

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

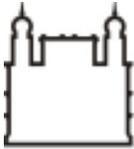
**Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina**  
**Investigativa**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE NOVOS DERIVADOS**  
**QUINOLÍNICOS**

**CLARISSA CUNHA SANTANA**

**Salvador – Bahia – Brasil**  
**2015**



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

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

**Avaliação de atividade antimalárica de novos derivados quinolínicos**

**CLARISSA CUNHA SANTANA**

Orientador: Dr. Marcos André Vannier dos Santos  
Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Patrícia Sampaio Tavares Veras

Dissertação submetida à coordenação do curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de Mestre.

**Salvador – Bahia – Brasil**

**2015**

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

Santana, Clarissa Cunha  
S232a Avaliação da atividade antimalárica de novos derivados quinolínicos / Clarissa  
Cunha Santana. - 2015.  
69 f.; 30 cm

Orientador: Dr. Marcos André Vannier dos Santos, Laboratório de Biologia  
Parasitária. Co-orientadora: Dra. Patricia Sampaio Tavares Veras, Laboratório de  
Patologia e Biointervenção.

**Dissertação ( Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina  
Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz.  
Pós-Graduação, 2015.**

1. Malária. 2. Plasmodium falciparum. 3. Estresse Oxidativo. 4. Hemozina. 5.  
Quinolínicos. 6. Autofagia . I.Título.

CDU 616.936-08

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

FAPESB

CNPq

FIOCRUZ

“AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE NOVOS DERIVADOS QUINOLÍNICOS”

CLARISSA CUNHA SANTANA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



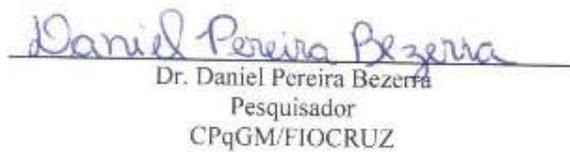
---

Dr. Eudes da Silva Velozo  
Professor Associado IV  
UFBA



---

Dra. Cristiane Flora Villarreal  
Pesquisadora Colaboradora  
CPqGM/FIOCRUZ



---

Dr. Daniel Pereira Bezerra  
Pesquisador  
CPqGM/FIOCRUZ

Dedico este trabalho à minha família, meu alicerce e meu apoio e ao meu Deus, minha  
luz e salvação!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus**, por me guiar e fortalecer durante este período de aprendizado e não me deixar esmorecer, mesmo nos momentos em que achei que nada daria certo.

Aos **meus pais**, Mariza e Carlos, por terem me dado todo o apoio possível, me ensinado a dar valor às oportunidades e principalmente a valorizar e respeitar a vida. Amo muito vocês!

Aos **meus irmãos**, Cleiton e Charles, que apesar de serem bem chatos (risos), sempre estiveram comigo me apoiando.

A **Otávio** que de repente passou a ser tão especial se mostrando um verdadeiro incentivador e acolhedor, sempre acreditando na minha capacidade. Eu te amo!

Ao **Dr. Marcos Vannier** pela orientação, pelas contribuições e pelo incentivo.

A **Dr. Patrícia Veras** pela coorientação.

Ao **Dr. Carlos Gustavo** pelas valiosas contribuições, pelas conversas na bancada e horário de almoço que tanto contribuíram para este trabalho.

Ao **Dr. Alberto Dutra** pelas valiosas conversas científicas.

A **Taís, Eliete e Marcos**, pessoal da malária! Por compartilharem comigo o desespero, me auxiliaram em momentos essenciais e estarem juntos comigo até o último segundo me incentivando e ajudando. Sou muito grata e sem vocês nada aconteceria. Esse trabalho é nosso!

Aos meus colegas do **LETI** que me receberam na minha chegada ao CPqGM, em especial a **Cássio, Kelly e Nana** pelas valiosas conversas, risadas e ajuda nos momentos em que mais precisei. Obrigada!

A **Jacqueline**, que com sua inteligência e curiosidade tanto me ajudou na realização deste projeto, sempre solícita e preocupada agindo como em seu próprio projeto.

A **Ciro** pelos loucos momentos experimentais e de discussão, pela imensa ajuda nesta trajetória e por todas as risadas juntos.

A **Mayra**, pessoa maravilhosa que conheci como consequência deste trabalho.

Aos todos os **meus amigos**, que sempre torceram por mim, mesmo alguns deles não entendendo nada do meu trabalho!

Aos meus colegas do **LBP** que dividiram comigo estes últimos anos.

A **Aline e Layane** pela imensa ajuda técnica no dia a dia de rotina laboratorial.

A **Carla e Eládio** pelos trabalhos administrativos do laboratório.

Ao **Seminário Laveran; Deane** pelas valiosas contribuições ao projeto.

À **Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna** e seus funcionários pelo suporte literário e contribuição à formatação final do trabalho.

Aos **plasmódios!** Por exercitarem minha paciência, me fazerem compreender que nada acontece como planejamos e por me fazerem sofrer até o último minuto desta dissertação.

As agências financiadoras do projeto **FAPESB, CNPq e FIOCRUZ.**

SANTANA, Clarissa Cunha. **Avaliação da atividade antimalárica de novos derivados quinolínicos**. 69 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, Brasil, 2015.

## RESUMO

A malária é uma doença causada por cinco espécies de parasitos do gênero *Plasmodium* que causa anualmente a morte de milhares de pessoas, principalmente em países pobres da África. Muito antiga, uma diversidade de fármacos já foram empregados na tentativa de erradicação da doença, entretanto o aparecimento de cepas resistentes, bem como efeitos adversos gerados pelo tratamento impossibilitou tal ação. Os quinolínicos configuram uma grande parte destes tratamentos, apresentando uma notável atividade antimalárica. Neste trabalho nós avaliamos o potencial antimalárico de três novos derivados quinolínicos BS 260, BS 318 e BS 373 em culturas de *Plasmodium falciparum*, cepa w2, cloroquina resistente. BS 373 apresentou melhor atividade contra culturas de *Plasmodium falciparum* e, assim como o BS 318, foi capaz de inibir a biocristalização de hemozoína pelos parasitos. A microscopia eletrônica de transmissão revelou uma desorganização celular, diminuição do tamanho e quantidade de cristais de hemozoína no vacúolo digestivo, bem como vacuolizações citoplasmáticas e presença de estruturas membranares no vacúolo digestivo, o que indica a ocorrência de um processo autofágico nas células tratadas com 10  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$  do BS 373. A presença de cristais citoplasmáticos indica a ocorrência de autólise pela ruptura da membrana do vacúolo digestivo. Por fim, o efeito dos tratamentos se mostrou irreversível nos parasitos com 24 horas de tratamento para BS 318 e BS 373, enquanto que para BS 260 essa irreversibilidade só foi observada após 48 horas. Nossos dados mostram que os derivados quinolínicos testados são efetivos contra culturas de *P. falciparum*, configurando bons candidatos à novas moléculas antimaláricas.

