

ACÇÃO, "IN VITRO", DA VIOLETA DE GENCIANA SOBRE FORMAS EVOLUTIVAS DO PLASMODIUM FALCIPARUM

Shen Lin YANG (1), Sílvia Maria DI SANTI (2), Vicente AMATO NETO (1), Antonio Augusto Baillet MOREIRA (1), Pedro Luiz Silva PINTO (1), Marcos BOULOS (3), Rubens CAMPOS (1), Eunice José de SANT'ANA (1) & Mario SHIROMA (3)

RESUMO

Utilizando a técnica de RIECKMANN e col.⁵, os autores realizaram 20 microtestes de sensibilidade, procurando verificar a capacidade da violeta de genciana em impedir, na cultura "in vitro", o desenvolvimento habitual do *Plasmodium falciparum*. Os resultados mostraram que houve inibição da evolução do protozoário nas concentrações de 1/1 000, 1/1 500, 1/2 000, 1/2 500, 1/3 000 e 1/4 000, significando que nas condições da experiência o corante atuou sobre as formas sangüíneas assexuadas do protozoário. Estas verificações sugerem que a violeta de genciana poderia ser usada na profilaxia da malária transfusional.

UNITERMOS: *Plasmodium falciparum*; Violeta de genciana - acção "in vitro"; Malária transfusional-profilaxia.

INTRODUÇÃO

Entre as preocupações inerentes à hemoterapia, a possibilidade de transmissão de infecções pelo sangue e seus derivados tem merecido considerações diversas. No âmbito das doenças parasitárias, a doença de Chagas e a malária exigem cuidados especiais buscando impedir sejam elas veiculadas pelo sangue a outra pessoa.

Quanto às condutas recomendadas com o objetivo exposto, são também cogitáveis aquelas em que se torna interessante o aproveitamento do sangue, mesmo que suspeito de conter agentes causadores de doença, principalmente em regiões onde não se dispõe de estrutura para imunodiagnóstico. Assim, o emprego de drogas que inativem elementos parasitários constitue

tática aceitável afim de impedir a transmissão transfusional da infecção.

Em estudo anterior, AMATO NETO e col.¹ mostram que a violeta de genciana, adicionada ao sangue, opõe-se efetivamente à acção do *Plasmodium berghei*, em malária experimental de roedores. Diante dessa constatação, pareceu-nos pertinente verificar a capacidade desse corante inibir o desenvolvimento de formas assexuadas do *P. falciparum* através de técnicas "in vitro" padronizadas por RIECKMANN e col.⁵.

MATERIAL E MÉTODOS

Realizamos 20 microtestes de sensibilidade à violeta de genciana, "in vitro", utilizando san-

Laboratório de Investigação Médica Parasitologia do Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Av. Dr. Arnaldo, 455. CEP 01246 São Paulo, SP., Brasil.

(1) Laboratório de Investigação Médica Parasitologia.

(2) Superintendência do Controle de Endemias (SUCEN), da Secretaria de Estado da Saúde, de São Paulo.

(3) Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

gue de 20 pacientes com diagnóstico laboratorial de malária causada por *P. falciparum* e parasitemia mínima de 5 000 formas assexuadas por milímetro cúbico. Na triagem dos doentes, excluimos todos aqueles medicados pregressamente, levando em conta a normatização da Organização Mundial da Saúde, que exclui dos estudos com drogas os tratados com 4-aminoquinoleínas ou sulfamídicos e suas associações, em períodos iguais ou inferiores a 14 ou 28 dias, respectivamente³.

