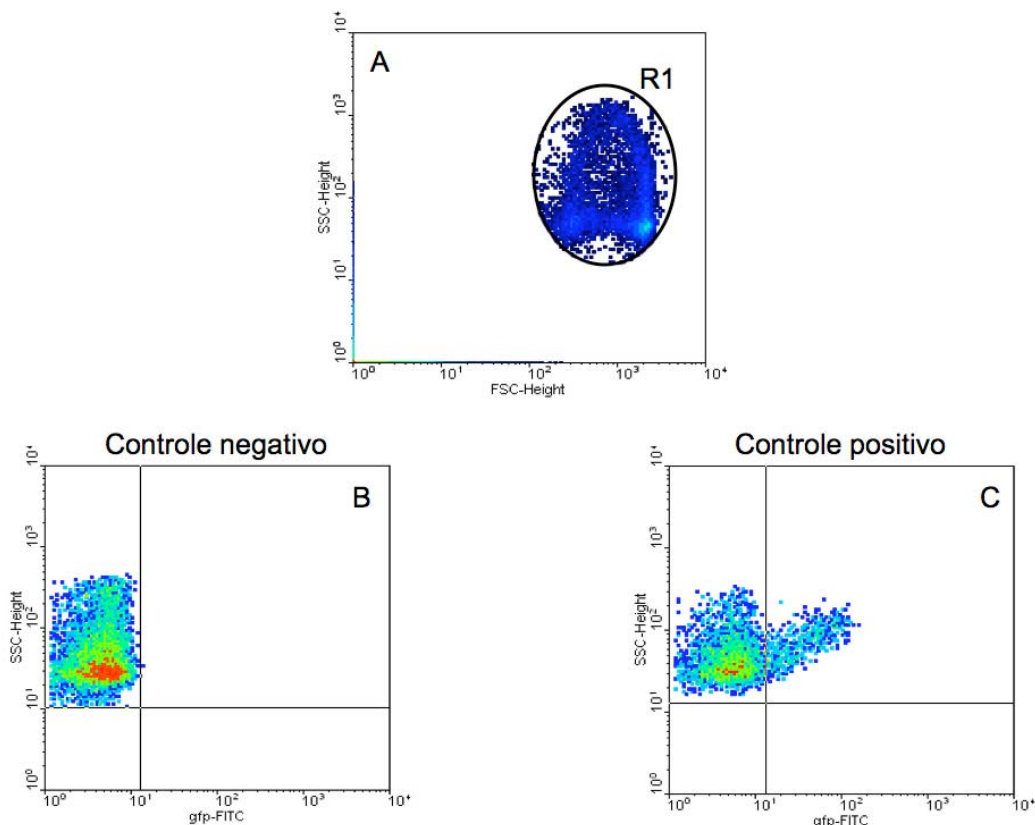


Figura 7. Representação esquemática das análises dos dados obtidos por citometria de fluxo. Em A, a seleção da população de hemácias, onde foram utilizados parâmetros de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC). Em B, uma amostra de sangue não infectada e em C uma amostra de sangue infectado por GFP-*P. berghei*, sendo os gráficos de fluorescência verde (FL1) em função da granulosidade (SSC).

3.3.3. Tratamento antimalárico. Para os experimentos os animais foram divididos em diferentes grupos (3-5 animais por grupo): *controle não tratado*, que receberam apenas água destilada, e *grupos testes*, que foram tratados com doses variadas dos antimaláricos. A pirimetamina foi utilizada nos experimentos que avaliaram a resistência da cepa GFP-*P. berghei* a este antimalárico. Para os demais experimentos foram utilizados como antimaláricos de referência a cloroquina, quinina, e o artesunato de sódio. A figura 7 ilustra o esquema geral de tratamento para os experimentos de quimioterapia. As doses escolhidas para o tratamento foram aquelas já utilizadas em outros trabalhos da literatura e já estabelecidas em testes de quimioterapia do laboratório. Todos os compostos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Cor Jesus F. Fontes (Universidade Federal do Mato Grosso, MT, Brasil), sendo preparados conforme descrito abaixo:

Pirimetamina: Cada grupo de animais recebeu a pirimetamina base nas doses de 25mg/kg/dia, 5 mg/kg/dia e 1 mg/Kg/dia (Uma dose por dia durante cinco dias consecutivos). O comprimido de pirimetamina foi macerado e diluído em água destilada usando-se Tween 80 na concentração final máxima de 0,1% (já que sua completa solubilização não foi possível). Logo depois, as suspensões da droga permaneceram cerca de 10 minutos no ultra-som (Ultrasonic cleaner 1400, Unique). As doses diárias foram administradas nas suas respectivas concentrações, em um volume de 0,2 ml.

Difosfato de Cloroquina: Os grupos de animais receberam a cloroquina base nas doses de 6 mg/kg/dia e 18 mg/kg/dia (Uma dose por dia durante cinco dias consecutivos). O comprimido de difosfato de cloroquina foi macerado e diluído em água destilada usando-se Tween 80. Logo depois, as suspensões da droga permaneceram cerca de 10 minutos no ultra-som (Ultrasonic cleaner 1400, Unique). As doses diárias foram administradas nas suas respectivas concentrações, em um volume de 0,2 ml.

Sulfato de Quinina: Cada grupo de animais recebeu o a quinina base nas doses de 60mg/kg/dia e 120 mg/kg/dia (Uma dose por dia durante cinco dias consecutivos). O comprimido de sulfato de quinina foi macerado e diluído em água destilada usando-se Tween 80. Logo depois, as suspensões da droga permaneceram cerca de 10 minutos no ultra-som (Ultrasonic cleaner 1400, Unique). As doses diárias foram administradas nas suas respectivas concentrações, em um volume de 0,2 ml.

Artesunato de Sódio: Os grupos de animais receberam o sal de artesunato de sódio nas doses de 120mg/kg/dia e 240 mg/kg/dia (Uma dose por dia durante cinco dias consecutivos). A droga foi diluída em bicarbonato de sódio a 5%. As doses diárias foram administradas, por via oral, nas suas respectivas concentrações, em um volume de 0,2 ml.

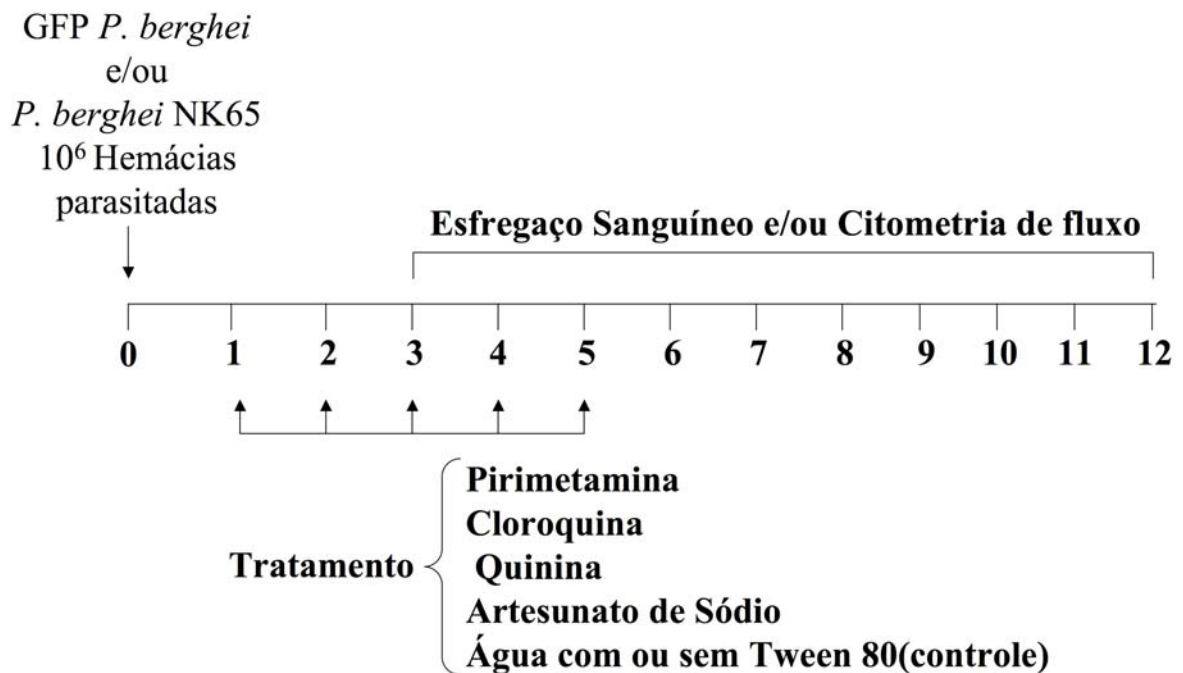


Figura 8 - Esquema geral dos experimentos de quimioterapia *in vivo*.

3.3.4. Avaliação da virulência das cepas de *P. berghei*. Para se avaliar a virulência da cepa GFP-*P. berghei*, camundongos da linhagem Balb/c foram inoculados com a cepa GFP-*P. berghei* ou com a cepa não transformada, NK65. A evolução da infecção dos animais inoculados com a cepa transformada e não transformada foi determinada pela confecção de esfregaços sanguíneos do dia 3 até o dia 12, após a infecção, conforme descrito no item 3.3.2.1. A mortalidade foi acompanhada diariamente até a morte de todos os animais do grupo controle, sendo os resultados expressos como mortalidade cumulativa.

3.4. Ensaios *in vitro*

3.4.1. Cultivo *in vitro* de *Plasmodium falciparum*. A cepa de *P. falciparum* transfectada com a GFP foi mantida em cultivo contínuo em hemácias humanas de grupos sanguíneos O⁺ ou A⁺, incubada a 37° C em atmosfera de aproximadamente 5% de CO₂ e baixa oxigenação, conseguida através da queima de vela em dessecador (Jansen & Trager 1977). O meio de cultivo utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 25 mM de bicarbonato de sódio, 25 mM de hepes, 2 mM de L – glutamina, 40 mg de gentamicina, 0,36 mM de hipoxantina, 10 mM de glicose, 10% de plasma humano dos grupos sanguíneos A ou AB, pH 7,2 – 7,4 (meio de cultura completo). As culturas foram mantidas em placas de Petri de 100x15 mm (8 ml), em um hematócrito final de 5-10%. A manutenção das culturas foi feita trocando-se o meio a cada 24 horas com o acompanhamento diário da parasitemia por esfregaços sangüíneos. Uma vez detectada parasitemias elevadas (>10%), as culturas eram diluídas com hemácias não infectadas. Para manter esta cepa no banco de cepas do Laboratório, os parasitos foram criopreservados, segundo a técnica descrita por Meryman & Hornblower (1972), que consiste em congelar o parasita em solução com alta concentração de glicerol (Glycerolyte® 57- BAXTER: 6,2 M de glicerol, 142,7 mM de acetato de sódio, 4 mM de cloreto de potássio, 3,7 mM de fosfato de sódio monobásico, 8,7 mM de fosfato de sódio dibásico, pH 6,8).

3.4.2. Sincronização da cultura. Para se obter um predomínio de formas jovens na cultura (anel) foi utilizado o protocolo de sincronização utilizando D-sorbitol (Sigma) (Lambros & Vanderberg 1979). Inicialmente, foram confeccionados esfregaços sanguíneos das placas de cultura para se determinar o estágio de amadurecimento dos parasitos. A cultura selecionada (contendo \geq 1% de formas jovens) foi centrifugada (400 g/10 min/T.A.), sendo o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspensionado em solução de D-sorbitol a 5% por 10 minutos. Passado esse tempo, a suspensão de hemácias com o D-sorbitol foi centrifugada (400 g/10 min/T.A.), o sobrenadante desprezado e as hemácias ressuspensionadas com o meio de cultura completo. As hemácias em meio completo foram novamente plaqueadas contendo agora, apenas formas jovens (anéis).

3.4.3. Microteste utilizando citometria de fluxo. Para avaliar a capacidade da cepa GFP-*P. falciparum* em ensaios esquizotocidas *in vitro*, as culturas sincronizadas foram diluídas com sangue não infectado para que a parasitemia e o hematócrito fossem acertados para 1 e 2%, respectivamente. Para os testes foram utilizadas placas de 96 poços de poliestireno, onde 175 µl da suspensão de eritrócitos infectados foram distribuídos por poço. A solução estoque de cada antimalárico foi preparada na concentração de 20 mM, sendo o artesunato de sódio diluído em água; cloroquina, quinina e mefloquina em Dimetil Sulfoxido – DMSO (0,02 - 0,05% concentração final). Nesta concentração o DMSO não interfere no crescimento do parasito *in vitro*, conforme já verificado em outros testes quimioterápicos no laboratório. Para cada experimento *in vitro*, as soluções estoque foram sucessivamente diluídas em meio completo para as concentrações recomendadas pela OMS (WHO 2001), e distribuídas em triplicatas nos poços das placas (25 µl/poço). As placas foram incubadas a 37° C e, após 24 e 48 horas de incubação, o meio de cultura com ou sem as drogas foi individualmente substituído (figura 9). Após 72 horas de incubação, 3µl de sangue foram coletados do fundo dos poços das microplacas, com o auxílio de uma pipeta automática, e diluídos em meio de cultura para aproximadamente 1×10^6 hemácias/ml (RPMI-1640 sem vermelho de fenol, Sigma, 25 mM de bicarbonato de sódio, pH 7,2). As suspensões sangüíneas foram processadas imediatamente no citômetro de fluxo (conforme item 3.3.2.2). Os resultados foram expressos como percentagem de hemácias fluorescentes. Para cada método, a concentração da droga que inibe 50% do crescimento do parasito (IC₅₀) foi calculada, determinada através de curvas de dose-resposta, as quais foram obtidas através do programa Origin® (Microcal Software Inc.).

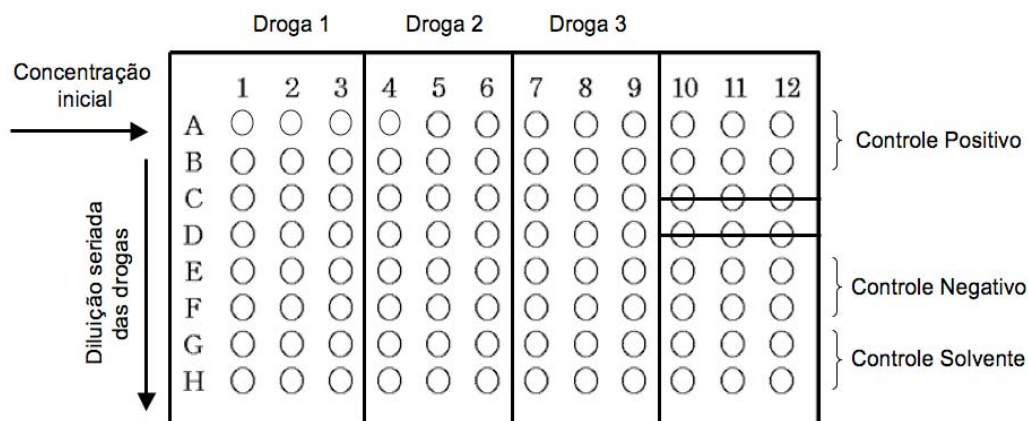


Figura 9. Esquema geral dos experimentos de quimioterapia *in vitro*. Os testes *in vitro* foram realizados em triplicata, com diluições seriadas dos antimaláricos. Para cada teste foram utilizados seis poços de controle positivo (hemácias parasitadas sem adição de droga), seis poços de controle negativo (hemácias não parasitadas e sem adição de drogas) e seis poços de controle do solvente (hemácias não parasitadas na presença do solvente).

3.4.4. Microteste usando radiomarcção. As placas de quimioterapia foram preparadas conforme descrito no item anterior (3.4.3). Após 24 horas de incubação dos parasitos com as drogas (37° C, a 5% de CO₂) foram adicionados 20 µl de [³H]-hipoxantina por poço (0,5 µCi/poço), sendo as placas incubadas por mais 18 horas (Desjardins et al. 1979). Após esse segundo período de incubação, as placas foram colocadas a -20° C por 6-18 horas para promover a lise das hemácias. As amostras foram então aspiradas em um coletor de células Harvester® 96 Mach III M (Tomtec, Hamden, CT) e depositadas em papel filtro, os quais foram colocados em sacos plásticos apropriados (Perkin Elmer, Wellesley, MA), sendo acrescidos de 4-5 ml de líquido de cintilação (OptPhase “SuperMix”). Depois de selados os filtros foram processados em um contador de radiação β, MicroBeta Reader® (Wallac-Perkin Elmer, Wellesley, MA) para a contagem da incorporação da [³H]-hipoxantina. A análise da sobrevivência dos parasitas foi realizada com auxílio do programa NFIT (MicroCal Software®, Inc), sendo as curvas de IC₅₀ de cada droga calculada no programa gráfico ORIGIN 5.0®. Os resultados de sobrevivência dos parasitas foram comparados com o microteste no citômetro para validação da cepa transformada em ensaios de quimioterapia.