**Palavras-chave:** Malária, *Plasmodium falciparum*, Estresse oxidativo, Hemozoína, Quinolínicos, Autofagia.

SANTANA, Clarissa Cunha. **Evaluation of the antimalarial activity of new quinoline derivatives**. 69 f. il. Dissertation (Master) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

### ABSTRACT

Malaria is a disease caused by five *Plasmodium* species that cause deaths of thousands of people annually, mostly in poor countries of Africa. Very ancient, a variety of drugs have been used in an attempt to eradicate the disease, however the emergence of resistant strains, as well as adverse effects caused by treatment prevented such action. The quinoline are a large part of these treatments, presenting a remarkable antimalarial activity. In this paper we evaluate the antimalarial potential of three new quinoline derivative BS 260, BS 318 and BS 373 in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistant, w2 strain, cultures. BS 373 showed the best activity against *Plasmodium falciparum* cultures, while and analogously to BS 318 was able to inhibit the hemozoin formation by parasites. The transmission electron microscopy revealed a cell disorganization, decreased size and amount of hemozoin crystals in the digestive vacuole, cytoplasmic vacuolization and presence of membrane structures in the digestive vacuole, which indicates an autophagic process in cells treated with 10  $\mu$ M and 20  $\mu$ M BS 373. Cytoplasmic being crystals indicate parasite cell autolysis caused by digestive vacuole membrane rupture. Finally, the effect of treatment proved irreversible on parasites at 24 hours of treatment for BS 318 and BS 373, whereas for BS 260 this irreversibility was only observed after 48 hours. Our data show that the quinoline derivatives tested are effective against *P. falciparum* cultures, setting good candidates for new antimalarial molecules.

**Keywords:** *Plasmodium falciparum*, hemozoin, oxidative stress, quinolinic, autophagy.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 01.</b> Transmissão da malária ao redor do mundo para o ano de 2013 -----	15
<b>Figura 02.</b> Distribuição de risco de infecção por malária no Brasil -----	16
<b>Figura 03.</b> Distribuição global de vetores efetivos ou potenciais da malária -----	18
<b>Figura 04.</b> Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> sp. -----	20
<b>Quadro 01.</b> Características de infecção das 5 espécies de Plasmódio -----	21
<b>Figura 05.</b> Estrutura dos principais antimaláricos quinolínicos -----	25
<b>Tabela 01.</b> Introdução e registro de resistência de alguns antimaláricos -----	29
<b>Figura 06.</b> Estrutura química dos novos derivados quinolínicos -----	31
<b>Figura 07.</b> Determinação das IC <sub>50</sub> em culturas de <i>Plasmodium falciparum</i> -----	36
<b>Tabela 2.</b> Atividade antimalárica dos novos derivados quinolínicos -----	37
<b>Figura 08.</b> Atividade hemolítica dos compostos quinolínicos -----	38
<b>Figura 09.</b> Determinação das CC <sub>50</sub> em esplenócitos murinos -----	39
<b>Tabela 3.</b> Índices de seletividade dos derivados quinolínicos -----	40
<b>Figura 10.</b> Efeito dos derivados sobre a formação da $\beta$ -hematina <i>in vitro</i> -----	41
<b>Figura 11.</b> Efeito dos derivados sobre a formação da hemozoína nos parasitos ---	42
<b>Figura 12.</b> Reversibilidade do efeito das substâncias -----	43
<b>Figura 15.</b> Microscopia eletrônica de transmissão controle negativo -----	45
<b>Figura 16.</b> Microscopia eletrônica de transmissão 10 $\mu$ M do quinolínico 373 -----	46
<b>Figura 17.</b> Microscopia eletrônica de transmissão 20 $\mu$ M do quinolínico 373 -----	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT – Terapia à base de Artemisinina

CCCP – Cianeto de carbonila m-clorofenil-hidrazona

CC<sub>50</sub> – Concentração Citotóxica que inibe 50% do crescimento celular

CDC – Centers for Disease Control and Prevention

CQ – Cloroquina

DMSO – Dimetilsulfóxido

*Hrp* I – Histidine rich protein I (proteína rica em histidina)

IC<sub>50</sub> – Concentração Inibitória para 50% do crescimento parasitário

IS – Índice de Seletividade

MDR – Multi-droga resistência

MS – Ministério da saúde

PBS – Tampão Fosfato Salina

OMS – Organização Mundial da Saúde

RPMI – Meio para cultura RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SISNAN NET– Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SIVEP – Sistema de Vigilância Epidemiológica

SVS – Secretaria de Vigilância Sanitária

VD – Vacúolo Digestivo

VL - Vacuolização

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>14</b>
2.1 ASPECTOS GERAIS.....	14
2.2 EPIDEMIOLOGIA .....	15
2.3 BIOLOGIA .....	17
2.4 ASPECTOS GERAIS SOBRE O TRATAMENTO.....	21
<b>2.4.1 Quinolínicos</b> .....	<b>23</b>
2.5 HEMOZOÍNA.....	26
2.6. RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS .....	28
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
3.1 OBJETIVOS GERAIS .....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	30
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
4.1 SUBSTÂNCIAS .....	31
4.2 CITOTOXICIDADE <i>in vitro</i> .....	31
4.3 ENSAIO DE HEMÓLISE.....	32
4.4 CULTURA E SINCRONIZAÇÃO.....	32
4.5 ENSAIO DE INIBIÇÃO DE <i>P. falciparum in vitro</i> .....	33
4.6 TESTE DE INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE $\beta$ -HEMATINA .....	33
4.7 FORMAÇÃO DE HEMOZOÍNA NO PARASITO .....	33
4.8 ENSAIO DE REVERSIBILIDADE DO EFEITO.....	34
4.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) .....	34
4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	35
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>58</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>59</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença causada por parasitos do gênero *Plasmodium*, onde, dentre as cinco espécies capazes de infectar humanos, o *P. falciparum* o é mais mórbido e mortal, colocando em risco a saúde de milhares de pessoas pelo mundo. A população da África Subsaariana apresenta maior risco de infecção, abrigando cerca de 90% das mortes pela doença (OMS, 2014).