O método utilizado foi o preconizado por RIECKMANN e col.⁵, com modificações (hemácias lavadas, meio de cultura com soro e hematócrito de 5%) que, em nossa experiência permite melhor desenvolvimento de esquizontes. Diluímos a violeta de genciana em solução glicosada no meio de cultura RPMI 1 640 ("Flow Laboratories"), suplementada com "Hepes" (6 mg/ml), glicose (2 mg/ml); gentamicina (40 µg/ml), bicarbonato de sódio (2 mg/ml), hipoxantina (50 µg/ml) e soro humano de paciente com tipo A ou AB, Rh positivo, adicionar a 10%. Assim, obtivemos concentrações que variaram de 1/1 a 1/4 000, conforme está especificado na Tabela I. Lavamos o sangue infectado, colhido em seringa heparinizada, duas vezes com RPMI 1 640 mais bicarbonato, para remoção do plasma e dos glóbulos brancos e, em seguida, diluímos para um hematócrito de 10% em RPMI 1 640 completo, com as várias diluições de violeta de genciana. Incubamos o material em microplacas de fundo chato, a 37°C e em atmosfera de 5% de CO₂, de acordo com técnica de cultivo, "in vitro" de *P. falciparum*. O período de incubação variou de 24 a 36 horas. Todos os testes incluíram controles sem a droga em estudo. O parâmetro para verificação da eficácia, em cada caso, correspondeu à comparação entre os crescimentos da cepa, e do controle, em diferentes diluições. Para a perfeita visualização, identificação e contagem das formas evolutivas preparamos gotas espessas, coradas pelo método de Giemsa.

RESULTADOS

Os resultados dos 20 testes realizados, da ação da violeta de genciana sobre esquizontes sangüíneos de *P. falciparum* provenientes de 20 pacientes diferentes, estão mostrados na tabela I.

TABELA I
Ação da violeta de genciana sobre formas evolutivas do *Plasmodium falciparum*. Estudo "in vitro" (RIECKMANN e col.⁵) em 20 amostras distintas

Número do teste	Número de esquizontes no controle*	Número de esquizontes em presença da violeta de genciana (concentrações de 1/1 000 até 1/4 000)
1.	53	0
2	50	0
3	80	0
4	128	0
5	109	0
6	121	0
7	52	0
8	113	0
9	75	0
10	79	0
11	55	0
12	79	0
13	42	0
14	26	0
15	78	0
16	35	0
17	123	0
18	24	0
19	35	0
20	102	0

* A identificação morfológica de 200 parasitas, registro de quantos já haviam evoluído para esquizonte.

Como vemos, não houve desenvolvimento de esquizontes em qualquer diluição. À microscopia observou-se apenas "pontos", provavelmente núcleos de parasitas degenerados.

DISCUSSÃO

A malária é doença autolimitada. Depois de número variável de anos, estimado de um a um e meio para o *P. falciparum*, dois a três para o *P. vivax* e três ou quatro para o *P. malariae*, extingue-se a atividade reprodutora do parasita e, com ela, a infecção.

Apesar disso, existem referências de transmissão do *P. falciparum* e *P. vivax* até 8 anos após a história da infecção ou de o doador ter se afastado de região endêmica, e do *P. malariae* até 47 anos após a possível infecção².

Estes dados têm causado preocupação nos vários Serviços de Hemoterapia, havendo diferentes condutas no intuito de afastar o doador com possibilidade infectiva para a malária^{2, 4}.

Na França, BRUCE-CHWATT², após análise sorológica de portadores potenciais de *Plasmodium*, sugere a não utilização de doadores com história de infecção nos últimos 5 anos ou ter provindo de região malarígena neste mesmo período.

Nos Estados Unidos, objetivando utilizar a maior quantidade de sangue infectado não existe tal rigidez na seleção, porém a maioria dos Serviços, utiliza teste sorológico na triagem de doadores⁴.

Em região endêmica, no entanto, onde pela precariedade de condições não existe possibilidade de triagem dos doadores, sugere-se que sejam utilizados como doadores indivíduos afebris com parasitológico direto negativo, podendo ainda o receptor ser medicado com anti-maláricos⁷.

Obviamente que a possibilidade de adição no sangue de substâncias com ação anti-plasmódio e sem toxicidade seria de grande valia para bloquear a transmissão da malária através do sangue, principalmente em região endêmica.

Convém ressaltar que a violeta de genciana empregada neste trabalho como parasiticida na diluição de 1/4 000 é praticamente atóxica.

Partindo do fato de ser conhecida a ação da violeta de genciana contra *T. cruzi*, testamos sua ação contra *Plasmodium falciparum*.