3.5. Análise de dados. Os dados obtidos foram tabulados e analisados estatisticamente pelo programa BioEstat versão 4.0 (Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas/Manuel Ayres, Manuel Ayres Júnior, Daniel Lima Ayres, Alex de Assis Santos dos Santos – Manaus: Sociedade Civil de Mamirauá/CNPq, 2005). As diferenças entre duas médias foram testadas utilizando o teste *t* de Student's. No experimento *in vivo* de sensibilidade a pirimetamina as diferenças entre mais de duas médias foram testadas utilizando análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey . Aceitou-se para todos os testes o nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados *in vivo*

A primeira etapa do trabalho utilizando a cepa de *P. berghei* transfectada com a GFP como ferramenta para ensaios de quimioterapia *in vivo* foi publicada em revista internacional (Sanchez et al. *Int J Parasitol* 34: 485, 2004, Anexo 1).

4.1.1. Sensibilidade da cepa transfectada à pirimetamina

A pirimetamina foi o marcador utilizado para a seleção dos clones transformados com a GFP durante o processo de transfecção do parasito. Diante disso, foi importante confirmar se a transformação obtida do parasito foi realmente estável, já que a cepa seria mantida no Laboratório de Malária (CPqRR) durante um longo período de tempo sem pressão da droga. Com isso, comparou-se a susceptibilidade à pirimetamina entre a cepa NK-65 *P. berghei* (pirimetamina sensível) e a cepa GFP-*P. berghei* (pirimetamina resistente). Conforme mostrado na figura 10A, nos animais infectados com a cepa selvagem (NK-65) e tratados com diferentes concentrações da pirimetamina, observou-se uma redução significativa da parasitemia, independente da concentração da droga administrada, quando comparados aos animais do grupo controle (não tratados). Em contra partida, nos animais infectados com a cepa transfectada (GFP-*P. berghei*), tratados com as mesmas concentrações da droga, os animais não apresentaram nenhuma redução da parasitemia quando comparado aos animais do grupo controle (Fig. 10B). Sendo assim, confirmou-se que houve uma integração estável do plasmídeo, contendo a GFP, no genoma do parasita.

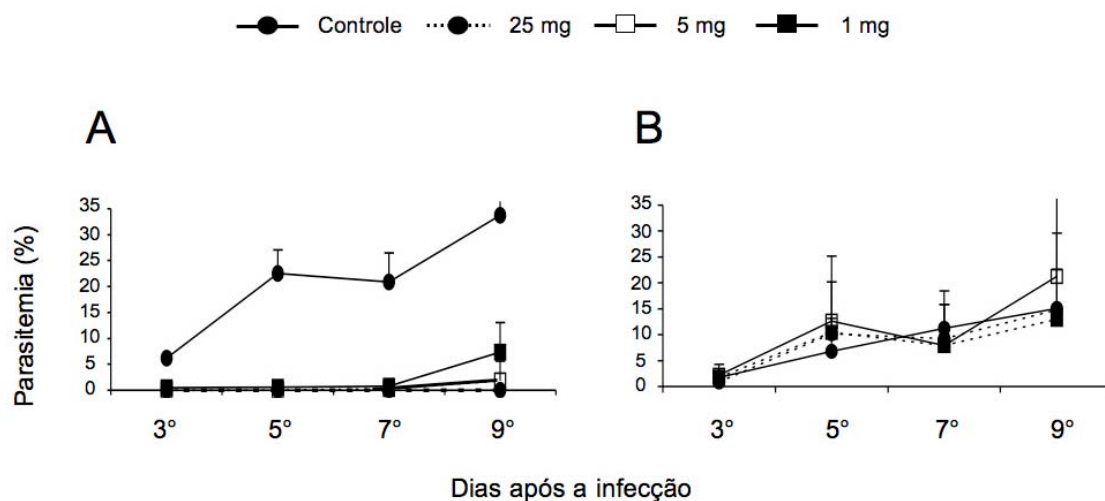


Fig. 10. Avaliação da resistência da cepa GFP-*P. berghei* à pirimetamina. Camundongos foram inoculados com 10^6 eritrócitos infectados com a cepa de *P. berghei* não transformada (NK-65) (A) e GFP-*P. berghei* (B). A droga foi administrada via oral nas concentrações de 25 mg/Kg/dia (●), 5 mg/Kg/dia (□), 1 mg/Kg/dia (■), durante 5 dias consecutivos. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (5 animais/grupo).

4.1.2. Virulência da cepa GFP-*P. berghei*

Para avaliar se o processo de transfecção alterou a virulência da cepa GFP-*P. berghei*, comparou-se *in vivo* a evolução da infecção dessa cepa com a da cepa NK-65 não transformada. Para tal, afim de se determinar a parasitemia dos animais infectados, foi realizado diariamente a confecção de esfregaços sanguíneos bem como o acompanhamento da mortalidade dos animais. Como mostrado na Fig. 11, a evolução da infecção se mostrou similar entre os grupos infectados com GFP-*P. berghei* e NK-65 *P. berghei*. Os resultados permitiram concluir ainda que a mortalidade foi similar entre os grupos de camundongos infectados com parasitos transformados e não transformados.

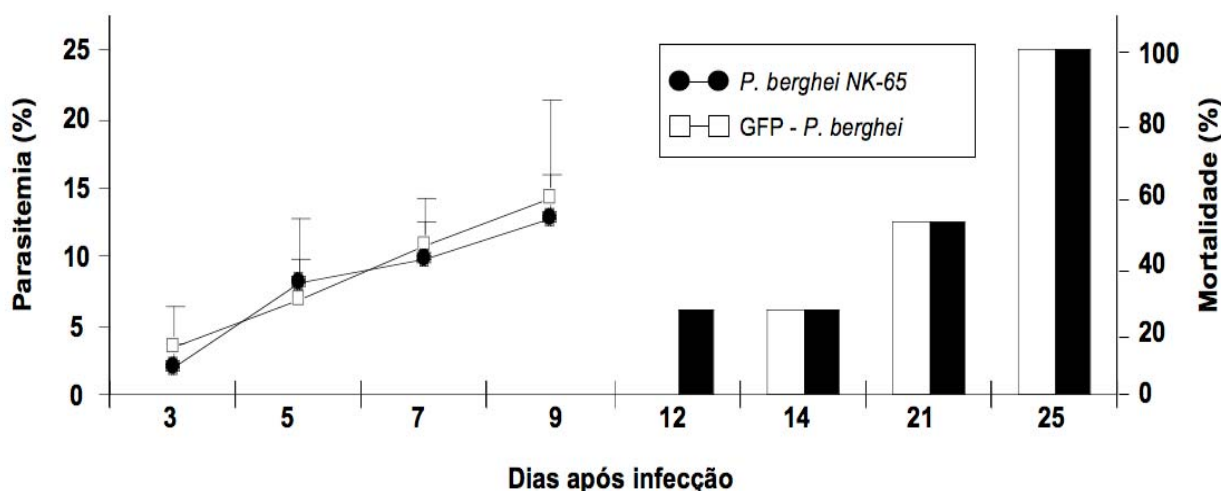


Fig. 11. Evolução da infecção nos grupos de animais inoculados com as cepas de *P. berghei* transfectada e não transfectada. Camundongos foram inoculados com 10^6 eritrócitos infectados com GFP-*P. berghei* (□) ou *P. berghei* não transformada (NK-65) (●), sendo a parasitemia determinada pela contagem de esfregaços sanguíneos ao microscópio óptico. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (5 animais/grupo). A mortalidade foi acompanhada diariamente e a mortalidade cumulativa do grupo calculada.

4.1.3. Susceptibilidade da cepa GFP-*P. berghei* aos principais antimaláricos

Visando demonstrar que a transfecção da cepa não alterou sua susceptibilidade aos antimaláricos não relacionados à pirimetamina, avaliou a susceptibilidade da cepa GFP-*P. berghei* a algumas drogas usadas na rotina para o tratamento da doença. A Fig. 12 ilustra curvas de crescimento de parasitemia em animais infectados com a cepa transformada ou não-transformada e, tratados com cloroquina, quinina e artesunato de sódio. Como observado, a parasitemia determinada em esfregaços sanguíneos corados pelo Giemsa foi similar entre os grupos de animais infectados com a cepa transformada e a cepa selvagem (NK-65), independente da concentração da droga administrada. Esses resultados observados confirmam o potencial desse modelo em triagens de drogas antimaláricas.

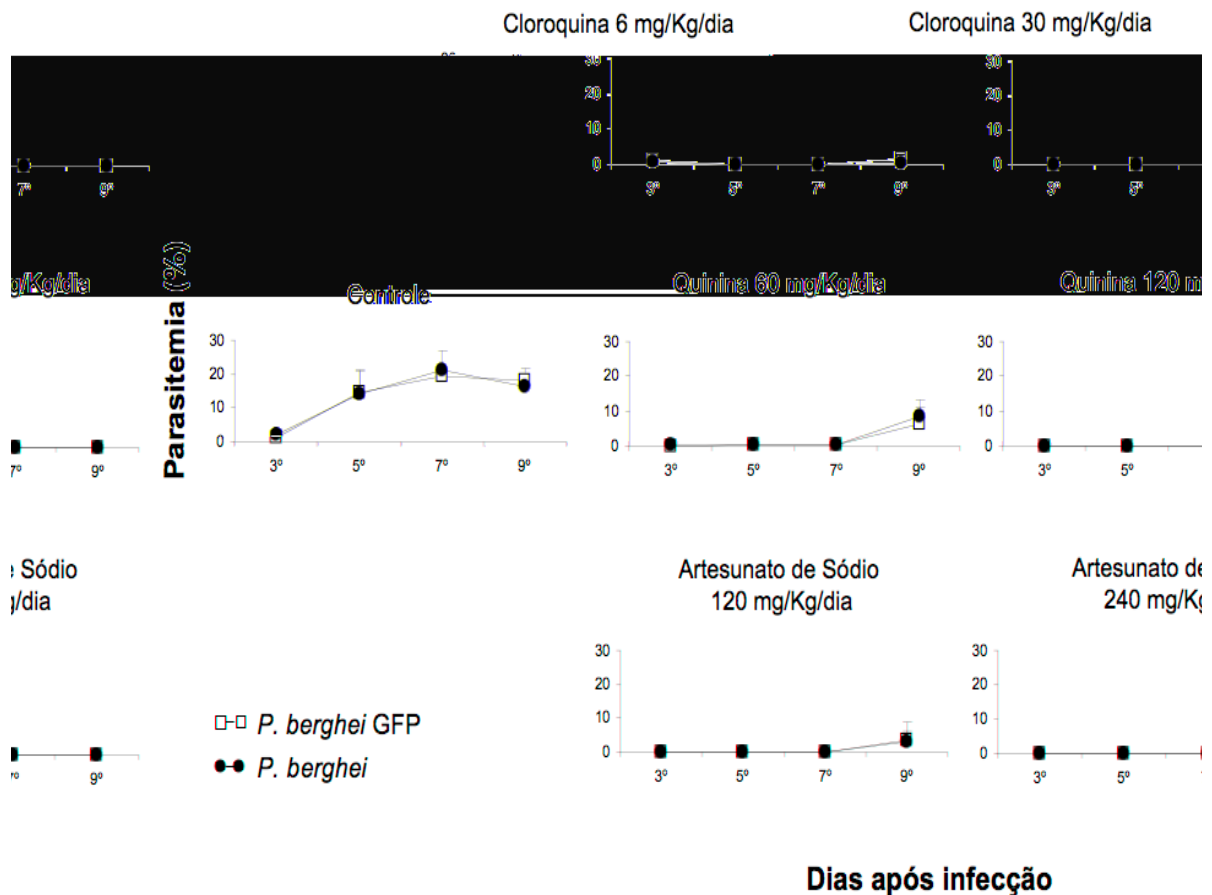


Fig. 12. Avaliação da susceptibilidade à administração de antimaláricos por 5 dias consecutivos entre grupos infectados com as cepas GFP-*P. berghei* e *P. berghei* não transformada. Camundongos foram inoculados com 10^6 eritrócitos infectados da cepa GFP-*P. berghei* (□) ou *P. berghei* não transformada (●), e foram tratados por 5 dias consecutivos com cloroquina, quinina e artesunato de sódio. Esfregaços sanguíneos corados pelo Giemsa foram analisados e os resultados foram expressos por média \pm desvio padrão (n=5).

4.1.4. Avaliação da cepa GFP-*P. berghei* na citometria de fluxo.

Com o objetivo de determinar um limite de positividade da intensidade de fluorescência, foram analisados pela citometria de fluxo 30 amostras de sangue de camundongos não infectados. O limite de positividade foi 0,58%, estabelecido pela média acrescida de dois desvios padrões (Fig. 13A). Para determinar se o acúmulo de fluorescência verde refletia o crescimento do parasito, camundongos infectados com a cepa GFP-*P. berghei* foram também acompanhados diariamente pela citometria de

fluxo, através do exame de uma gota de sangue retirada da cauda. Os resultados mostraram que era possível detectar um aumento progressivo do número de hemácias fluorescentes em função do tempo de infecção. A Figura 13B ilustra o comportamento de um animal típico, onde se observa um aumento gradual de hemácias fluorescentes do dia 3 ao dia 12 pós infecção, com parasitemias tão altas quanto 30%. Esse perfil típico foi observado em diferentes animais inoculados. Como controle, parasitas não transformados provenientes de camundongos infectados com a cepa NK-65 foram também monitorados pela citometria de fluxo. Como mostrado na Figura 13C, independente da parasitemia dos animais, avaliada pelo esfregaço sanguíneo (0,3 - 26%), o *background* de fluorescência foi sempre igual ao do sangue normal.

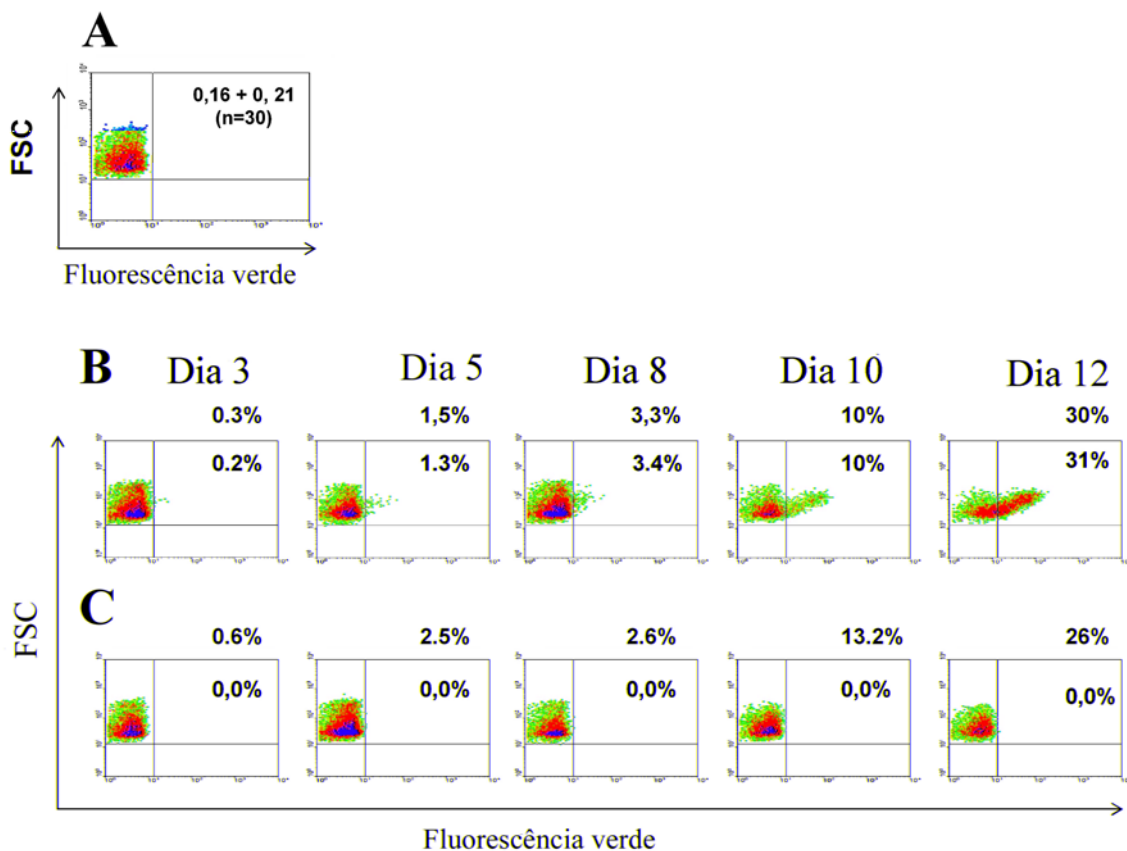


Fig.13 – Avaliação pela citometria de fluxo de amostras de sangue de camundongos não infectados (A), infectados com a cepa GFP-*P.berghei* (B) e infectados com a cepa não transformada (C). Em A, a leitura de 30 amostras de sangue não infectados, onde os resultados são expressos no quadrante superior direito pela média ± desvio padrão. Em B e C, os números nos topos dos gráficos representam a percentagem de parasitemia determinada em esfregaços sanguíneos e os números dentro do quadrante superior direito representam a percentagem da parasitemia determinada pela citometria de fluxo.