No Brasil, a transmissão da malária se concentra, principalmente, na Amazônia Legal, com aproximadamente 800 municípios, totalizando 99,7% dos casos reportados (BRASIL, 2013).

A infecção com as espécies de *Plasmodium* sp., ocorre durante o repasto sanguíneo de fêmeas dos mosquitos de gênero *Anopheles* previamente infectadas, existindo mais de 30 espécies de vetores competentes da doença. Durante o repasto, esporozoítos são inoculados na circulação sanguínea do hospedeiro humano. Estes esporozoítos migram para o fígado onde invadem os hepatócitos e iniciam a diferenciação em esquizontes, por meio de reprodução assexuada, esquizogonia tecidual e, ao final, os merozoítos liberados invadem os eritrócitos diferenciando-se em trofozoítos. Esses últimos, após sucessivas divisões binárias, irão gerar merozoítos que invadirão novas hemácias. Alguns destes merozoítos podem se diferenciar em formas sexuadas, que serão então ingeridas pelo inseto, em novo repasto, garantindo a disseminação da doença (FOLEY; TILLEY, 1998).

A maioria dos antimaláricos usados atualmente são derivados ou análogos do quinino, que tem atribuída sua atividade em seu anel quinolínico. O quinino foi extraído da casca da planta *Cinchona officinalis*, árvore utilizada há mais de 300 anos para o tratamento da malária e serviu de base para a síntese da cloroquina e de outros antimaláricos que, durante muito tempo, foram utilizados como primeira linha na quimioterapia da doença, até o aparecimento de casos graves de resistência por parte dos parasitos (KAUR et al., 2010; LEWISON; SRIVASTAVA, 2008; FOLEY; TILLEY, 1998).

O surgimento de cepas resistentes às drogas utilizadas é um dos grandes problemas no tratamento contra malária e coloca em risco seu controle. O tratamento preconizado pela OMS para essa parasitose é baseado na combinação de artemisinina e outro fármaco com alvo de ação distinto, o que visa diminuir o surgimento de resistência, uma vez que a ocorrência de cepas resistentes tem

trazido grande preocupação às agências de saúde, sendo que até mesmo, casos de resistência à artemisinina e seus derivados já foram documentados (SANTOS; TORRES, 2013). Nas últimas décadas, os casos de resistência às drogas empregadas no tratamento tem aumentado bastante e o controle do vetor por meio da utilização de inseticidas tem sido cada vez menos eficaz (OMS, 2014; SANTOS; TORRES, 2013).

Alguns compostos quinolínicos, como a cloroquina, são conhecidos por bloquear a síntese de hemozoína, promovendo a alcalinização do vacúolo digestivo e através da interposição do fármaco à molécula de heme formando um complexo tóxico ao protozoário (WUNDERLICH; ROHRBACH; DALTON, 2012). Além disso, os quinolínicos e seus derivados têm apresentado atividade biológica frente a muitas infecções como leishmaniose, doença de Chagas, HIV e outras (VIEIRA et al., 2008; AKAGAH et al., 2008; DESRIVOT et al., 2007a; DESRIVOT et al., 2007b; DESRIVOT et al., 2007c; FAKHFAKH et al., 2003; FOURNET et al., 2002). Assim, em função da vasta atividade biológica destes derivados, bem como indicada a atuação de compostos desta família em processos vitais para o desenvolvimento do parasito dentro do eritrócito hospedeiro, novos derivados quinolínicos constituem uma promissora alternativa terapêutica contra a malária e muito ainda precisa ser investigado acerca do potencial de ação destes candidatos a fármacos.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 ASPECTOS GERAIS

A malária é uma doença que apresenta registros antigos encontrados em documentos chineses datados de 5000 anos a.C., mencionada ainda em relatos de 2000 anos a.C. na Mesopotâmia, além de papiros egípcios e textos hindus também datados de períodos anteriores à era cristã (COX, 2010). A doença atinge as comunidades humanas há muito tempo, tendo influenciado fortemente na expectativa de vida e distribuição de populações. Além disso, influenciou em decisões de conflitos e guerras onde a doença apresentava forte incidência, o que compreendia grande parte do território mundial (COX, 2010; OCKENHOUSE et al., 2005; SALLARES, 2002).