A experimentação em animais, com modelo experimental *P. berghei* camundongo, mostrou ser a violeta de genciana eficaz no clareamento do parasita no sangue. É verdade, todavia, que nem sempre pode-se transferir para o homem os resultados obtidos em roedores, apesar destes poderem sugerir o caminho a ser seguido.

Com o desenvolvimento de técnica de cultivo do *P. falciparum* "in vitro", houve a possibilidade de averiguar a atividade da violeta de genciana contra tal plasmódio, que é aquele que pode causar doença de evolução mais tormentosa.

Com o microteste de RIECKMANN e col.⁵ admitimos ser factível observar a atuação do corante na evolução normal, "in vitro", do proto-

zoário. Enquanto no controle o parasita evolui com todas as suas formas morfológicas, expressas por trofozoito jovem, trofozoito maduro e esquizonte, no microteste com violeta de genciana, se ela for eficiente, o desenvolvimento estará interrompido.

Na experimentação que empreendemos, com o material, método e parâmetro de controle escolhidos, apuramos que a violeta de genciana inibiu a evolução do *P. falciparum*, em todas as diluições, de forma semelhante à que tem lugar na prevenção da transmissão da doença de Chagas por transfusão de sangue. Podemos, até mesmo, a partir dessas constatações, empregar quantidades menores de violeta de genciana procurando detectar a mínima necessária para inibir o desenvolvimento do *P. falciparum*.

Julgamos que os resultados obtidos animam no prosseguimento dos estudos, inclusive em humanos, visando acrescentar novos subsídios objetivando a profilaxia da malária induzida em Serviços de Hemoterapia.

SUMMARY

"In vitro" activity of gentian violet against asexual *Plasmodium falciparum* parasites

In order to investigate whether gentian violet exhibited "in vitro" inhibitory activity against *Plasmodium falciparum*, the Authors have carried out 20 sensitivity tests according to the microtechnique described by RIECKMANN et al.⁵. Results have shown inhibition of schizonts' maturation at the following concentration: 1/1 000; 1/1 500; 1/2 000; 1/2 500; 1/3 000 and 1/4 000, thus demonstrating inhibitory activity of the tested dye against asexual blood parasites. The present data suggest gentian violet may be possibly used in the prophylaxis of transfusion-acquired malaria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMATO NETO, V.; SANT'ANA, E. J.; PINTO, P. L. S.; MOREIRA, A. A. B.; DUARTE, M. I. S. & CAMPOS, R. — Estudo experimental sobre a possibilidade de prevenção da malária pós-transfusional, através do uso de violeta de genciana. *Rev. Saúde públ. (S. Paulo)*, (No prelo).
2. BRUCE-CHWATT, L. J. — Transfusion malaria revisited. *Trop. Dis. Bull.*, 79: 827-840, 1982.

YANG, S. L.; DI SANTI, S. M.; AMATO NETO, V.; MOREIRA, A. A. B.; PINTO, P. L. S.; BOULOS, M.; CAMPOS, R.; SANT'ANA, E. J. de & SHIROMA, M. — Ação "in vitro", da violeta de genciana sobre formas evolutivas do *Plasmodium falciparum*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 30 (1): 17-20, 1988.

3. BRUCE-CHWATT, L. J.; BLACK, R. H.; CANFIELD, C. J.; CLYDE, D. F.; PETERS, W. & WERNSDORFER, W. H. — *Quimioterapia del paludismo*. 2ª edición. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1982.
4. GUERRERO, I. C.; WENIGER, B. C. & SCHULTZ, M. G. — Transfusion malaria in the United States, 1972-1981. *Ann. intern. Med.*, 99: 221-226, 1982.
5. RIECKMANN, K. H.; CAMPBELL, G. H.; SAX, L. J. & UREMA, J. E. — Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An in-vitro microtechnique. *Lancet*, 1: 22-23, 1978.
6. TRAGER, W. & JENSEN, J. B. — Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193: 673-675, 1976.
7. W. H. O. — Severe and complicated malaria. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 80 (suppl.): 1-50, 1986.

Recebido para publicação em 03/08/1987.