4.1.5. Avaliação da cepa GFP-*P. berghei* em ensaios quimioterápicos.

Os resultados anteriores (Figura 13) demonstraram que o emprego da cepa GFP-*P. berghei* na citometria de fluxo era específico, portanto, a próxima etapa foi validar o método para os ensaios quimioterápicos. Grupos de camundongos inoculados com GFP-*P. berghei* foram tratados com diferentes doses de cloroquina (6 e 18 mg/kg/dia, 5x) e quinina (60 e 120 mg/kg/dia, 5x), sendo a parasitemia dos animais monitorada diariamente por esfregaços sangüíneos e pela citometria de fluxo. Optou-se por usar doses sub-terapêuticas da cloroquina e quinina, já que as doses terapêuticas eliminariam todos os parasitas e, portanto, não permitiria comparar o método tradicional com a citometria de fluxo. Um grupo controle (não tratado) foi incluído em cada experimento.

Como mostrado na figura 14A, nos camundongos tratados com 18 mg/kg/dia de cloroquina, como era de se esperar, a parasitemia se manteve não detectável ou inferior a 5% até o dia 12 pós-infecção. Esse mesmo perfil foi obtido seja pela contagem ao microscópio óptico ou pela citometria de fluxo. Com uma dose menor de cloroquina (6mg/kg/dia) pode se observar o pico de parasitemia, detectado por ambas as técnicas, em torno do dia 9 pós-infecção. Nos animais tratados com a dose mais alta de quinina (120mg/kg/dia) foi possível observar um aumento discreto da parasitemia, determinada por ambas as técnicas, somente no dia 11 pós-infecção. Já na dose mais baixa da droga (60mg/kg/dia) foi possível observar o aumento da parasitemia a partir do dia 7 - 9 pós-infecção, como observado com a cloroquina. Como foi demonstrado anteriormente, as curvas de parasitemia coincidiram entre as duas técnicas, não existindo diferença entre as curvas avaliadas pelo esfregaço ou citometria de fluxo. Em conjunto, os resultados permitiram concluir que o método empregando a cepa GFP-*P. berghei* pode substituir o ensaio tradicional realizado pela microscopia óptica.

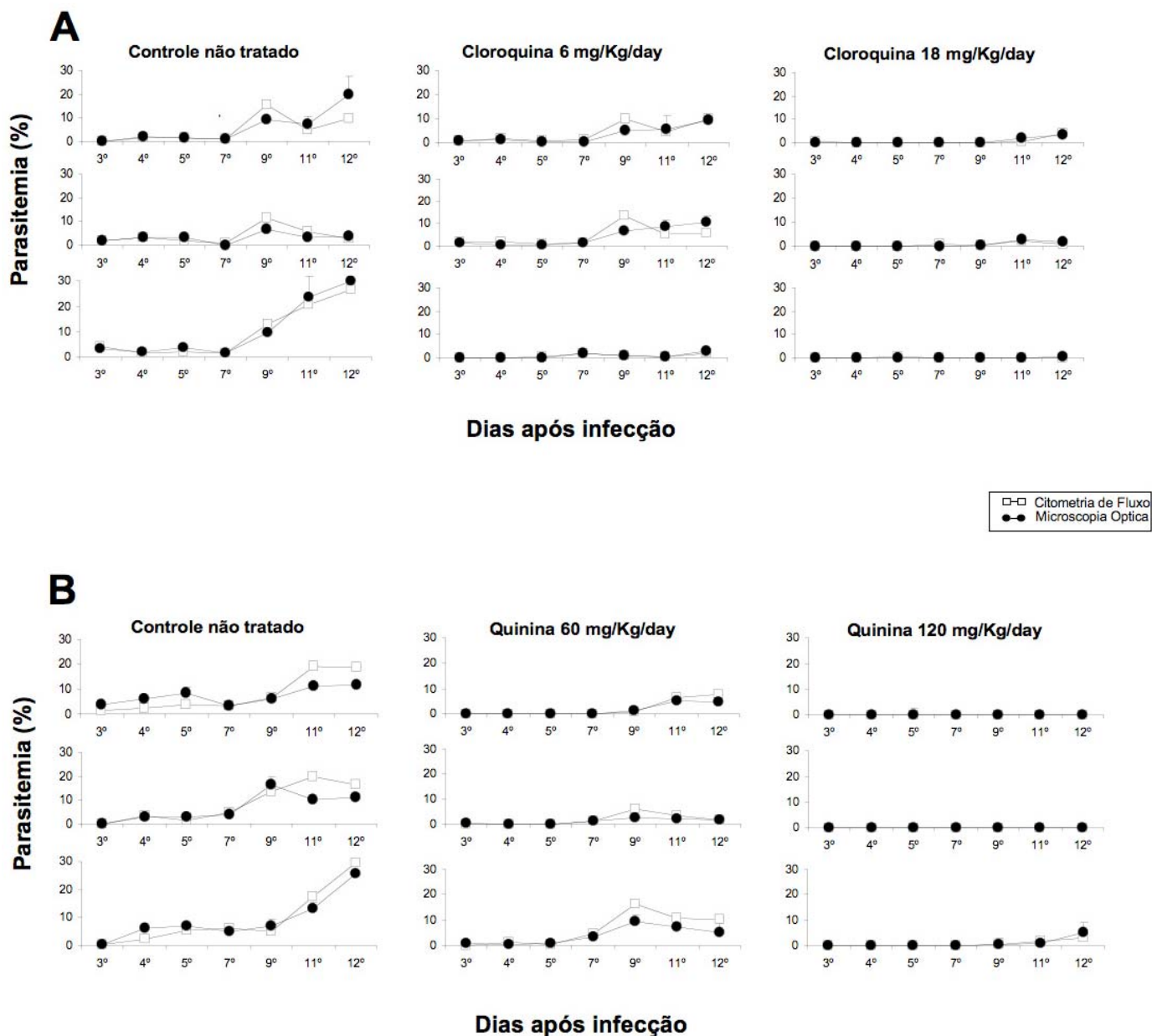


Fig. 14. Comparação da porcentagem da parasitemia determinada por microscopia óptica e citometria de fluxo em camundongos infectados com a cepa GFP-*P. berghei*, tratados com doses variadas dos antimaláricos. Camundongos foram inoculados com 10^6 eritrócitos infectados e tratados por cinco dias consecutivos com cloroquina (A) ou quinina (B), iniciado 24 horas após a infecção. Cada gráfico representa o resultado de um animal individual, e três camundongos foram ilustrados por grupo.

4.2. Ensaios *in vitro*

A segunda etapa do trabalho utilizando a cepa de *P. falciparum* transfectada com a GFP como ferramenta para ensaios de quimioterapia *in vitro* foi submetida a publicação em revista internacional (Sanchez et al., submetido, Anexo 2).

4.2.1. Avaliação da especificidade da cepa GFP-*P. falciparum* na citometria de fluxo

Como foi possível quantificar os parasitos da malária murina pela técnica de citometria de fluxo, buscou-se agora quantificar os parasitos da malária humana transfectados com a proteína de fusão GFP. Com o objetivo de avaliar a potencialidade da citometria de fluxo em discriminar eritrócitos parasitados dos não parasitados, foram analisadas 20 amostras de cultura não infectadas por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que a técnica foi específica, sendo o valor de 0,36% considerado o limite de positividade (média acrescida de dois desvio padrão) (Figura 15A). A figura 15B ilustra o crescimento dos parasitos de uma cultura representativa, onde foi demonstrada a correlação entre os valores das parasitemias determinadas por microscopia óptica e pela citometria de fluxo. A figura 15C ilustra o resultado de diferentes experimentos que tiveram início com culturas previamente sincronizadas e com parasitemias iniciais diferentes, de 1% e 1,5%, respectivamente. Estes valores de parasitemia foram escolhidos já que são aqueles utilizados na rotina para experimentos de triagem de drogas. Como o experimento anterior, as parasitemias das diferentes culturas foram acompanhadas por microscopia e por citometria de fluxo por um período de 72 horas. A figura mostra uma correlação entre os valores das parasitemias determinadas pela citometria de fluxo e pela microscopia óptica.

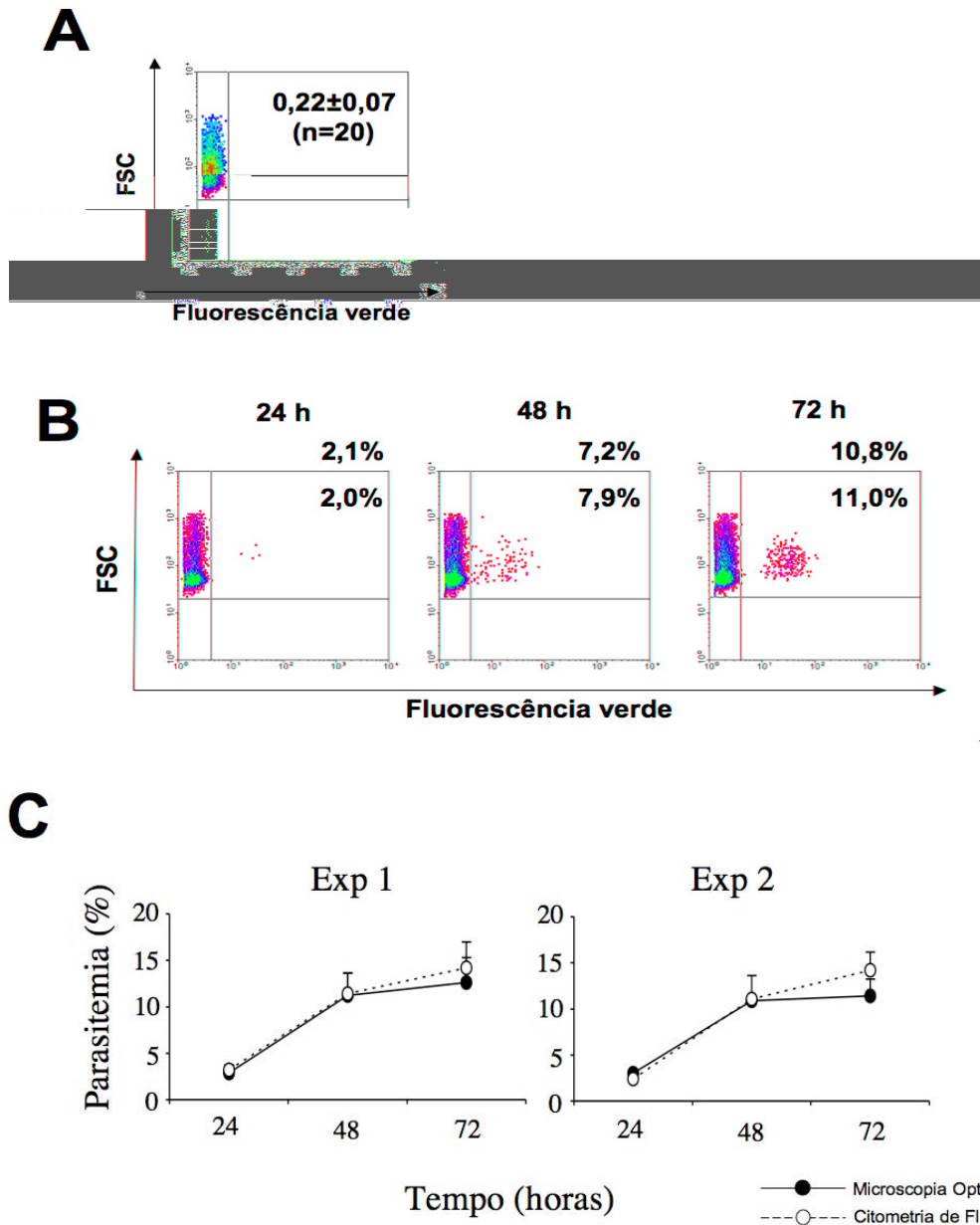


Fig. 15. Avaliação do crescimento *in vitro* de parasitos da malária humana transfectados com a GFP. Em A, a leitura de 20 amostras de hemácias não infectadas, onde os resultados são expressos no quadrante superior direito pela média \pm desvio padrão. Em B, cultura de GFP-*P. falciparum* acompanhada por microscopia óptica (valores acima do gráfico) e citometria de fluxo (quadrante superior direito do gráfico) por 72 horas. Em C, culturas com parasitemias iniciais diferentes (Experimento 1 = 1% e Experimento 2 = 1,5%) acompanhadas por microscopia óptica (●) e por citometria de fluxo (○) por 72 horas. Os valores para cada gráfico são representados pela média das parasitemias \pm desvio padrão.

4.2.2 Ensaios quimioterápicos *in vitro*

Após demonstrar que a quantificação de parasitos da malária humana pela citometria de fluxo era específica, buscou-se validar a utilização da cepa GFP-*P. falciparum* em ensaios quimioterápicos *in vitro*. Para validar esse modelo, o protocolo utilizando a cepa GFP-*P. falciparum* na citometria de fluxo foi comparado com o método de microteste usando radiomarcção ($[^3\text{H}]$ -hipoxantina), protocolo padrão para testes de novas drogas *in vitro*. Tal análise se deu através de curvas de dose resposta para alguns antimaláricos utilizados para o tratamento da doença. A figura 16 mostra os valores de IC_{50} de cada droga, calculada em função da curva dose resposta obtida através do programa Origin (Microcal Software Inc.). Os resultados demonstram que os ensaios quimioterápicos utilizando a cepa de *P. falciparum* GFP na citometria de fluxo foram similares aos ensaios utilizando a técnica de radiomarcção, não havendo diferença significativa entre os valores de IC_{50} de cada droga testada ($P > 0,05$).

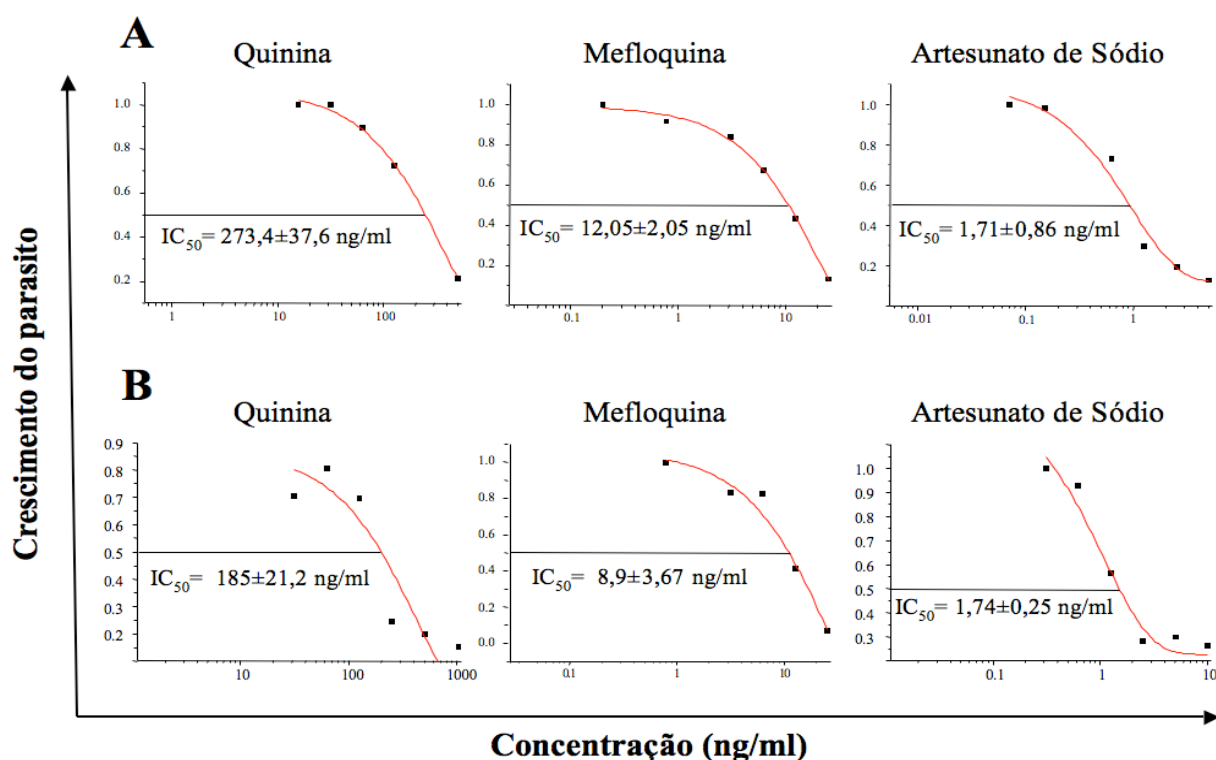


Fig. 16. Curvas de dose-resposta da cepa GFP-*P. falciparum* à quinina, mefloquina e artesunato de sódio. Em A, valores de curvas dose-resposta determinadas por citometria de fluxo. Em B, valores de curvas dose-resposta determinadas pela incorporação de $[^3\text{H}]$ -hipoxantina. A concentração da droga que inibe 50% do crescimento do parasito (IC_{50}) foi calculado pelas medias \pm desvio padrão de dois experimentos.