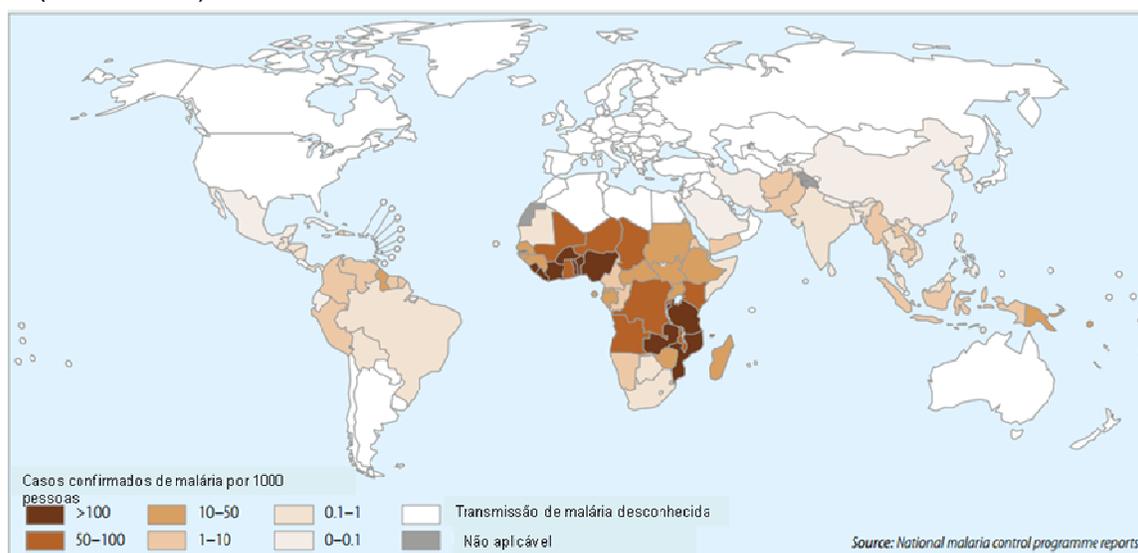
Classificada como uma doença tropical, devido a sua maior incidência nestas regiões (OMS, 2014), que fornecem condições favoráveis para o desenvolvimento dos seus vetores e parasitos (SACHS; MALANEY, 2002), a malária é incidente também em regiões subtropicais (CDC, 2010) e durante muito tempo foi motivo de preocupação em países como a Inglaterra, Canadá e Itália, sendo desta última erradicada somente ao final da II Guerra Mundial, com últimos casos reportados no ano de 1962. Nesse país, a expectativa de vida de adultos e mortalidade de crianças estavam altamente relacionadas à enfermidade, e influenciava diretamente na tomada de decisões governamentais (SALLARES, 2002). Entretanto, esse panorama está mudando devido às alterações climáticas ocorridas nas últimas décadas, que vêm contribuindo para a dispersão dos insetos vetores em regiões onde antes não eram encontrados e aumentando a abrangência da malária (SIRAJ et al., 2014).

Da presença da doença em solo italiano originou-se o nome malária – em italiano *mal'aria* – que significa ar ruim, derivado da concepção na época de que gases exalados por regiões pantanosas eram a causa da mazela valendo-lhe a alcunha paludismo (*latim palustris* = pântano). Entretanto, elucidado o ciclo de vida deste agente etiológico, foi possível associar a água parada dos pântanos com o processo de oviposição dos vetores da doença (CUNHA; CUNHA, 2008; SALLARES, 2002).

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA

A malária é considerada endêmica em 97 países (**Fig. 01**) (OMS, 2014) e está, ao lado do HIV e da tuberculose, entre as três mais importantes doenças transmissíveis (LEWISON; SRIVASTAVA, 2008). Conforme estimativas da Organização Mundial da Saúde, no ano de 2013 cerca de 3,3 bilhões de pessoas encontravam-se sob o risco de infecção por malária, dos quais 1,2 bilhões de pessoas estão em zonas com alto risco, como o Sudeste da Ásia e regiões da África. Completando este quadro, dos 198 milhões de casos confirmados em 2013, são estimadas 584.000 mortes atribuídas à infecção, das quais 90% ocorreram na região da África subsaariana e, 78% do total de óbitos seriam de crianças com idade inferior a 05 anos de vida, colaborando para as cerca de 2000 mortes diárias pela doença (WHITE et al., 2014; OMS, 2014).

Embora, de acordo com a OMS (2014), esses dados representem um decréscimo de 30% no número de casos e de 47% no número de mortes desde o ano de 2000, a malária ainda figura no cenário mundial como uma importante doença transmissível, principalmente para os países mais pobres. A severidade que a doença apresenta nesses países, está associada, ainda, à falta de acesso aos serviços adequados de saúde que garantiriam a prevenção, diagnóstico e tratamento, sendo o controle e a eliminação da malária, portanto, altamente dependentes do fortalecimento do sistema de atenção à saúde destas regiões (OMS, 2014).

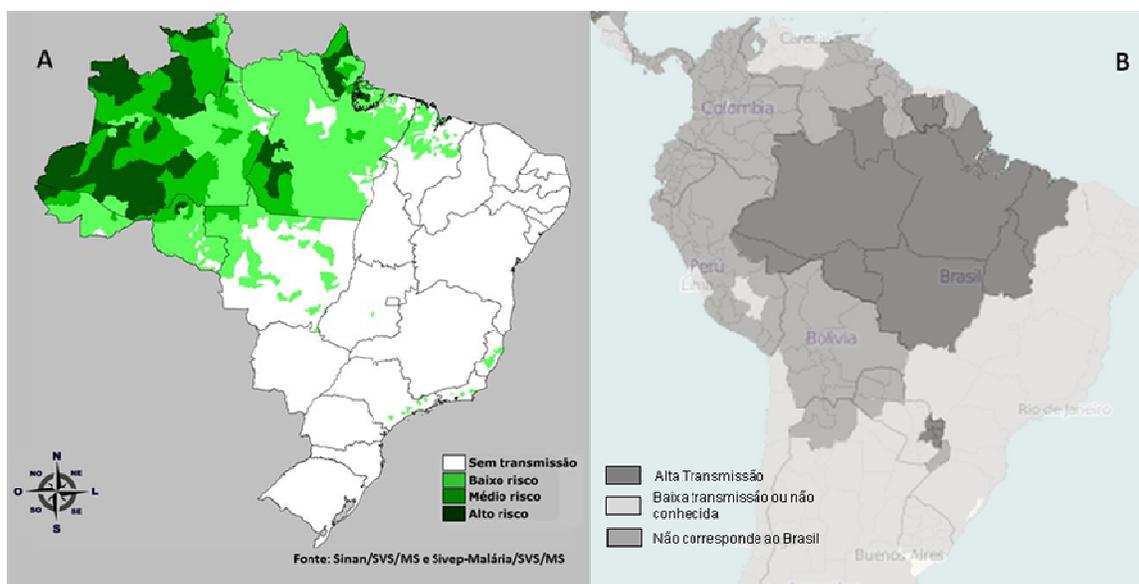


**Fig. 01.** Transmissão da malária ao redor do mundo para o ano de 2013. Adaptado de OMS (2014).

Sachs e Malaney (2002), apontam a relação entre a malária e muitos fatores sociais como a pobreza, crescimento econômico, disponibilidade de mão-de-obra e demografia. Os autores apresentam, por exemplo, que países com alta incidência de malária não só são mais pobres que os não afetados, mas também possuem mais baixas taxas de crescimento econômico. Este quadro seria agravado ainda pelos gastos médicos relacionados; alteração nas taxas de fertilidade; evasão escolar de crianças enfermas; além de ausência em dias de trabalho por mães que precisam cuidar das crianças adoecidas.