5. DISCUSSÃO

De acordo com o programa *Roll Back Malaria*, criado pela Organização Mundial de Saúde, em 1998, a resistência do *P.falciparum* aos principais antimaláricos ainda é o principal problema no controle da doença. Essa situação gera uma necessidade de se desenvolver novos medicamentos contra a malária bem como ensaios que acelerem o processo de triagem de novas drogas. Os métodos de rotina para avaliar a atividade de uma droga *in vivo* e *in vitro* são, respectivamente, a determinação da parasitemia pela microscopia óptica (Peters et al. 2002, Peters et al. 2003) e pela incorporação de (³H)-hipoxantina (Desjardins et al. 1979). É de consenso geral que a contagem da parasitemia pela microscopia óptica, apesar de específica e sensível, demanda muito tempo e é uma técnica laboriosa. Dentre outros fatores, a reprodutibilidade da contagem vai depender de uma boa preparação do esfregaço sanguíneo e da habilidade técnica do microscopista (Payne 1988). Consequentemente, todas essas variáveis podem comprometer a precisão e a reprodutibilidade do ensaio quando um grande número de compostos está sendo avaliado. Por outro lado, o método semi-automatizado de incorporação de hipoxantina tritiada, que permite avaliar a atividade de um grande número de compostos, tem como grande limitação ser um método radioativo.

Buscando acelerar o processo de triagem de drogas e substituir as metodologias convencionais utilizou-se neste estudo parasitos da malária transfectados com a proteína de fluorescência verde (GFP), uma ferramenta de marcação intracelular que tem sido amplamente utilizada nos estudos de processos biológicos das células (Gubbels & Striepen 2004). Inicialmente, utilizou-se neste estudo uma cepa de *P. berghei* transfectada com a GFP, construída pelo grupo de pesquisas em malária da Universidade de Nova York (Sultan et al. 1999). Neste parasito, a integração do plasmídeo no seu genoma confere a ele o fenótipo de fluorescência verde e resistência à pirimetamina. Como os parasitos GFP-*P. berghei* seriam mantidos no Laboratório de Malária do CPqRR por passagens semanais em camundongos fez-se necessário confirmar se não havia necessidade de mantê-lo sobre pressão da droga (pirimetamina). Os resultados permitiram concluir que a cepa GFP-*P. berghei* era pirimetamina resistente, confirmando a integração do construto no genoma do parasito.

Visto que a cepa GFP-*P.berghei* apresenta um gene exógeno no genoma, a próxima etapa foi avaliar se o procedimento de transfecção alterava a virulência da cepa GFP-*P. berghei* para camundongos. A cepa GFP-*P. berghei* mostrou uma infectividade semelhante a da cepa não transformada, como demonstrado pela evolução da infecção em camundongos. Dados similares foram relatados anteriormente, onde foi demonstrado que esporozoítos provenientes de linhagem selvagem e transfectada com a GFP infectaram cultura de células ou ratos com eficiência similar (Sultan et al. 1999). Excluindo as drogas com ação na enzima dihidrofolato redutase - timidilato sintase (DHFR-TS), nossos resultados demonstraram ainda que a susceptibilidade às drogas é semelhante entre a cepa GFP-*P. berghei* e a cepa não-transformada. O fato de que a cepa GFP-*P. berghei* tem uma mutação no gene da DHFRS-TS não a limita em ensaios de quimioterapia, já que a resistência refere à pirimetamina mas não aos outros antifolatos (Sultan et al. 1999). Outra vantagem no uso deste modelo, é ter uma nova ferramenta na busca de novos compostos que sejam ativos contra parasitos resistentes à pirimetamina.

Com o objetivo de validar a cepa GFP-*P.berghei* para substituir a contagem de parasitemia em microscopia óptica procedeu-se a análise da parasitemia dos animais infectados e não infectados pela citometria de fluxo. A detecção da fluorescência de parasitos GFP-*P. berghei* pela citometria de fluxo se mostrou altamente sensível e específica. Os resultados demonstraram que a proporção de eritrócitos fluorescentes não apresentou diferença em relação a parasitemia determinada pelos esfregaços sangüíneos corados por Giemsa. Demonstrou-se ainda que sangue normal ou eritrócitos infectados com uma cepa não transformada não têm a fluorescência específica detectada pela técnica de citometria de fluxo.

Buscando agora validar *in vitro* a cepa GFP-*P. falciparum* e substituir o método tradicional de quimioterapia *in vitro* com hipoxantina triitiada, analisou-se as parasitemias das culturas pela citometria de fluxo. Os mesmos resultados obtidos *in vivo* de quantificação da parasitemia por citometria de fluxo foram observados *in vitro* com a cepa GFP-*P. falciparum*. Isso confirmava os dados de que todos os estágios sangüíneos desses parasitos expressa a proteína de fusão (Sultan et al. 1999, Kadekoppala et al. 2000).

Os dados aqui obtidos de quantificação dos parasitos da malária, *in vivo* (GFP-*P.berghei*) e *in vitro* (GFP-*P.falciparum*), apresenta vantagens em relação a outros métodos fluorimétricos já descritos para ensaios *in vivo* (Jacobberger et al. 1983, van Vianen et al. 1993, Barkan et al. 2000) e *in vitro* (Saul et al. 1982, Whaun et al. 1983, Bianco et al. 1986, Makler et al. 1987, Smeijsters et al. 1996). As técnicas fluorimétricas já descritas utilizam corantes de ácidos nucléicos, como por exemplo dimetiloxacarbocianina (DiOC1-3), Hoechst 33258, YOYO-1, iodeto de propidium, acridina orange, SYBR Green e Picogreen (Jacobberger et al. 1983, Van Vianen et al. 1993, Barkan et al. 2000, Smilkstein et al. 2004, Bennett et al. 2004, Quashie et al. 2006). As metodologias de marcação de ácidos nucléicos apresentam limitações pois requerem várias etapas na preparação do sangue, tais como, fixação, coloração e tratamentos adicionais para prevenir o aparecimento de fluorescência inespecífica (Quashie et al. 2006). Fatores específicos podem limitar o uso de alguns destes corantes para a quantificação de parasitos *in vivo*, como é o caso de corantes de RNA, onde existe a dificuldade de distinguir eritrócitos infectados de reticulócitos não infectados, os quais contém RNA (Janse & Van Vianen 1994). Essa é uma grande limitação para os modelos murinos, já que a infecção destes pelo plasmódio está diretamente associada com reticulocitose (Autuori 1979). Por outro lado, os métodos que utilizam corantes de DNA apresentam colorações falso-positivas com plaquetas e eritrócitos não infectados (Saito-Ito et al. 2001). Existe ainda a dificuldade na padronização desses protocolos para a malária murina pois os eritrócitos de roedores contém restos nucleares que possuem DNA, denominados corpos residuais que podem alterar o resultado. Outro método descrito recentemente para utilização em ensaios quimioterápicos *in vitro* foi a quantificação de parasitos da malária por PCR em tempo real (de Monbrison et al. 2003). Esta metodologia, apesar de sensível, não têm aplicação difundida em ensaios quimioterápicos devido ao alto custo dos reagentes.

Após a padronização das leituras no citômetro de fluxo, os ensaios quimioterápicos puderam ser realizados, tanto *in vivo* utilizando a cepa GFP-*P. berghei*, quanto *in vitro* com a cepa GFP-*P.falciparum*. Para os ensaios de quimioterapia *in vivo* e *in vitro* utilizaram-se antimaláricos de uso rotineiro no tratamento de pacientes com malária. Em camundongos infectados com a cepa GFP-*P. berghei* demonstrou-se que a parasitemia determinada pela citometria de fluxo correlacionava-se com a parasitemia

determinada pela microscopia óptica, incluindo os picos de parasitemia. Portanto, esse modelo murino se mostrou adequado para a triagem de drogas *in vivo*.

Em experimentos de quimioterapia *in vitro* utilizando a cepa GFP-*P. falciparum*, os resultados demonstraram que os valores de IC₅₀ obtidos pela citometria de fluxo foram semelhantes aos valores de IC₅₀ obtidos pelo método semi-automatizado de incorporação de hipoxantina tritiada (método de referência). Mesmo que o método descrito por Desjardins et al. (1979) ainda seja amplamente utilizado, existem muitas variáveis que podem interferir no método como um todo e com isso gerar problemas nos resultados finais. Essas variáveis podem ser atribuídas à parasitemia inicial, à duração da cultura, à sincronização da cultura antes da adição da (³H)-hipoxantina, à concentração de eritrócitos não infectados e à presença de uma variedade de purinas no meio de cultura (Chulay et al. 1983, Elabbadi et al. 1992). Todas essas variáveis têm que ser rigorosamente seguidas para que a incorporação de hipoxantina seja proporcional ao crescimento dos parasitos. Além das regras especiais para o manuseio e o descarte de materiais radioativos, outro fator que pode interferir na rotina de ensaios de quimioterapia são as dificuldades na compra e na importação de materiais radioativos. Estes são fatores limitantes no uso deste protocolo na rotina dos laboratórios de pesquisa.

Outros métodos não radioativos e não fluorimétricos têm sido desenvolvidos afim de substituir o método convencional de incorporação de (³H)-hipoxantina, os chamados métodos colorimétricos (Makler et al. 1993, Basco et al. 1995, Delhaes et al. 1999, Druilhe et al. 2001, Noedl et al. 2004, Ncokazi & Egan 2005, Noedl et al. 2005). Estes apresentam algumas vantagens em relação ao método de Desjardins e colaboradores, pois não necessitam de um marcador radioativo, porém o alto custo das técnicas, associado à presença de reações falso positivas, limita os testes para a triagem de rotina de antimaláricos (revisto por Moody 2002, Murray et al. 2003). Como exemplos a DELI (*double-site enzyme-linked lactate dehydrogenase immunodetection assay*) (Makler et al., 1993) e a detecção de uma proteína rica em histidina do parasito (HRP2) (Noedl et al. 2004, Noedl et al. 2005), que utilizam anticorpos monoclonais no seus protocolos, os quais apresentam alto custo e/ou não estão disponíveis no mercado. Portanto, acredita-se que o protocolo aqui descrito com as cepas GFP-*P. berghei* e GFP-*P. falciparum* possa funcionar como um excelente modelo para a busca de novas

drogas. O presente modelo pode ser adaptado para ser processado em um fluorímetro de 96 poços, sendo apropriado para as técnicas onde há a necessidade de se avaliar um grande número de substâncias, como em projetos de bioprospecção.

Nosso grupo de pesquisa em malária tem conduzido um programa experimental de quimioterapia antimalárica há vários anos, sob a coordenação da Professora Antoniana Ursine Krettli (Krettli et al. 2001). Centenas de extratos bem como substâncias isoladas de plantas medicinais foram testadas contra *P. falciparum in vitro* e contra *P. berghei in vivo* e, alguns destes compostos demonstraram uma alta atividade contra os parasitos (Carvalho et al. 1991, Carvalho & Krettli 1991, Krettli et al. 2001, Andrade-Neto et al. 2003). A técnica aqui padronizada e estabelecida poderá ser de grande importância para atender a grande demanda de químicos, fitoquímicos e botânicos, da nossa ou de outras instituições, que enviam para o Laboratório de Malária diversas substâncias para testes quimioterápicos contra a malária. Com este trabalho pretendemos contribuir para o conhecimento científico no sentido de padronizar uma técnica que acelere o processo de triagem e identificação de substâncias ativas.

A vantagem em se utilizar parasitos transfectados com a GFP em ensaios quimioterápicos é a simplicidade e facilidade da técnica, não sendo necessário qualquer preparação prévia das amostras para a leitura da fluorescência. Estas cepas estão catalogadas num banco de reagentes de malária (*Malaria Research and Reference Reagent Resource Center - MR4*). Do ponto de vista econômico, estes parasitos estão disponíveis sem custo algum à comunidade de pesquisa da malária e o envio dos reagentes é gratuito aos países endêmicos (MR4, <http://www.malaria.atcc.org>). Assim, acredita-se que o modelo descrito aqui poderá servir como ferramenta para agilizar a triagem de novas drogas experimentais.

6. CONCLUSÕES

(1) A virulência da cepa GFP-*P. berghei* é semelhante a da cepa não transformada (NK65).

(2) Com exceção da pirimetamina, a susceptibilidade às drogas foi semelhante entre a cepa GFP-*P. berghei* e a cepa *P. berghei* NK65.

(3) O ensaio fluorimétrico utilizando a cepa GFP-*P. berghei* é adequado, para ensaios de quimioterapia experimental *in vivo*, podendo substituir a técnica convencional de microscopia óptica.

(4) O ensaio fluorimétrico utilizando a cepa GFP-*P. falciparum* é adequado em ensaios de quimioterapia experimental *in vitro* podendo substituir o método convencional de incorporação de hipoxantina radioativa e o método tradicional por contagem de esfregaços sanguíneos em microscopia óptica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ambroise-Thomas P & Rossignol JF 1986. Chemotherapy of resistant falciparum malaria. *Parasitol Today* 2(3): 79–80.

Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, Menard R 2006. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nat Med* 12(2): 220-224.

Andrade-Neto VF, Brandao MG, Stehmann JR, Oliveira LA, Krettli AU 2003. Antimalarial activity of *Chinchona*-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. *J Ethnopharmacol* 87(2-3): 253-256.

Autuori MJ 1979. Mean cytoplasmic protein concentration of host erythrocytes and the reticulocyte response in Plasmodium berghei infected mice. *Experientia* 35(12): 1579-1580.

Baird JK, Hoffman SL 2004. Primaquine therapy for malaria. *Clin Infect Dis* 39(9): 1336-1345.

Barkan D, Ginsburg H, Golenser J 2000. Optimization of flow cytometric measurement of parasitemia in plasmodium-infected mice. *Int J Parasitol* 30: 649-653.

Barnwell JW, Galinski MR 1998. Invasion of vertebrate cells: Erythrocytes. In IW Sherman, *Malaria: Parasite biology, pathogenesis, and protection*. ASM PRESS. Washington, DC: Cap.7, p. 93-120.

Baton LA, Ranford-Cartwright LC 2004. Plasmodium falciparum ookinete invasion of the midgut epithelium of Anopheles stephensi is consistent with the time bomb model. *Parasitology* 129: 663-676.

Basco LK, Marquet F, Makler MM, Le Bras J 1995. Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax: lactate dehydrogenase activity and its application for in vitro drug susceptibility assay. *Exp Parasitol* 80: 260-71.

Bell A 2005. Antimalarial drug synergism and antagonism: Mechanistic and clinical significance. *FEMS Microbiol Lett* 253: 171–184.

Bennett TN, Paguio M, Gligorijevic B, Seudieu C, Kosar AD, Davidson E, Roepe PD 2004. Novel, rapid, and inexpensive cell-based quantification of antimalarial drug efficacy. *Antimicrob Agents Chemother* 48(5): 1807-1810.

Bianco AE, Battye FL, Brown GV 1986. *Plasmodium falciparum*: Rapid quantification of parasitemia in fixed malaria cultures by flow cytometry. *Exp Parasitol* 62: 275-282.

Carvalho LH, Brandão MGL, Santos-Filho D, Lopes JLC, Krettli AU 1991. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied *in vivo* in

Plasmodium berghei-infected mice and *in vitro* against *Plasmodium falciparum* in culture. Braz J Med Biol Res 24(11): 1113-1123.

Carvalho LH, Krettli AU 1991. Antimalarial chemotherapy with natural products and chemically defined molecules. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 86: 181-184.

Chulay JD, Haynes JD, Diggs CL 1983. *Plasmodium falciparum*: Assessment of *in vitro* growth by [³H]Hypoxanthine incorporation. Exp Parasitol 55: 138-146.

Delhaes L, Lazaro JE, Gay F, Thellier M, Danis M 1999. The microculture tetrazolium assay (MTA): another colorimetric method of testing *Plasmodium falciparum* chemosensitivity. Ann Trop Med Parasitol 93(1): 31-40.

de Monbrison F, Raynaud D, Latour-Fondanaiche C, Staal A, Favre S, Kaiser K, Peyron F, Picot S 2003. Real-time PCR for chloroquine sensitivity assay and for *pfmdr1*-*pfcr* single nucleotide polymorphisms in *Plasmodium falciparum*. J Microbiol Methods 54(3): 391-401.

Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD 1979. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semi automated microdilution technique. Antimicrob Agents Chemother 16: 710-718.

Druilhe P, Moreno A, Blanc C, Brasseur PH, Jacquier P 2001. A colorimetric *in vitro* drug sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. Am J Trop Med Hyg 64(5-6): 233-41.

Duraisigh MT, Jones P, Sambou I, Von Seidlen L, Pinder M, Warhurst DC 2000a. The tyrosine-86 of the *pfmdr 1* gene of *P. falciparum* is associated with increased sensitivity to the antimalarials mefloquine and artemisinin. Mol Biochem Parasitol 108: 13-23.

Duraisigh MT, Roper C, Walliker D, Warhurst DC 2000b. Increased sensitivity to the antimalarials mefloquine and artemisinin is conferred by mutations in the *pfmdr 1* gene of *P. falciparum*. Mol Microbiol 36: 995-961.

Elabbadi N, Ancelin ML, Vial HJ 1992. Use of radioactive ethanolamine incorporation into phospholipids to assess *in vitro* antimalarial activity by the semiautomated microdilution technique. Antimicrob Agents Chemother 36(1):50-55.

Fitch CD 2004. Ferriprotoporphyryn IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. Life Sci 74: 1957-1972.

Franke-Fayard B, Trueman H, Ramesar J, Mendoza J, van der Keur M, van der Linden R, Sinden RE, Waters AP, Janse CJ 2004. A *Plasmodium berghei* reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. Mol Biochem Parasitol 137(1): 23-33.

FUNASA 2002. *Boletim epidemiológico: Situação da Prevenção e Controle das Doenças transmissíveis no Brasil*. 22-24.

- Gubbels MJ & Striepen B 2004. Studying the cell biology of apicomplexan parasites using fluorescent proteins. *Microsc Microanal* 10: 568–579.
- Gysin J 1998. *Animal Models: Primates*. In: *Malaria: Parasite biology, Pathogenesis, and Protection*. Washington, DC: ASM PRESS. Cap.29, 419-441.
- Ha DS, Schwarz JK, Turco SJ, Beverley SM 1996. Use of green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 77: 57–64.
- Harinasuta T, Suntharasamai P, Viravan C 1965. Chloroquine-resistant falciparum malaria in Thailand. *Lancet* 2: 657–660.
- Hoppe HC, van Schalkwyk DA, Wiehart UI, Meredith SA, Egan J, Weber BW 2004. Antimalarial Quinolines and Artemisinin Inhibit Endocytosis in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 48(7): 2370–2378.
- Hyde JE 2005. Drug-resistant malaria. *Trends Parasitol* 21(11): 494-498
- Jacobberger JW, Horan PK, Hare JD 1983. Analysis of malaria parasite-infected blood by flow cytometry. *Cytometry* 4(3): 228-237.
- Janse CJ, Van Vianen PH 1994. Flow cytometry in malaria detection. In: *MATSUDAIRA, L. and WILSON, L. Methods Cell Biol* 42 Alaska: Science and Technology Books. cap.18. 295-316.
- Jensen JB, Trager W 1977. *Plasmodium falciparum* in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. *J Parasitol* 3(5): 883-886.
- Jimenez-Diaz MB, Rullas J, Mulet T, Fernandez L, Bravo C, Gargallo-Viola D, Angulo-Barturen I 2005. Improvement of detection specificity of *Plasmodium*-infected murine erythrocytes by flow cytometry using auto fluorescence and YOYO-1. *Cytometry A* 67: 27-36.
- Kadekoppala M, Kline K, Akompong T, Haldar K 2000. Stable expression of a new chimeric fluorescent reporter in the human malaria parasite *P. falciparum*. *Infect Immun* 68: 2328-2332.
- Kinnamon KE & Rothe WE 1975. Biological screening in the U.S. Army antimalarial drug development program. *Am J Trop Med Hyg* 24(2): 174-178.
- Keiser J, Utzinger J, Caldas de Castro M, Smith TA, Tanner M, Singer BH 2004. Urbanization in sub-Saharan Africa and implication for malaria control. *Am J Trop Med Hyg* 71(2):118-27.
- Krettli AU, Andrade-Neto VF, Brandao MG, Ferrari WM 2001. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96(8): 1033-1042.
- Krotoski WA 1985. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malaria relapse. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 79: 1-11.

- Lambros C, Vanderberg JP 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* 65: 418-420.
- Landau I, Gautret P 1998. Animal Models: Rodents. In: *Malaria: Parasite biology, Pathogenesis, and Protection*. Washington, DC: ASM PRESS. Cap.7, 93-120.
- Levy M, Buskila D, Gladman DD, Urowitz MB, Koren G 1991. Pregnancy outcome following first trimester exposure to chloroquine. *Am J Perinatol* 8(3): 74-78.
- Lopes D, Rungsihirunrat K, Nogueira F, Seugorn A, Gil JP, do Rosario VE, Cravo P 2002. Molecular characterization of drug-resistant *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Malaria Journal*. 1(12): 1-10.
- Makler MT, Lee LG, Recktenwald D 1987. Thiazole orange: a new dye for Plasmodium species analysis. *Cytometry* 8(6): 568-570.
- Makler MT, Hinrichs DJ 1993. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of Plasmodium falciparum as an assessment of parasitemia. *Am J Trop Med Hyg* 48(2): 205-210.
- Makler MT, Ries JM, Williams JA, Bancroft JE, Piper RC, Gibbins BL, Hinrichs DJ 1993. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for Plasmodium falciparum drug sensitivity. *Am J Trop Med Hyg* 48(6): 739-741.
- Marques AC 1986. Migration and dissemination of malaria in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81(2): 17-30.
- Meryman HT, Hornblower M 1972. A method for freezing and washing red blood cells using a high glycerol concentration. *Transfusion* 12(3): 145-156.
- Meshnick SR 1998a. From Quinine to Qinghaosu: Historical Perspectives. In: Sherman IW. *Malaria: Parasite biology, pathogenesis, and protection*. Washington, DC: ASM PRESS. Cap.24, 341-353.
- Meshnick SR 1998b. Artemisinin antimalarials: mechanisms of action and resistance. *Med Trop (Mars)* 58(3): 13-17.
- Milhou WK & Kyle DE 1998. Introduction to the Models of Action of and Mechanisms of Resistance to Antimalarials. In: Sherman IW. *Malaria: Parasite biology, pathogenesis, and protection*. Washington, DC: ASM PRESS. Cap.21, 303-316.
- Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415(7): 673-679.
- Ministério da Saúde 2001. III. Brasil - Fundação Nacional de Saúde. *Manual de Terapêutica da Malária / Colaboração de Agostinho Cruz Marques [et al]*. Brasília: Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. 104 p.

Ministério da Saúde 2003. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária PNCM / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde.

Misteli T, Spector DL 1997. Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nat Biotechnol* 15(10): 961-964.

Moody A 2002. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev* 15(1): 66-78.

Moore DV, Lanier JE 1961. Observation on two *Plasmodium falciparum* infections with an abnormal response to chloroquine. *Am J Trop Med Hyg* 10: 5-9.

Mota MM, Thathy V, Nussenzweig RS, Nussenzweig V 2001. Gene targeting in the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii*. *Mol Biochem Parasitol* 113(2): 271-278.

Mota MM, Rodrigues A 2002. Invasion of mammalian host cells by *Plasmodium* sporozoites. *BioEssays* 24(2): 149-156.

Mota MM, Rodrigues A 2004. Migration through host cells: the first steps of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *Cell Microbiol* 6(12): 1113–1118.

Murray CK, Bell D, Gasser RA, Wongsrichanalai C 2003. Rapid diagnostic testing for malaria. *Trop Med Int Health* 8(10): 876-883.

Ncokazi KK & Egan TJ 2005. A colorimetric high-throughput β -hematin inhibition-screening assay for use in the search for antimalarial compounds. *Anal Biochem* 338(2): 306–319.

Noedl H, Attlmayr B, Wernsdorfer WH, Kollaritsch H, Miller RS 2004. A Histidine-Rich Protein 2 Based malaria drug sensitivity assay for field use. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 71(6): 711–714.

Noedl H, Bronnert J, Yingyuen K, Attlmayr B, Kollaritsch H, Fukuda M 2005. Simple histidine-rich protein 2 double-site sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for use in malaria drug sensitivity testing. *Antimicrob Agents Chemother* 49(8): 3575-3577.

O'Neill PM, Ward SA, Berry NG, Jeyadevan JP, Biagini GA, Asadollaly E, Park BK, Bray PG 2006. A medicinal chemistry perspective on 4-aminoquinoline antimalarial drugs. *Curr Top Med Chem* 6(5): 479-507.

Ono T, Tadakuma T, Rodriguez A 2006. *Plasmodium yoelii yoelii* 17XNL constitutively expressing GFP throughout the life cycle. *Exp Parasitol* 16, in press.

Osdene TS, Russel PB, Rane L 1967. 2,4,7-Triamino-6-ortho-substituted arylpteridines: A new series of potent antimalarial agents. *J Med Chem* 10(3): 431-434.

Payne D 1988. Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the PHC level. *Bull World Health Organ* 66(5): 621-626.

Peters W 1965. Drug resistance in *Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948. I. Chloroquine resistance. *Exp Parasitol* 17(1): 80-89.

Peters W, Fleck SL, Robinson BL, Stewart LB, Jefford CW 2002. The chemotherapy of rodent malaria. LX. The importance of formulation in evaluating the blood schizontocidal activity of some endoperoxide antimalarials. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 96, 559–573.

Peters W, Stewart LB, Robinson BL 2003. The chemotherapy of rodent malaria. LXI. Drug combinations to impede the selection of drug resistance. Part 4: the potential role of 8-aminoquinolines. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 97, 221–236.

Pradel G, Frevert U 2001. Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. *Hepatology* 33(5): 1154-1165.

Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111(2): 229-233.

Quashie NB, de Koning HP, Ranford-Cartwright LC 2006. An improved and highly sensitive microfluorimetric method for assessing susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in vitro. *Malar J* 5: 95.

Ridley RG 2002. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature* 415(6872): 686-693.

Rieckmann KH, McNamara JV, Frischer H, Stockert TA, Carson PE, Powell RD 1968. Effects of chloroquine, quinine, cycloguanil upon maturation of asexual erythrocytic forms of two strains of *Plasmodium falciparum* in vitro. *Am J Trop Med Hyg* 17(5): 661-671.

Rieckmann KH, Campbell GH, Sax LJ, Mrema JE 1978. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An in vitro microtechnique. *Lancet* 1(8054):22-23.

Saito-Ito A, Akai Y, He S, Kimura M, Kawabata M 2001. A rapid, simple and sensitive flow cytometric system for detection of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Int* 50(4): 249-257.

Sanchez BA, Mota MM, Sultan AA, Carvalho LH 2004. *Plasmodium berghei* parasite transformed with green fluorescent protein for screening blood schizontocidal agents. *Int J Parasitol* 34(4): 485-490.

Saul A, Myler P, Mangan T, Kidson C 1982. *Plasmodium falciparum*: automated assay of erythrocyte invasion using flow cytofluorometry. *Exp Parasitol* 54(1): 64-71.

Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação da Malária no Brasil, 2005.

Shimomura O 2005. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J Microsc* 217(1): 1-2.

- Sibley CH, Ringwald P 2006. A database of antimalarial drug resistance. *Malar J* 5(1): 1-9.
- Smeijsters LJ, Zijlstra NM, Franssen FF, Overdulve JP 1996. Simple, fast, and accurate fluorometric method to determine drug susceptibility of *Plasmodium falciparum* in 24-well suspension cultures. *Antimicrob Agents Chemother* 40:835-838.
- Smilkstein M, Sriwilaijaroen N, Kelly JX, Wilairat P, Riscoe M 2004. Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. *Antimicrob Agents Chemother* 48(5): 1803–1806.
- Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI 2005. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 434(7030):214-217.
- Sultan AA, Thathy V, Nussenzweig V, Menard 1999. Green fluorescent protein as a marker in *Plasmodium berghei* transformation. *Infect Immun* 67(5): 2602-2606.
- Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT 2006. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. *Science* 313(5791): 1287-1290.
- Tauil PL 2006. Perspectives of vector borne disease control in Brazil. *Rev Soc Brasil Med Trop* 39(3): 275-277.
- Trager W & Jensen JB 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193(4254): 673-675.
- Trager W & Jensen JB 1997. Continuous Culture of *Plasmodium falciparum*. Its impact on malaria research. *Int J Parasitol* 27(9): 989-1006.
- van Dijk MR, Janse CJ, Waters AP 1996. Expression of a *Plasmodium* gene introduced into subtelomeric regions of *Plasmodium berghei* chromosomes. *Science* 271(5249): 662-665.
- van Vianen PH, van Engen A, Thaithong S, van der Keur M, Tanke HJ, van der Kaay HJ, Mons B, Janse CJ 1993. Flow cytometric screening of blood samples for malaria parasites. *Cytometry* 14(3): 276–280.
- VanWye JD, Haldar K 1997. Expression of green fluorescent protein in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 87(2):225–229.
- Vieira PP, das Graças Alecrim M, da Silva LH, Gonzales-Gimenez I, Zalis MG 2001. Analysis of the pfcrt K76T mutation in *P. falciparum* isolates from Amazon region of Brazil. *J Infect Dis* 183: 1832-1833.
- Vlachou D, Zimmermann T, Cantera R, Janse CJ, Waters AP, Kafatos FC 2004. Real-time, in vivo analysis of malaria ookinete locomotion and mosquito midgut invasion. *Cell Microbiol* 6(7): 671-685.

Vlachou D, Schlegelmilch T, Runn E, Mendes A, Kafatos FC 2006. The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Curr Opin Genet Dev* 16(4): 384-391.

Whaun JM, Rittershaus C, Ip SH 1983. Rapid identification and detection of parasitized human red cells by automated flow cytometry. *Cytometry* 4(2): 117-122.

Winson MK & Davey HM 2000. Flow Cytometric analysis of microorganisms. *Methods* 21(3): 231-240.

Woodrow CJ, Haynes RK, Krishna S 2005. Artemisinins. *Postgrad Med J* 81(952): 71-78.

Woodrow CJ, Krishna S 2006. Antimalarial drugs: recent advances in molecular determinants of resistance and their clinical significance. *Cell Mol Life Sci* 63(14): 1586–1596.

World Health Organization (WHO) 2001. In vitro micro-test (mark III) for the assessment of the response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, mefloquine, quinine, amodiaquine, sulfadoxine/pyrimethamine and artemisinin. CTD/MAL/97.20 Rev. 2 2001.

World Health Organization (WHO) 2006. WHO Guidelines for the treatment of malaria.

World Health Organization (WHO)/Roll Back Malaria 2006. Facts on acts (Artemisinin-based Combination Therapies). An update on recent progress in policy and access to treatment. January,.

Wu Y, Kirkman LA, Wellems TE 1996. Transformation of *Plasmodium falciparum* malaria parasites by homologous integration of plasmids that confer resistance to pyrimethamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(3): 1130-1134.

Yamauchi LM, Coppi A, Snounou G, Sinnis, P 2006. *Plasmodium yoelli* sporozoites trickle out of the inoculation site. XXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology (BC): 62.

Yoeli M 1965. Studies on *P. berghei* in nature and under experimental conditions. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 59: 225-279.

Zieler H, Dvorak JA 2000. Invasion in vitro of mosquito midgut cells by the malaria parasite proceeds by a conserved mechanism and results in death of the invaded midgut cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(21): 11516-11521.

8. ANEXOS



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

International Journal for Parasitology 34 (2004) 485–490



www.parasitology-online.com

Plasmodium berghei parasite transformed with green fluorescent protein for screening blood schizontocidal agents

Bruno A.M. Sanchez^a, Maria M. Mota^b, Ali A. Sultan^c, Luzia H. Carvalho^{a,*}

^aCentro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, Av. Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte, MG 30190-002, Brazil

^bInstituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras 2780-156, Portugal

^cDepartment of Immunology and Infectious Diseases, Harvard School of Public Health, Boston, MA 02115, USA

Received 10 September 2003; received in revised form 6 November 2003; accepted 10 November 2003

Abstract

High priority has been given to new assays that facilitate and accelerate the development of novel antimalarial compounds. Unlike evaluation of drugs *in vitro*, in which new approaches have been used to expedite identification of parasites, the conventional *in vivo* murine assay requires determination of parasitemia by light microscopy, an incompatible technique to test large numbers of drugs. We have investigated the possibility of using an autonomously fluorescent *Plasmodium berghei* strain, stably transformed with the green fluorescent protein, to rapidly quantify parasite growth by flow cytometry. The major improvement of this method is that *P. berghei* line transformed with green fluorescent protein parasites can be quickly and specifically detected in a drop of parasite-infected blood without any manipulation of the sample. Our results showed a clear correlation between the numbers of fluorescent cells detected by flow cytometry and conventional parasitemia, including a correspondence in the peaks of parasitemia. The validation of *P. berghei* line transformed with green fluorescent protein for chemotherapy studies was performed by evaluating its response to conventional antimalarial drugs such as chloroquine, quinine and sodium artesunate. The results of drug-susceptibility assays as determined by flow cytometry were comparable with those obtained by microscopic examination of Giemsa-stained slides. This PbGFP parasite should prove to be a rapid, simple and sensitive tool for the examination of the large number of compounds and conditions involved in the initial stages of drug development.

© 2003 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Plasmodium berghei*; Green fluorescent protein; Chemotherapy; Flow cytometry

1. Introduction

Malaria remains endemic in more than 90 countries, principally in the developing world, with between 300 and 500 million new infections each year and 2.4 billion people vulnerable to infection (WHO, 2000). In the absence of an effective vaccine, antimalarial drugs remain the main means to control morbidity and mortality due to malaria. At present, a number of antimalarial drugs are available, but their use is limited by increasing drug resistance in the parasite. Thus, there is a great need to find the optimal use of available drugs in combined therapies and to develop new antimalarial drugs to replace ones that are inefficacious.

The most widely used procedures to screen antimalarial drugs *in vivo* include rodent models, usually infected with *Plasmodium* species such as *Plasmodium berghei* or *Plasmodium yoelii*. Even though the rodent malaria models are imperfect, there is consensus that they remain an almost obligatory step for *in vivo* studies of the activity of new molecules and the establishment of new therapeutic strategies (Landau and Gautret, 1998). In addition, the rodent models should be the technique of first choice when examining the resistance potential of a new compound or antimalarial combination (Peters, 1999).

A major practical problem of the conventional rodent *Plasmodium* assay is that parasitemia has to be evaluated by microscopic counting of Giemsa-stained thin blood smears. This is a laborious technique that requires time plus devoted and trained staff, which limits the number of drugs to be tested. Alternative methods for measuring parasitemia include staining intra-erythrocytic *Plasmodium* parasites

* Corresponding author. Address: Malaria Laboratory, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Av. Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte, 30190-002 MG, Brazil. Tel.: +55-31-32953566; fax: +55-31-3293115.