Enquanto mundialmente a doença é causada por cinco espécies de plasmódio, no Brasil a doença é causada por três espécies, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*, com predominância da malária vivax à qual foram atribuídos 78,7% dos casos notificados entre os anos de 2000-2011. Neste último ano foram confirmados 267.045 casos de malária no país, dos quais 99,7% estavam concentrados na região amazônica, em 807 municípios pertencentes aos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (**Fig. 02**) (BRASIL, 2011; 2013).

Dados registrados no Sistema de Vigilância Epidemiológica – SIVEP Malária-referentes ao ano de 2015 apontam até o mês de junho um total de 54.265 casos confirmados de malária no Brasil, dos quais 52.277 são casos autóctones, enquanto outros 1.988 casos foram oriundos de outros países.



**Fig. 02.** A. Distribuição de risco de infecção por malária no Brasil; B. Endemicidade da malária no Brasil. Adaptado de CDC Map application (2014) e Brasil – Portal Saúde (MS) (2015).

Enquanto a região amazônica apresenta a maior incidência da doença no Brasil, nos primeiros meses de 2015 (de janeiro a março) foram identificados 29 casos de malária fora desta região, destes 23 no estado do Rio de Janeiro, 5 em Goiás e 1 em Minas Gerais. O aparecimento destes casos, considerados surtos nas localidades, colocou as autoridades sanitárias em estado de alerta, expondo a necessidade de monitoramento destas regiões até a identificação dos sítios de propagação (CDC, 2015; SES/RJ, 2015). Ainda conforme dados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SISNAN Net/ Data SUS – até o mês de junho de 2015 foram confirmados 190 casos de malária em regiões extra-amazônicas. Diferente de outras regiões endêmicas para malária, no Brasil a mortalidade pela doença não é tão evidente, mas os custos com os tratamentos, bem como a incapacidade gerada pela enfermidade em pessoas em idade produtiva, a tornam um importante problema de saúde pública (BRASIL, 2013).

### 2.3 BIOLOGIA

A malária humana é causada por parasitos do gênero *Plasmodium*, sendo atribuída às espécies: *Plasmodium malarie*, *P. knowlesi*, *P. ovale*, *P. vivax* e *P. falciparum*, sendo os dois últimos os mais importantes, respectivamente, devido à sua ampla distribuição, incluindo em regiões temperadas, e a maior mortalidade com maior incidência nas regiões africanas (OMS, 2014; CDC, 2010).

Embora essas espécies sejam bem conhecidas como causadoras da doença em humanos, há possibilidade de surgimento de infecção por outras espécies de *Plasmodium* até então conhecidas por infectar apenas primatas. Gilles (1993 *apud* ANTINORI, 2012) apresenta em seu trabalho a possibilidade de infecção acidental ou natural de humanos por *P. simiovale*, *P. inui*, *P. schwetzi*, entre outras espécies parasitos de símios. Ainda sobre esta concepção, temos os trabalhos de Eyles, Coatney e Getz (1960), Chin e colaboradores (1965) e outros que corroboram a possibilidade destas novas infecções. No seu mais recente trabalho, Ta e colaboradores (2014) descrevem o que seria o primeiro caso de infecção natural, confirmado por diagnóstico molecular, de uma mulher malásia por *Plasmodium cynomolgi*, parasito de primatas não-humanos. Da mesma forma que *P. cynomolgi*, *P. knowlesi* até pouco tempo era conhecido infectar apenas símios, tornando-se uma

preocupação para saúde pública somente a partir de 2004 (TA et al., 2014; CHIN et al., 1965).

Os parasitos são carreados na transmissão por mosquitos vetores pertencentes ao gênero *Anopheles*, podendo ocorrer, raramente, casos de transmissão congênita ou por contato com sangue contaminado (NIAID, 2007). São conhecidas cerca de 460 espécies de anofelinos, das quais 70 são considerados potenciais transmissores de plasmódio e aproximadamente 41 vetores eficientes (CDC, 2013; SINKA et al., 2012; CUNHA; CUNHA, 2008) e estas espécies estão amplamente distribuídas pelo mundo (Fig.03).