E-mail address: lcarvalho@cpqrr.fiocruz.br (L.H. Carvalho).

with different nucleic acid dyes, followed by flow cytometry analysis (Jacobberger et al., 1983; van Vianen et al., 1993; Barkan et al., 2000). Since these methods involve several steps in blood preparation such as fixation, permeabilisation and staining, they do not have widespread application. In addition, staining of host reticulocytes, platelets and uninfected erythrocytes that leads to false positive results is not unusual, especially in rodent malaria (Janse and Van Vianen, 1994; Saito-Ito et al., 2001).

The development of transfection techniques for *Plasmodium* made it possible to express foreign genes and use them as reporters in a variety of studies (Crabb et al., 1997; Kocken et al., 1998). One of these reporter genes, the green fluorescent protein (GFP) from the bioluminescent jellyfish *Aequorea victoria*, is particularly attractive because it does not require additional cofactors or exogenous substrates for its activity and it is highly stable (Chalfie et al., 1994). Recently, stable integrated expression of GFP has been reported in rodent malaria parasite *P. berghei* (de Koning-Ward et al., 1998; Sultan et al., 1999). Since GFP-generated fluorescence can easily and rapidly be detected in a drop of parasite-infected blood without further treatment of the sample, the goal of the present work was to investigate the potential value of this transfected parasite for antimalarial drug studies. We demonstrate here that this system is a valuable in vivo approach for screening and identifying novel blood schizontocidal drugs.

2. Material and methods

2.1. Parasites and hosts

A *P. berghei* line transformed with green fluorescent protein (PbGFP) was kindly provided by Dr A. Sultan (Harvard School of Public Health, MA, USA). The construction of this stably transformed line of *P. berghei*, in which blood-stage parasites are autonomously fluorescent, was previously described (Sultan et al., 1999). Briefly, the structural gene for the fluorescence-activated cell sorting (FACS)-adapted GFP mutant 2 (GFPmut2) was fused to the coding sequence of the dihydrofolate reductase–thymidylate synthase (DHFR–TS) gene, with expression driven by the DHFR–TS untranslated regions (UTR). The resulting cassette followed by ~3 kb of thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) targeting sequence was used to construct an insertion plasmid, which was integrated at a cognate locus into the *P. berghei* genome. Since stable integration was obtained, PbGFP parasite does not need drug pressure. Recombinant parasites, which bear a wild-type copy of TRAP, yielded higher levels of fluorescence in parasite-infected blood. In some experiments, the *P. berghei* NK-65 strain (non-transformed) was used as a control (PbWild-type). *P. berghei* strains were kept through weekly blood passages in outbred Swiss or BALB/c mice. The animal experiments

in this study were carried out at Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, Brazilian Ministry of Health, in compliance with the Guide for Animal Experimentation.

2.2. Infection and parasite development

Six to 8-week-old male and female BALB/c mice were inoculated by i.p. injection of 10^6 erythrocytes infected with either PbGFP or PbWild-type. The progress of infection was assessed daily by conventional microscopic examination as well as by flow cytometric analyses. A drop of blood from the tail was used to prepare thin Giemsa-stained blood smears, and two independent microscopic examinations were performed on each slide. In parallel, a second drop of blood (~3 μ l) was collected directly into 3 ml of culture medium (such as RPMI-1640 or D-MEM plus 24 mM NaHCO_3) for flow cytometry analysis. Each sample was run twice on a FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) flow cytometer with a 488 nm argon laser and Cell Quest software. Erythrocytes were identified on the basis of their specific forward (FSC) and side (SSC) light-scattering properties and a total of 5000–10,000 events were counted for each sample. For the discrimination of parasitised erythrocytes from non-infected, we analysed 30 independent blood samples from uninfected mice by flow cytometry. The threshold of positivity was a parasitemia of 0.58%, established by the average plus two standard deviations (Fig. 1A).

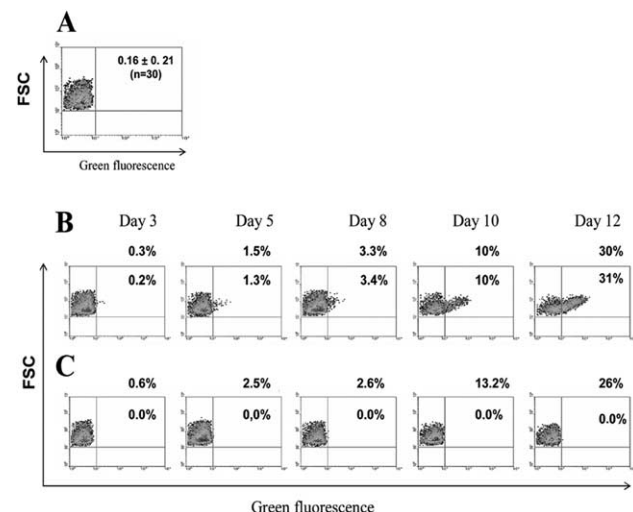


Fig. 1. Flow cytometry analysis of erythrocytes from uninfected mice (A) or infected with either PbGFP (B) or PbWild-type (C). (A) The average non-specific fluorescence readings were obtained from 30 independent blood samples and results are expressed into the right upper quadrant as mean \pm SD of green fluorescence. (B, C) Blood samples from mice infected with either PbGFP (B) or PbWild-type (C) were analysed from day 3 up to day 12 p.i. For each dot blot, the number inside of the right upper quadrant represents the percentage of positive fluorescent erythrocytes, and the numbers on the top the percentage of infected erythrocytes, as determined by microscopic counting of Giemsa-stained smears.

2.3. Antimalarial treatment

To validate our model, we tested some of the main antimalarial drugs used to treat human infections, i.e. chloroquine diphosphate, quinine sulphate, sodium artesunate. All drugs were gently provided by Dr C.J.F. Fontes (Federal University of Mato Grosso, MT, Brazil). Chloroquine and quinine salts were dissolved in distilled water by sonication and artesunate powder was dissolved in 5% sodium bicarbonate in distilled water. Groups of 3–5 animals each were treated with sub-curative doses of these drugs, through oral gavage, once daily at the dose stated for 5 days, starting 24 h p.i. Parasitemia was determined daily in parallel by conventional microscopy and flow cytometry, as described before. **Statistical comparisons between the means obtained by flow cytometry and microscopy were made with paired Student's *t*-test at a confidence level of 95%.**

3. Results

As illustrated in Fig. 1B, the green fluorescence signal was clearly associated with the development of PbGFP intracellular parasites, as evidenced by a direct correlation between cytometric and microscopic determination, even at low parasitemia. In addition, erythrocytes from mice infected with PbWild-type strain displayed no specific fluorescence at any time of infection (Fig. 1C).

Since PbGFP is a transfected parasite, we decide to check in vivo the virulence of this strain in comparison to the wild-type. Mice were infected with erythrocytes from either PbGFP or PbWild-type and parasitemias were daily monitored by Giemsa-stained smears. The evolution of the infection, measured by parasitemia as well as by mortality, was similar between mice infected with PbGFP and those infected with PbWild-type strain (data not shown).

We further examined whether PbGFP model can be employed as a tool to evaluate in vivo responses to blood

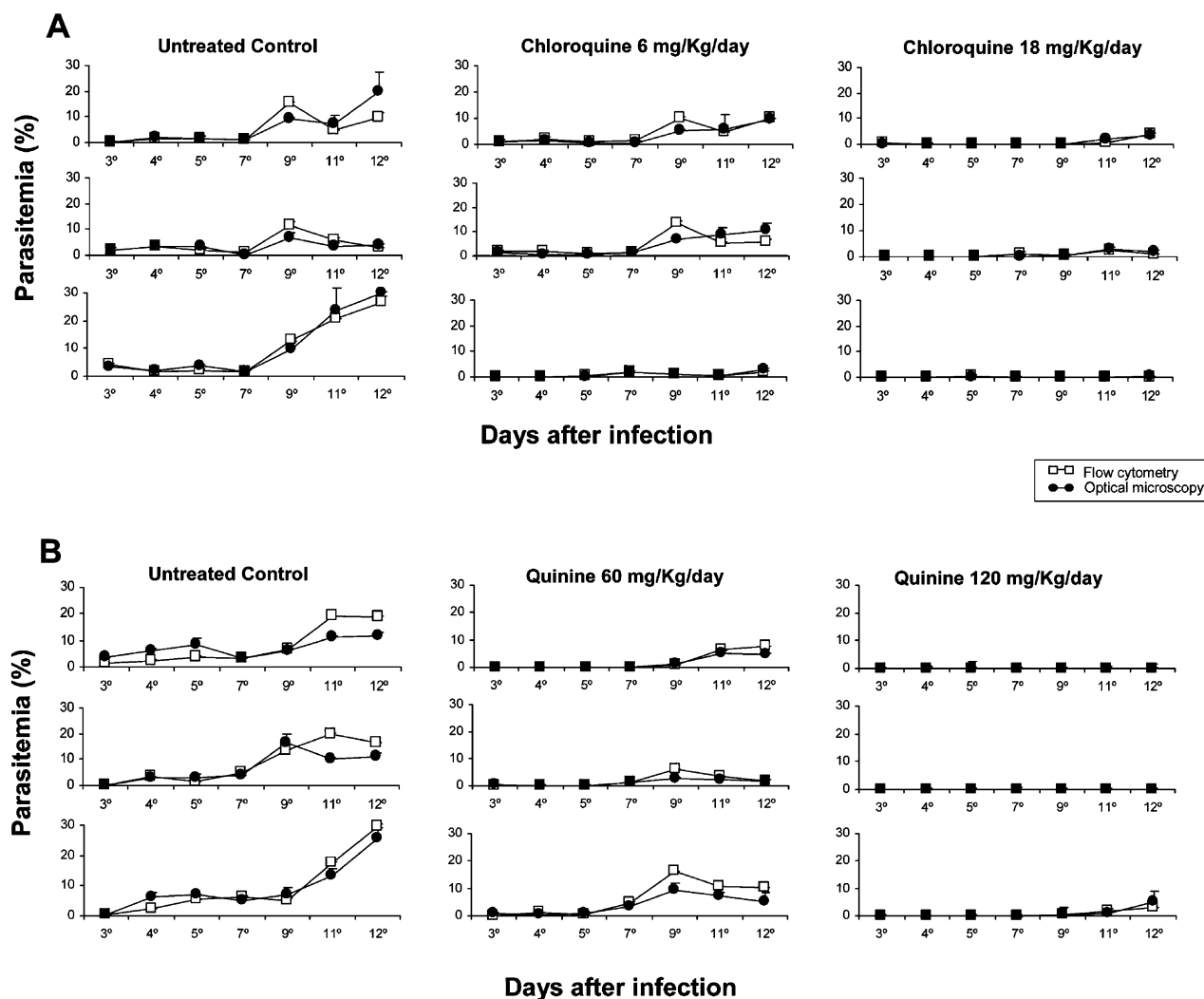


Fig. 2. Comparison of percent parasitemia determined by conventional microscopy and flow cytometric analysis in PbGFP infected-mice, treated with sub-curative doses of antimalarial drugs. Three to five mice per group were injected with 10^6 infected erythrocytes and treated for five consecutive days with chloroquine (A) or quinine (B), starting 24 h p.i. Each graphic represents the results from an individual animal, and three mice are illustrated per group.

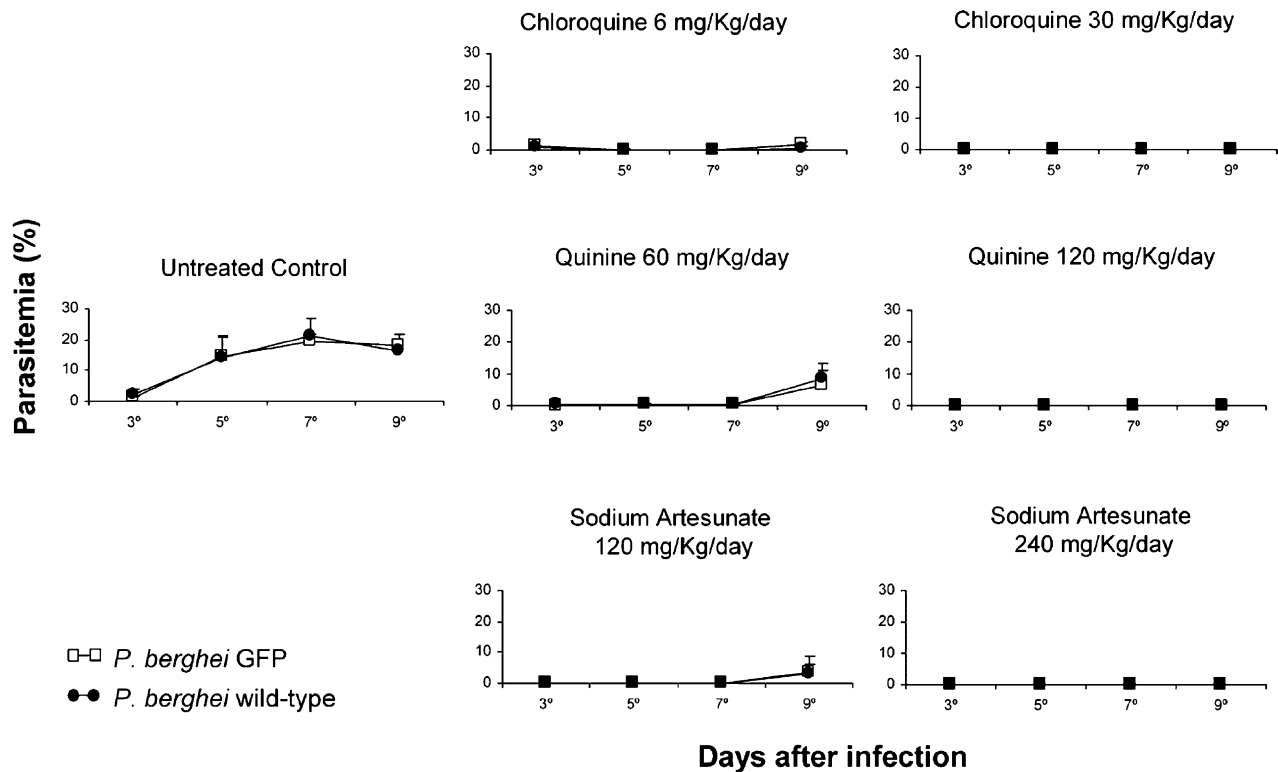


Fig. 3. Effect of 5 days administration of chloroquine, quinine or sodium artesunate on parasitemia of mice infected with PbGFP or PbWild-type. Mice were infected with 10^6 infected erythrocytes from either PbGFP or PbWild-type and treated for five consecutive days with antimalarial drugs, starting 24 h p.i. Giemsa-stained smears were prepared from day three to nine post-infection and the results are shown as mean of parasitemia \pm SD ($n = 5$).

schizontocidal drugs. For experimental chemotherapy assays, the mice were divided into groups of 3–5 animals, and received sub-curative doses of chloroquine (Fig. 2A), quinine (Fig. 2B) or sodium artesunate (data not shown). The effect of different doses of these antimalarial drugs on inhibition of parasite growth was similar regardless the method of detection, e.g. flow cytometry or conventional microscopy (paired *t*-test, $P > 0.05$). This was also evident by correspondence to the peaks of parasitemia (Fig. 2).

Finally, to compare the susceptibility to antimalarial drugs among transformed and non-transformed strains, group of mice infected with PbGFP or PbWild-type were treated with curative or sub-curative doses of antimalarial drugs. As shown in Fig. 3, PbGFP-infected mice showed responses to chloroquine, quinine and sodium artesunate which were similar, in terms of parasitemia profile, to those obtained in PbWild-type-infected mice.

4. Discussion

Our group has been conducting an experimental anti-malarial chemotherapy program for many years. Hundreds of extracts as well as molecules isolated from medicinal plants were tested against *in vitro Plasmodium falciparum* and *in vivo P. berghei*, and some of them have demonstrated moderate to high activity (Carvalho et al., 1991; Carvalho and Krettli, 1991; Krettli et al., 2001; Andrade-Neto et al.,

2003). Although *P. falciparum* growth has been monitored by parasite uptake of [H^3] hypoxanthine (Desjardins et al., 1979), *P. berghei* is still routinely monitored by microscopic counting (Peters et al., 2002; Peters et al., 2003). It is a consensus that microscopic examination of parasites is time- and labor-consuming, and the reliability depends on the quality of smears and the technical ability of the microscopist (Payne, 1988). Consequently, the accuracy and reproducibility are compromised on a large-scale antimalarial screening.

Although automated flow cytometric methods for detection of malaria parasites using fluorescent dyes that bind DNA and/or RNA have been reported, the majority of them are restricted to identification of *P. falciparum* *in vitro* (Saul et al., 1982; Whaun et al., 1983; Bianco et al., 1986; Makler et al., 1987). A limiting factor of using a RNA-binding fluorochrome is the difficulty in distinguishing infected red blood cells (RBC) from non-infected reticulocytes containing RNA (Janse and Van Vianen, 1994). It is a limitation in *Plasmodium*-infected mice, where infection is usually associated with reticulocytosis (Autuori, 1979). In addition, methods using DNA-specific dyes have the drawback of non-specifically binding to platelets and/or uninfected erythrocytes. Recently, protocols to reduce non-specific staining have been described for *P. falciparum* in culture (Saito-Ito et al., 2001). These protocols cannot be applied to murine malaria due to interference by residual bodies of the nucleus in rodent RBC.