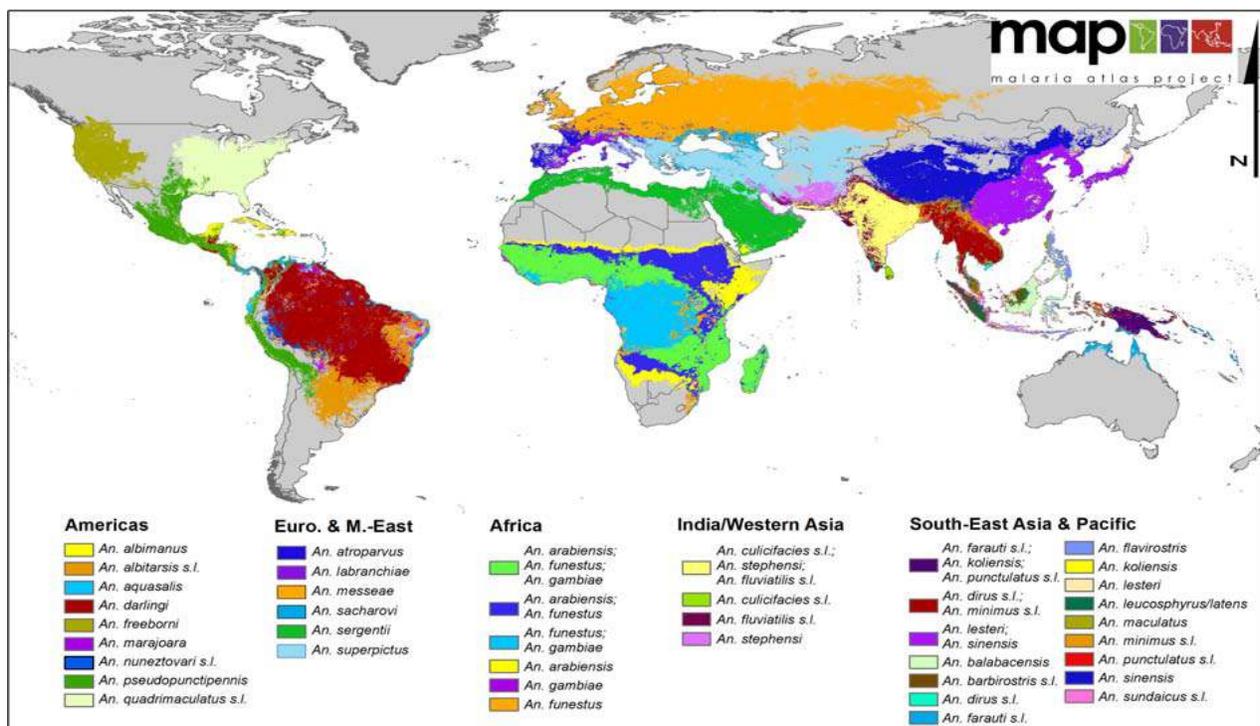


Fig. 03. Distribuição global de vetores efetivos ou potenciais da malária. Fonte: Sinka et al. (2012)

A infecção por plasmódio se inicia quando fêmeas do mosquito realizam hematofagia em pessoas infectadas ingerindo, conseqüentemente, as formas sexuadas deste parasito, os gametócitos. Uma vez dentro do vetor, os gametócitos se fundem formando o oocineto e se diferenciam em oocistos contendo as formas esporozoítas que são injetados na corrente sanguínea de indivíduo não infectado numa nova hematofagia. Já no sangue, os esporozoítos migram para os hepatócitos onde passam pelo processo de esquizogonia originando vários merozoítos por

célula. A partir deste momento, com o rompimento dos esquizontes e liberação dos merozoítos, que podem chegar a 30.000 por hepatócito (WHITE et al., 2014; SIMPSON et al., 2002), inicia-se a segunda fase assexuada do ciclo de vida do plasmódio (COX, 2010).

Nesta fase, os merozoítos advindos do rompimento dos hepatócitos, têm agora como célula hospedeira a hemácia. Logo após a entrada na célula vermelha do sangue, os merozoítos se transformam em trofozoítos jovens, mais comumente conhecidos como anéis, assim chamados devido à presença de um grande vacúolo alimentar que compreende a maior porção da célula. Após um período de diferenciação, os parasitos apresentam-se na forma de trofozoíto maduro, caracterizado por grande atividade metabólica advinda do intenso consumo de hemoglobina da hemácia hospedeira. Já nesta fase quase a totalidade da área dos eritrócitos é preenchida pelos parasitos (WHITE et al., 2014; WUNDERLICH; ROHRBACH; DALTON, 2012). Uma vez iniciado o ciclo eritrocítico, a manutenção da infecção é proporcionada por sucessivas divisões dos trofozoítos, das quais se formarão esquizontes contendo de 6 a 36 merozoítos, conforme a espécie, e que serão liberados na corrente sanguínea para um novo ciclo de infecção. Eventualmente, os trofozoítos podem se diferenciar em gametócitos que darão continuidade ao processo de transmissão cruzada entre mosquitos e humanos (**Fig. 04**) (ANTINORI et al., 2012; WUNDERLICH; ROHRBACH; DALTON, 2012).

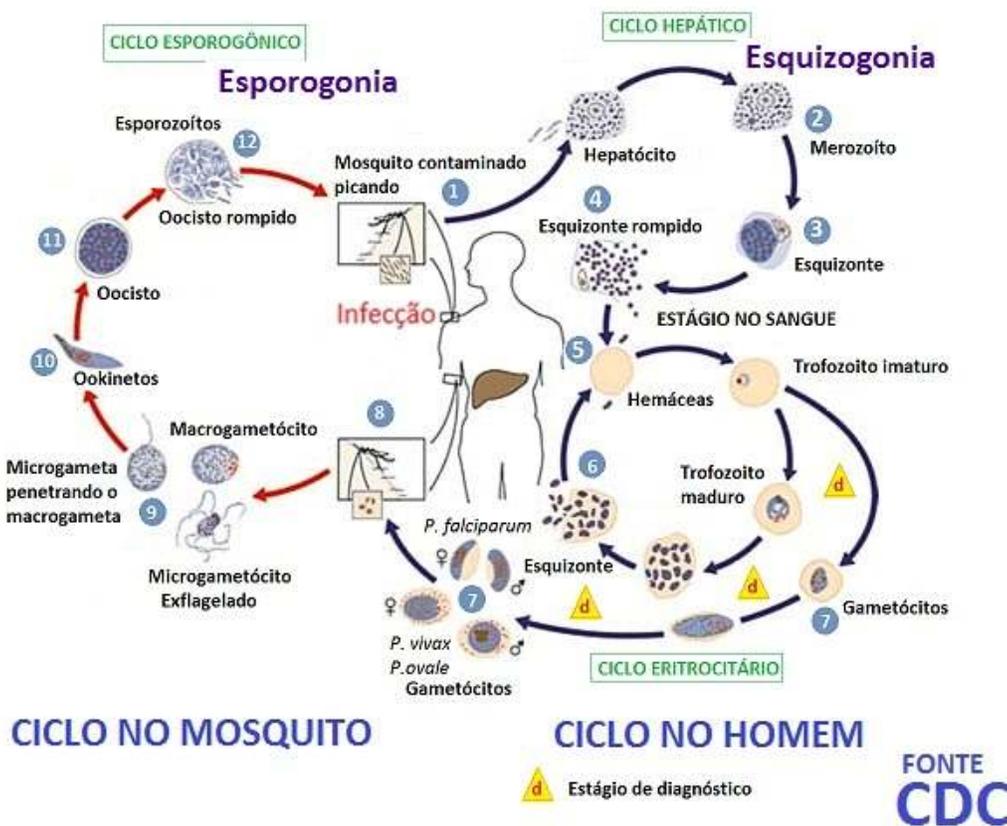


Fig. 04. Ciclo de vida de *Plasmodium* sp. Adaptado de CDC (2014)

A duração do ciclo eritrocitário, assim como outras características da infecção, pode variar entre as espécies de plasmódio, sendo de aproximadamente 48 h para *Plasmodium falciparum* (Quadro 01) (ANTINORI et al., 2012; CUNHA; CUNHA, 2008). A cada ciclo de reprodução assexuada, o número de hemácias infectadas aumenta exponencialmente e pode chegar a aumentar até 20 vezes a cada ciclo (NAM et al., 2013; SIMPSON et al., 2002). O aumento da carga parasitária, juntamente com o rompimento periódico das células são responsáveis pelas manifestações clínicas da doença, geradas pela grande resposta imunológica relacionada à interação dos parasitos com o hospedeiro (WHITE et al., 2014; WUNDERLICH; ROHRBACH; DALTON, 2012; MILLER; GOOD; MILON, 1994). Para responder à infecção, o organismo hospedeiro, aumenta a resposta imunológica do baço e a frequência de remoção de hemácias, indistintamente infectadas ou não, o que, juntamente com a liberação de hemozoína advinda da ruptura dos esquizontes culmina com a liberação de citocinas pro-inflamatórias e leva à patogênese da parasitose (WHITE et al., 2014; AYIMBA et al., 2011).

A apresentação mais severa da doença compreende desde casos de anemia grave, hipoglicemia, edema pulmonar, lesão renal, icterícia, acidose metabólica e a forma cerebral, que se apresenta como a mais mortal (WHITE et al., 2014; MILLER; GOOD; MILON, 1994).

**Quadro 1.** Características de infecção das 5 espécies de Plasmódio que infectam humanos\*

Características	<i>P. falciparum</i>	<i>P. knowlesi</i>	<i>P. malarie</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. vivax</i>
<b>Tipo de malária</b>	Terça maligna	Cotidiana	Quartã	Terça ovale	Terça benigna
<b>Estágio pré-eritrocítico</b>	5-7 (dias)	8-9 (dias)	14-16 (dias)	9 (dias)	6-8 (dias)
<b>Período pré-patente</b>	9-10 (dias)	9-12(dias)	15-16 (dias)	10-14 (dias)	11-13 (dias)
<b>Ciclo eritrocítico</b>	48 h	24 h	72 h	50 h	48 h
<b>Células vermelhas afetadas</b>	Todas	Todas	Eritrócitos maduros	Reticulócitos	Reticulócitos
<b>Paroxismo febril</b>	6-36 h ou maior	8-12 h	8-10 h	8-12 h	8-12 h
<b>Malária severa</b>	Sim	Sim	Não	Não	Sim
<b>Recaídas de formas de fígado</b>	Não	Não	Não	Sim	Sim

\*Adaptado de Antinori et al. (2012) e Cunha; Cunha (2008)

Devido à incapacidade gerada aos doentes pela sintomatologia (HALDAR et al., 2007) e a importância da fase eritrocitária para a manutenção da doença no indivíduo infectado, os antimaláricos de primeira linha tem como alvo os estágios parasitários desta parte do ciclo (MILLER et al., 2013; KAUR, et al., 2010; FOLEY; TILLEY, 1998).

## 2.4 ASPECTOS GERAIS SOBRE O TRATAMENTO

A quimioterapia antimalárica passou por várias etapas desde a sua descoberta, com o uso empírico de ervas, até compostos puros isolados de plantas e compostos sintetizados para este fim (MESHNISCH; DOBSON, 2001).

Antes do conhecimento das propriedades da árvore peruana *Cinchona officinalis* passada por índios a padres jesuítas, em visita a comunidades indígenas locais no século XVII, o tratamento da malária já teve procedimentos medievais em seu arsenal incluindo infusão de teias de aranha e até amputamento de membros (CAMBRIDGE UNIVERSITY LIBRARY, 2014; MESHNISCH; DOBSON, 2001). Dado o impacto mundial da doença, principalmente no que se refere à expansão de nações europeias e na influência em guerras, a busca por alternativas terapêuticas para a malária se intensificou no século XIX (OCKENHOUSE et al., 2005). Esse cenário contribuiu para que a malária tenha sido uma das primeiras doenças

tratadas com composto químico isolado, o quinino, e a primeira tratada com composto sintético, o azul de metileno (KRAFTS; HEMPELMANN; SKÓRSKA-STANIA, 2012; MESHNISCH; DOBSON, 2001).

A *Cinchona* sp. é conhecida como a primeira erva a ser utilizada em larga escala para o tratamento da doença, mas muitos anos antes outra planta, que seria muito importante para a evolução da quimioterapia antimalárica, já era receitada por chineses para o tratamento de diversos quadros febris – a *Artemisia annua*. Dessa última, no ano de 1972 foi isolada a artemisinina que junto com seus derivados é utilizada desde então para este fim (MESHNICK; DOBSON, 2001; FOLEY; TILLEY, 1998; KLAYMAN, 1985).

Após a descoberta do quinino, muitos outros fármacos antimaláricos foram isolados ou sintetizados, porém o rápido surgimento de cepas resistentes tem contribuído para o insucesso na erradicação da malária (**Tabela 1**) (THOMÉ et al., 2013; WONGSRICHANALAI et al., 2002).

A quimioterapia de escolha envolve métodos para eliminação de formas assexuadas e estímulo ao sistema imunológico do hospedeiro que, juntamente com ações de controle do vetor, compõe a principal estratégia para eliminação da doença (KAUR et al., 2010). Esses mecanismos envolvem uma ação sobre o vacúolo digestivo, interação com o DNA, mediação do estresse oxidativo, inibição de enzimas e transportadores (SANTOS; TORRES, 2013; THOMÉ et al., 2013; KAUR et al., 2010; FOLEY; TILLEY, 1998), etc. Estes estudos vem apresentando dados cruciais para o entendimento da fisiologia do parasito, bem como o modo de ação das drogas.

Apesar dos esforços e estudos desenvolvidos com esta finalidade, os mecanismos envolvendo a ação de alguns antimaláricos, como os quinolínicos, a artemisinina e seus derivados ainda não são completamente entendidos ou ainda possuem muitas controvérsias (GOLENSER et al., 2006; FOLEY; TILLEY, 1997).