The potential of a GFP-based marker is that it makes intracellular parasite, such as *Plasmodium*, fluorescent itself; therefore quantification of parasites is remarkably specific. The present study shows that in the PbGFP model the proportion of fluorescent RBC was not significantly different of the parasitemia determined by Giemsa staining of blood smears. This confirms that all RBC parasite-stages express a functional fusion protein (Sultan *et al.*, 1999). In addition, RBC from uninfected or mice infected with the PbWild-type strain displayed no specific fluorescence.

To determine the value of the PbGFP model for drug-susceptibility assays we used as positive control, conventional antimalarial drugs, i.e. chloroquine, quinine and sodium artesunate. We have shown in different chemotherapy experiments that automatic reading of parasite growth by flow cytometry gives results comparable with those of microscopic examination of Giemsa-stained slides. In addition, the standard deviations obtained by flow cytometry were smaller than those obtained by light microscopy.

The transfection procedure appears not to modify the virulence of this *P. berghei* strain, since transformed or wild-type parasites displayed similar infectivity to mice, as indicated by the evolution of parasitemia as well as mice mortality among both experimental groups. This confirms earlier reports where sporozoites from both strains invaded cultured cells or infected rats with similar efficiency (Sultan *et al.*, 1999). The fact that the PbGFP strain has a mutated form of the *DHFR-TS* gene, that confers resistance to pyrimethamine but not to other antifolate drugs, does not limit its use for chemotherapy assays. Instead, it made PbGFP strain a suitable model to search for alternative drugs to treat *P. falciparum* pyrimethamine-resistant strains, which are now spreading in different endemic areas of the world, including Africa (Warhurst, 2002; Wongsrichanalai *et al.*, 2002). Apart from drugs which target the parasite DHFR, our data support the hypothesis that the susceptibility to drugs is similar between transformed and non-transformed strains. That was demonstrated in experiments of inhibition of parasite growth where PbGFP-infected mice showed responses to chloroquine, quinine and sodium artesunate, being comparable to those obtained in PbWild-type-infected mice. Finally, we have been maintaining PbGFP parasite for 2 years without any drug pressure, it validates widespread application of this transfected parasite for chemotherapy studies.

In conclusion, the method described here, which involves collection of a blood drop from the tail vein and direct analysis with a flow cytometer, could replace the conventional rodent system for screening and identifying novel blood schizontocidals.

Acknowledgements

We thank Oscar Bruña-Romero for initial flow cytometric analyses and helpful discussions; L.A. Moreira

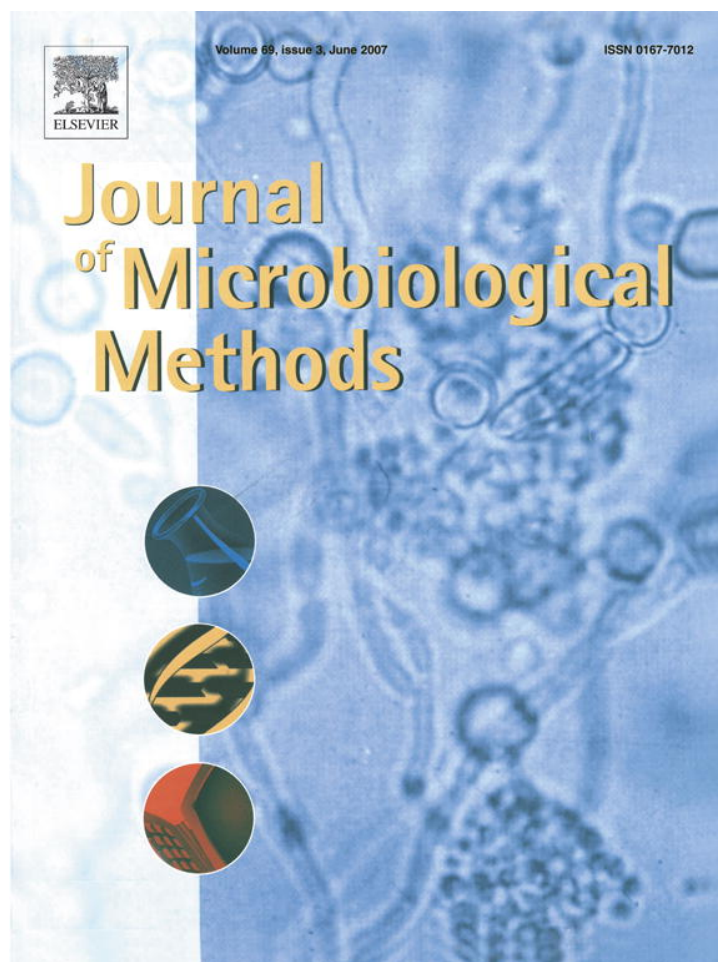
for reviewing the manuscript; A.U. Krettli for encouragement. LHC receives a Research fellowship from CNPq (Brazil) and BAMS is a fellow from PIBIC/CNPq/FIOCRUZ.

References

- Andrade-Neto, V.F., Brandao, M.G.L., Stehmann, J.R., Oliveira, L.A., Krettli, A.U., 2003. Antimalarial activity of Cinchona-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 87, 253–256.
- Autuori, M.J., 1979. Mean cytoplasmic protein concentration of host erythrocytes and the reticulocyte response in *Plasmodium berghei* infected mice. *Experientia* 35, 1579–1580.
- Barkan, D., Ginsburg, H., Golenser, J., 2000. Optimisation of flow cytometric measurement of parasitaemia in *Plasmodium*-infected mice. *Int. J. Parasitol.* 30, 649–653.
- Bianco, A.E., Battye, F.L., Brown, G.V., 1986. *Plasmodium falciparum*: rapid quantification of parasitemia in fixed malaria cultures by flow cytometry. *Exp. Parasitol.* 62, 275–282.
- Carvalho, L.H., Krettli, A.U., 1991. Antimalarial chemotherapy with natural products and chemically defined molecules. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 86, 181–184.
- Carvalho, L.H., Brandao, M.G., Santos-Filho, D., Lopes, J.L., Krettli, A.U., 1991. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied in vivo in *Plasmodium berghei*-infected mice and in vitro against *Plasmodium falciparum* in culture. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 24, 1113–1123.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C., 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802–805.
- Crabb, B.S., Triglia, T., Waterkeyn, J.G., Cowman, A.F., 1997. Stable transgene expression in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 90, 131–144.
- de Koning-Ward, T.F., Thomas, A.W., Waters, A.P., Janse, C.J., 1998. Stable expression of green fluorescent protein in blood and mosquito stages of *Plasmodium berghei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 97, 247–252.
- Desjardins, R.E., Canfield, C.J., Haynes, J.D., Chulay, J.D., 1979. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16, 710–718.
- Jacobberger, J.W., Horan, P.K., Hare, J.D., 1983. Analysis of malaria parasite-infected blood by flow cytometry. *Cytometry* 4, 228–237.
- Janse, C.J., Van Vianen, P.H., 1994. Flow cytometry in malaria detection. *Methods Cell. Biol.* 42, 295–318.
- Kocken, C.H., van der Wel, A.M., Dubbeld, M.A., Narum, D.L., van de Rijke, F.M., van Gemert, G.J., van der Linde, X., Bannister, L.H., Janse, C., Waters, A.P., Thomas, A.W., 1998. Precise timing of expression of a *Plasmodium falciparum*-derived transgene in *Plasmodium berghei* is a critical determinant of subsequent subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 273, 15119–15124.
- Krettli, A.U., Andrade-Neto, V.F., Brandao, M.G., Ferrari, W.M., 2001. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 1033–1042.
- Landau, I., Gautret, P., 1998. Animal models: rodents. In: Sherman, I.W., (Ed.), *Malaria, Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection*, ASM Press, Washington, DC, pp. 401–417.
- Makler, M.T., Lee, L.G., Recktenwald, D., 1987. Thiazole orange: a new dye for *Plasmodium* species analysis. *Cytometry* 8, 568–570.
- Payne, D., 1988. Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bull. World Health Organ.* 66, 621–626.

- Peters, W., 1999. The chemotherapy of rodent malaria. LVII. Drug combinations to impede the selection of drug resistance. Part 1. Which model is appropriate? *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 93, 569–587.
- Peters, W., Fleck, S.L., Robinson, B.L., Stewart, L.B., Jefford, C.W., 2002. The chemotherapy of rodent malaria. LX. The importance of formulation in evaluating the blood schizontocidal activity of some endoperoxide antimalarials. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 96, 559–573.
- Peters, W., Stewart, L.B., Robinson, B.L., 2003. The chemotherapy of rodent malaria. LXI. Drug combinations to impede the selection of drug resistance. Part 4: the potential role of 8-aminoquinolines. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 97, 221–236.
- Saito-Ito, A., Akai, Y., He, S., Kimura, M., Kawabata, M., 2001. A rapid, simple and sensitive flow cytometric system for detection of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Int.* 50, 249–257.
- Saul, A., Myler, P., Mangan, T., Kidson, C., 1982. *Plasmodium falciparum*: automated assay of erythrocyte invasion using flow cytofluorometry. *Exp. Parasitol.* 54, 64–71.
- Sultan, A.A., Thathy, V., Nussenzweig, V., Menard, R., 1999. Green fluorescent protein as a marker in *Plasmodium berghei* transformation. *Infect. Immun.* 67, 2602–2606.
- van Vianen, P.H., van Engen, A., Thaithong, S., van der Keur, M., Tanke, H.J., van der Kaay, H.J., Mons, B., Janse, C.J., 1993. Flow cytometric screening of blood samples for malaria parasites. *Cytometry* 14, 276–280.
- Warhurst, D.C., 2002. Resistance to antifolates in *Plasmodium falciparum*, the causative agent of tropical malaria. *Sci. Prog.* 85, 89–111.
- Whaun, J.M., Rittershaus, C., Ip, S.H., 1983. Rapid identification and detection of parasitized human red cells by automated flow cytometry. *Cytometry* 4, 117–122.
- WHO, 2000. WHO Expert Committee on Malaria. WHO Technical Report Series No. 892, World Health Organization, Geneva, p. 88.
- Wongsrichanalai, C., Pickard, A.L., Wernsdorfer, W.H., Meshnick, S.R., 2002. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect. Dis.* 2, 209–218.

Provided for non-commercial research and educational use only.
Not for reproduction or distribution or commercial use.



This article was originally published in a journal published by Elsevier, and the attached copy is provided by Elsevier for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for non-commercial research and educational use including without limitation use in instruction at your institution, sending it to specific colleagues that you know, and providing a copy to your institution's administrator.

All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are prohibited. For exceptions, permission may be sought for such use through Elsevier's permissions site at:

<http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial>



Note

Validation of a *Plasmodium falciparum* parasite transformed with green fluorescent protein for antimalarial drug screening

Bruno A.M. Sanchez, Fernando P. Varotti, Flávia G. Rodrigues, Luzia H. Carvalho *

Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, 30190 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Received 19 October 2006; received in revised form 7 March 2007; accepted 7 March 2007

Available online 15 March 2007

Abstract

Aiming to replace the radioisotopic assay, the widely used procedure for *in vitro* antimalarial drug screening, we set up a protocol using a *Plasmodium falciparum* strain transformed with the green fluorescent protein (PfGFP), which can be quickly and specifically quantified by flow cytometry. On the basis of a side-by-side comparison, this PfGFP-based method showed results similar to those obtained with the standard radioisotopic method.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Green fluorescent protein; *Plasmodium falciparum*; Chemotherapy; *In vitro*

Despite the campaign to 'Roll Back Malaria', initiated by the World Health Organization in 1998, the rates of disease and death caused by *Plasmodium falciparum* in sub-Saharan Africa are growing (Plowe, 2005). Rapid development of *P. falciparum* resistance to most available antimalarial drugs has been implicated as one of the main factors in this disturbing trend. Thus, there is a great need to find the optimal use of available drugs in combined therapies and to develop new antimalarial drugs to replace ones that are inefficient. High priority has also been given to new assays that facilitate and accelerate the research for novel antimalarial compounds.

The most widely used procedure to screen antimalarial drugs against *P. falciparum* *in vitro* is based on parasite uptake of a radiolabeled nucleic acid precursor, (H^3)-hypoxanthine (Desjardins et al., 1979). Unfortunately, this very sensitive protocol requires hazardous radioactive materials, which implies in special and strict regulations for the management and disposal of radioactive waste. Currently, numerous non-radioactive methods have been described,

most of them based on fluorimetric (Smeijsters et al., 1996; Corbett et al., 2004; Smilkstein et al., 2004) or colorimetric methods (Makler et al., 1993; Basco et al., 1995; Delhaes et al., 1999; Druilhe et al., 2001; Ncokazi and Egan, 2005; Noedl et al., 2005). The major disadvantage of fluorimetric protocols is due to the fact that those protocols require several steps in blood preparation such as parasite staining with a fluorophore and additional treatment to prevent quenching of fluorescence. Colorimetric methods, although sensitive, have the disadvantage of requiring the use of monoclonal antibodies, which are either expensive or not commercially available. Consequently, these protocols do not have widespread application in drug screening programs so far.

The development of transfection techniques for *Plasmodium* made it possible to express and subsequently use foreign genes as reporting in a variety of studies (Gubbels and Striepen, 2004). One of these reporter genes, the green fluorescent protein (GFP) from the bioluminescent jellyfish *Aequorea victoria*, is particularly attractive because it does not require additional cofactors or exogenous substrates for its activity and it is highly stable. Stable integrated expression of GFP has been reported in different *Plasmodium*, including the rodent malaria parasite *P. berghei* (Sultan et al., 1999), *P. yoelli* (Jongco et al., 2006), and human malaria *P. falciparum* (Kadekoppala et al., 2000). Since GFP-generated fluorescence can be easily and rapidly detected

* Corresponding author. Malaria Laboratory, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil. Tel.: +55 3133497793; fax: +55 3132953115.

E-mail address: lhcarvalho@cpqrr.fiocruz.br (L.H. Carvalho).

in a drop of parasite-infected blood without further treatment of the sample, the goal of the present work was to investigate the potential value of a *P. falciparum* parasite stable transfected with GFP (PfGFP) for drug screening programs. To accomplish this objective, we use a PfGFP strain (Kadekoppala et al., 2000) from the Malaria Research and Reference Reagent Resource Center (MR4).

The PfGFP parasite (PfHDGFP, MRA-317, MR4; ATCC, Manassas, VA, USA) was constructed from strain 3D7 by transfection with a chimeric molecule of human dihydrofolate reductase (DHFR) and green fluorescent protein (GFP) using the protocol described elsewhere (Kadekoppala et al., 2000). The GFP *P. falciparum* strain has been maintained in our laboratory in continuous culture, according to the methodology of the candle jar described by Jensen and Trager (1977), at 5% hematocrit using type O⁺ human erythrocytes in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 2 mM l-glutamine (Gibco), 25 mM HEPES (sigma-Aldrich), 40 µg/ml gentamycin, 10% of A⁺ or AB⁺ human plasmas (donated by blood banks), 25 mM NaHCO₃ under approximately 5% of CO₂.

In order to determine the potential of flow cytometry to specifically quantify parasite-infected erythrocytes, we first analyzed the *P. falciparum* growth in culture. Parasite cultures were synchronized by d-sorbitol (sigma-Aldrich) treatment (Lambros and Vanderberg, 1979), which select for ring-form parasites. After 24, 48 and 72 h, parasitemia of cultures was determined by microscopic determination (500–1000 erythro-

cytes per Giemsa-stained blood smears) and also by flow cytometry. Flow cytometric analyses were performed by diluting 3–5 µl of parasite culture in plain RPMI medium (without phenol red, Sigma-Aldrich) — approximately 1×10^6 erythrocytes/ml. The samples were acquired by a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson) with a 488 nm argon laser. Erythrocytes were identified on the basis of their specific forward (FSC) and side (SSC) light-scattering properties and a total of 50,000 events were counted for each sample (triplicates). For the discrimination between parasitized and non-parasitized erythrocytes, we analyzed 20 independent uninfected blood cultures by flow cytometry. The results showed a positive threshold of 0.3% established by the average between the samples plus two standard deviations (Fig. 1-A). Fig. 1-C illustrates two different experiments which demonstrate a direct correlation between flow-cytometric and microscopic determination. Of importance, the range of parasitemia used for these experiments was equivalent to the levels encountered through and beyond a standard *in vitro* antimalarial drug screening. These results also confirm that all RBC parasite-stages were expressing the green fusion protein (Kadekoppala et al., 2000), which making the quantification of parasite remarkably specific (Fig. 1-B).

To validate PfGFP model for *in vitro* drug screening, we compare our protocol with the conventional uptake of (H³)-hypoxanthine (Desjardins et al., 1979), analyzing dose–response curves for some of the major commercial antimalarial

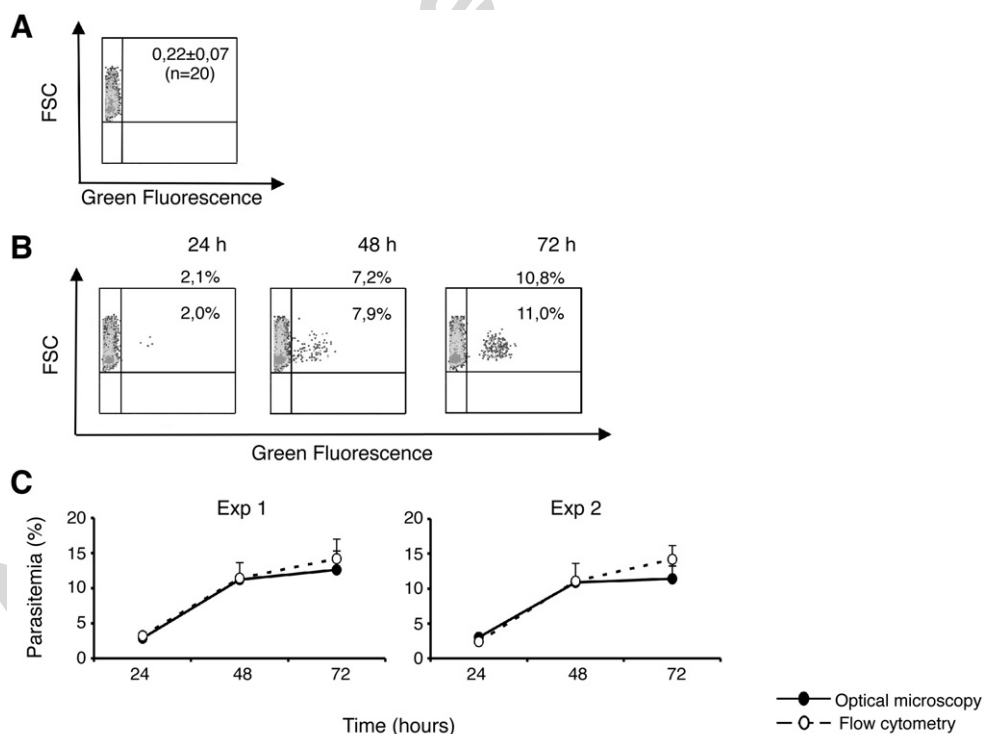


Fig. 1. Comparison between *P. falciparum* growth by flow cytometry and optical microscopy. (A) Flow cytometry analysis of uninfected erythrocytes, being the average of nonspecific reading expressed into the right upper quadrant as mean \pm standard deviation (SD) of green fluorescence. (B) Illustrate flow cytometry analysis of one culture infected with PfGFP over a period of 72 h. For each dot–blot, the number inside of the right upper quadrant represents the percentage of fluorescent erythrocytes, and the numbers on the top the percentage of infected erythrocytes determined by microscopic counting. (C) Each graphic represents the results of two different experiments, in which parasitemia of initial cultures was 1% (Exp. 1) or 1.5% (Exp. 2). Results are expressed as mean \pm SD of three individual cultures.

drugs used to treat *P. falciparum* – quinine dihydrochloride, sodium artesunate, mefloquine hydrochloride – which were gently provided by Dr. CJF Fontes (Federal University of Mato Grosso, MT, Brazil). Stock solution of the antimalarial drugs was prepared at a concentration of 20 mM (artesunate in water, all other drugs in DMSO), serially diluted in complete medium, and dispensed into triplicate test wells (25 μ l/well) to yield final concentrations recommended to *P. falciparum* drug sensitivity assays (WHO, 2001). The erythrocyte suspensions with ring-stage synchronized parasites were distributed into each of the 96-well plate at 1% parasitemia and 2% hematocrit (175 μ l/well). Plates were incubated at 37 °C under approximately 5% CO₂, being medium, with or without drugs (DMSO controls), individually replaced at 24–48 h.

For the standard radioisotopic method, after the first 24 h of plate incubation, (H³)-hypoxanthine (Sigma-Aldrich) was added to each well (1 μ Ci/well), and plates were incubated for another 18 h. Cells were harvested onto glass-fiber filters (Perkin Elmer) with a cell harvester (Harvester 96 — Skatron Instruments) and incorporated radioactivity was determined by a liquid scintillation counter (MicroBeta Reader — Wallac-Perkin Elmer). For fluorescence assays, parasite growth was detected at 72 h, by reading the green fluorescence from the cultures by the FACScalibur, as described above. For each method, fifty percent inhibitory concentrations (IC₅₀s) of the antimalarial drugs were calculated from dose–response curves by using the best sigmoid fits obtained with the program Origin (Microcal Software Inc.). The results demonstrated that this PfGFP-based fluorescence assay was in agreement with that of the (H³)-hypoxanthine assay. Fig. 2 shows the similarities

between the dose–responses curves determined by both methods, being no significant difference obtained between IC₅₀s of each drug tested, as determined by using two-way analysis of variance ($P > 0.05$ for each comparison).

Because our research group has been conducting experimental antimalarial chemotherapy programs for many years (Carvalho et al., 1991; Andrade-Neto et al., 2003; de Andrade-Neto et al., 2004; Cunico et al., 2006), we are familiarized with the routine use of the (H³)-hypoxanthine method. We are in accordance with other groups (Chulay et al., 1983; Elabbadi et al., 1992) with the fact that several culture parameters should be carefully controlled to guarantee that hypoxanthine incorporation is proportional to the number of parasitized erythrocytes. Beyond these limitations, which include initial parasitemia, concentration of uninfected erythrocytes and presence of a variety of purines in the culture medium, the purchase/importation of radioactive reagents is also a hard-task in developing countries. On the basis of a side-by-side comparison, the results suggest that the PfGFP-method will be of interest, especially because it is specific (parasite fluorescent itself), does not require radioactive reagents, and it is not a multistep method, unlike other fluorimetric protocols. Additional savings result from this PfGFP parasite is a quality controlled malaria-related reagents that is available without cost to the malaria research community, including free-shipping to endemic countries (MR4, <http://www.malaria.atcc.org>). Of interest, this GFP-based method can be adapted to be processed in a fluorimeter 96-well plate reader, being suitable for high-throughput, semi-automated or automated techniques.

The fact that the PfGFP strain has a mutated form of the human *DHFR* gene (which confers resistance to the

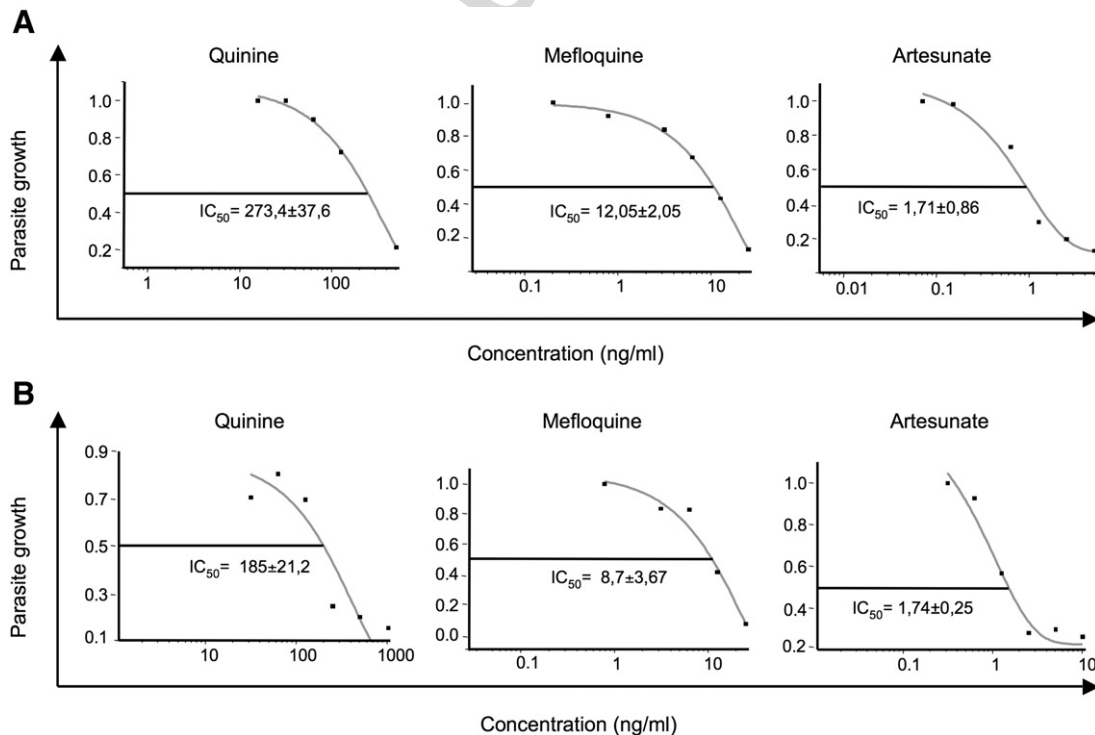


Fig. 2. Dose–response curves of quinine, mefloquine and artesunate on PfGFP parasitized erythrocytes as determinate by flow cytometry (A) or [³H]-hypoxanthine incorporation (B). Fifty percent inhibitory concentration (IC₅₀) values are mean ± standard deviation of two to four independent experiments.

conventional DHFR-inhibitors) does limit its use for screening antifolate drugs that target uniquely this parasite enzyme, that in *Plasmodium* is a bifunctional enzyme named dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS). However, it made PfGFP strain a suitable model to search for alternative drugs to treat DHFR-resistant *P. falciparum* strains, which are now spreading in different endemic areas of the World, including Africa (Wongsrichanalai et al., 2002; Taylor et al., 2003). Of importance in this parasite folate metabolism pathway is the evidence that proguanil (the cycloguanil precursor) itself acts on a target separate from parasite DHFR (Fidock and Wellem, 1997; Fidock et al., 1998). These findings help to explain why the proguanil/atovaquone can be an efficient therapeutic tool even in regions where poor cycloguanil-metabolizers are frequent or where resistance to cycloguanil already exists. Consequently, this GFP parasite could be useful to discover alternative antifolate drugs whose activity should be DHFR-independent.

Finally, we have been maintaining PfGFP parasite in continuous culture for more than 1 year without any modification on fluorescence profile, which validates application of this transfected parasite for chemotherapy studies. Recently, we also validate an *in vivo* method for screening blood schizontocidal by using the rodent-parasite *P. berghei* transformed with GFP (Sanchez et al., 2004). Apart from drugs which target the parasite DHFR-TS, those GFP parasites should prove to be a sensitive tool for *in vitro* and *in vivo* examination of the large number of compounds and conditions involved in the initial stages of drug development. Also, towards widespread application of the GFP methodology on antimalarial drug programs, we hope that the results described here will stimulate the construction of different *P. falciparum* GFP parasites, carrying the knowing genetic mutations which are responsible to alter susceptibility to diverse class of antimalarial drugs.

Acknowledgements

We thank MR4 for providing us with the GFP parasite, *P. falciparum* (PfHDGFP, MRA-317), contributed by K. Haldar, and H. Marinuzzi Carvalho for reviewing the manuscript; A. U. Krettli for encouragement. LHC receives a Research fellowship from CNPq (Brazil) and BAMS is a fellow from CNPq.

References

- Andrade-Neto, V.F., Brandao, M.G., Stehmann, J.R., Oliveira, L.A., Krettli, A.U., 2003. Antimalarial activity of Cinchona-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 87, 253–256.
- Basco, L.K., Marquet, F., Makler, M.M., Le Bras, J., 1995. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*: lactate dehydrogenase activity and its application for *in vitro* drug susceptibility assay. *Exp. Parasitol.* 80, 260–271.
- Carvalho, L.H., Brandao, M.G., Santos-Filho, D., Lopes, J.L., Krettli, A.U., 1991. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied *in vivo* in *Plasmodium berghei*-infected mice and *in vitro* against *Plasmodium falciparum* in culture. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 24, 1113–1123.
- Chulay, J.D., Haynes, J.D., Diggs, C.L., 1983. *Plasmodium falciparum*: assessment of *in vitro* growth by [³H]hypoxanthine incorporation. *Exp. Parasitol.* 55, 138–146.
- Corbett, Y., Herrera, L., Gonzalez, J., Cubilla, L., Capson, T.L., Coley, P.D., Kursar, T.A., Romero, L.I., Ortega-Barria, E., 2004. A novel DNA-based microfluorimetric method to evaluate antimalarial drug activity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70, 119–124.
- Cunico, W., Cechinel, C.A., Bonacorso, H.G., Martins, M.A., Zanatta, N., de Souza, M.V., Freitas, I.O., Soares, R.P., Krettli, A.U., 2006. Antimalarial activity of 4-(5-trifluoromethyl-1H-pyrazol-1-yl)-chloroquine analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 649–653.
- de Andrade-Neto, V.F., Goulart, M.O., da Silva Filho, J.F., da Silva, M.J., Pinto Mdo, C., Pinto, A.V., Zalis, M.G., Carvalho, L.H., Krettli, A.U., 2004. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, beta-lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* *in vitro* and *Plasmodium berghei* *in vivo*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 1145–1149.
- Delhaes, L., Lazaro, J.E., Gay, F., Thellier, M., Danis, M., 1999. The microculture tetrazolium assay (MTA): another colorimetric method of testing *Plasmodium falciparum* chemosensitivity. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 93, 31–40.
- Desjardins, R.E., Canfield, C.J., Haynes, J.D., Chulay, J.D., 1979. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16, 710–718.
- Druilhe, P., Moreno, A., Blanc, C., Brasseur, P.H., Jacquier, P., 2001. A colorimetric *in vitro* drug sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64, 233–241.
- Elabbadi, N., Ancelin, M.L., Vial, H.J., 1992. Use of radioactive ethanolamine incorporation into phospholipids to assess *in vitro* antimalarial activity by the semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 50–55.
- Fidock, D.A., Wellem, T.E., 1997. Transformation with human dihydrofolate reductase renders malaria parasites insensitive to WR99210 but does not affect the intrinsic activity of proguanil. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 10931–10936.
- Fidock, D.A., Nomura, T., Wellem, T.E., 1998. Cycloguanil and its parent compound proguanil demonstrate distinct activities against *Plasmodium falciparum* malaria parasites transformed with human dihydrofolate reductase. *Mol. Pharmacol.* 54, 1140–1147.
- Gubbels, M.J., Striepen, B., 2004. Studying the cell biology of apicomplexan parasites using fluorescent proteins. *Microsc. Microanal.* 10, 568–579.
- Jensen, J.B., Trager, W., 1977. *Plasmodium falciparum* in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. *J. Parasitol.* 63, 883–886.
- Jongco, A.M., Ting, L.M., Thathy, V., Mota, M.M., Kim, K., 2006. Improved transfection and new selectable markers for the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 146, 242–250.
- Kadekoppala, M., Kline, K., Akompong, T., Haldar, K., 2000. Stable expression of a new chimeric fluorescent reporter in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.* 68, 2328–2332.
- Lambros, C., Vanderberg, J.P., 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J. Parasitol.* 65, 418–420.
- Makler, M.T., Ries, J.M., Williams, J.A., Bancroft, J.E., Piper, R.C., Gibbins, B.L., Hinrichs, D.J., 1993. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48, 739–741.
- Ncokazi, K.K., Egan, T.J., 2005. A colorimetric high-throughput beta-hematin inhibition screening assay for use in the search for antimalarial compounds. *Anal. Biochem.* 338, 306–319.
- Noedl, H., Bronnert, J., Yingyuen, K., Attlmayr, B., Kollaritsch, H., Fukuda, M., 2005. Simple histidine-rich protein 2 double-site sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for use in malaria drug sensitivity testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 3575–3577.
- Plowe, C.V., 2005. Antimalarial drug resistance in Africa: strategies for monitoring and deterrence. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 295, 55–79.
- Sanchez, B.A., Mota, M.M., Sultan, A.A., Carvalho, L.H., 2004. *Plasmodium berghei* parasite transformed with green fluorescent protein for screening blood schizontocidal agents. *Int. J. Parasitol.* 34, 485–490.
- Smeijsters, L.J., Zijlstra, N.M., Franssen, F.F., Overdulve, J.P., 1996. Simple, fast, and accurate fluorometric method to determine drug susceptibility of *Plasmodium falciparum* in 24-well suspension cultures. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 835–838.
- Smilkstein, M., Sriwilaijaroen, N., Kelly, J.X., Wilairat, P., Riscoe, M., 2004. Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput

- antimalarial drug screening. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1803–1806.
- Sultan, A.A., Thathy, V., Nussenzweig, V., Menard, R., 1999. Green fluorescent protein as a marker in *Plasmodium berghei* transformation. *Infect. Immun.* 67, 2602–2606.
- Taylor, W.R., Rigal, J., Olliaro, P.L., 2003. Drug resistant falciparum malaria and the use of artesunate-based combinations: focus on clinical trials sponsored by TDR. *J. Vector Borne Dis.* 40, 65–72.
- Wongsrichanalai, C., Pickard, A.L., Wernsdorfer, W.H., Meshnick, S.R., 2002. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet. Infect. Dis.* 2, 209–218.
- WHO, 2001. In vitro micro-test (mark III) for the assessment of the response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, mefloquine, quinine, amodiaquine, sulfadoxine/pyrimethamine and artemisinin. CTD/MAL/97.20 Rev. 2 2001.

Author's personal copy