Com o surgimento de cepas resistentes, a OMS desde então preconiza como tratamento de primeira linha, combinações baseadas na artemisinina (ACTs), que devido a sua eficiente atividade frente a plasmódios resistentes aos fármacos usuais a fez a primeira escolha para o tratamento da doença (OMS, 2014). O uso de fármacos associados visa à redução do aparecimento de resistência, bem como maior efetividade contra a doença, uma vez que busca utilizar de fármacos com mecanismo de ação distinto (OMS, 2005). Todavia, alguns estudos já relatam a falha

na terapia utilizando ACTs na Tailândia, Camboja, Myanmar e Vietnã (SANTOS; TORRES, 2013; THOMÉ et al., 2013) pondo em risco o uso dessa associação.

A artemisinina, princípio ativo extraído da planta chinesa *Artemisia annua*, foi identificada por volta do ano de 1972 (KRISHNA; UHLEMANN; HAYNES, 2004; KLAYMAN, 1985). O mecanismo de ação da artemisinina ainda não está bem elucidado, entretanto, alguns trabalhos relatam que sua atividade é dependente da digestão da hemoglobina e acúmulo de heme livre (TANGNITIPONG et al., 2012), enquanto outros questionam esta correlação (PARAPINI et al., 2004).

Diante desse cenário, bem como do aparecimento recorrente de cepas resistentes aos tratamentos clássicos, e aos recém-desenvolvidos, as pesquisas que visam o desenvolvimento de quimioterápicos contra a malária buscam encontrar ativos que atendam alguns requisitos básicos que contribuiriam para a eficácia do tratamento. Entre esses requisitos estão a efetividade tanto em formas sanguíneas como hepáticas de *Plasmodium* sp., a possibilidade de utilização para o tratamento das cinco espécies causadoras da doença, atuação sobre alvos seletivos, meia-vida relativamente longa, eficácia por via oral e, quando possível, em dose única, associados ao baixo custo de tratamento e à possibilidade de utilização na terapia e na profilaxia (BASORE et al., 2015).

#### **2.4.1 Quinolínicos**

Os compostos quinolínicos compõem a maioria dos antimaláricos usuais (KAUR et al., 2010), tendo o quinino, primeiramente isolado na segunda década do século XIX, servido como base para a síntese de muitos outros compostos importantes (FOLEY; TILLEY, 1997).

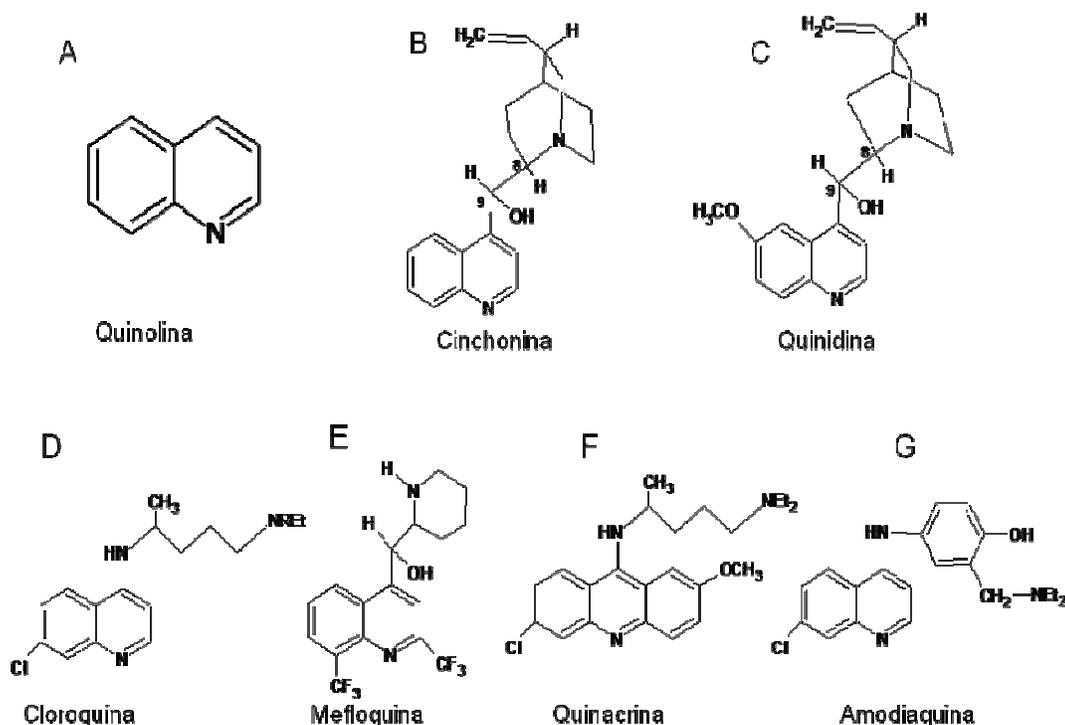
A cloroquina foi sintetizada no ano de 1934, para atender à necessidade de sanar as falhas do tratamento com o quinino, que a essa altura já apresentava diversos efeitos tóxicos, dificultando a sua utilização na clínica (THOMÉ et al., 2013; SHANKS, 1994). Em relação ao quinino este fármaco se destacava pelo baixo custo, estabilidade química e efetividade, permitindo uso de baixas dosagens (BURGUESS et al., 2010; COWMAN; FOOTE, 1990), e viabilizando sua utilização na profilaxia. No Brasil, já foi distribuída como sal ou embutida em alimentos, método conhecido como profilaxia de Pinotti, médico que introduziu o regime (MESNICH; DOBSON, 2001).

Com o seu surgimento, milhares de pessoas foram curadas e mortes evitadas, trazendo consigo uma esperança de erradicação mundial da malária. Foi o fármaco mais importante para o tratamento da doença, e sua atividade está relacionada ao acúmulo no vacúolo digestivo do parasito, impedido a degradação da hemoglobina e a polimerização do heme que, na sua forma solúvel, é tóxico ao protozoário por seu efeito pró-oxidante (WUNDERLICH; ROHRBACH; DALTON, 2012; KAUR et al., 2010; FOLEY; TILLEY, 1997). Embora sua eficácia tenha dado um incremento aos esforços para a eliminação da malária, o aparecimento e difusão de cepas resistentes, provavelmente devido ao regime de uso adotado como a exemplificada profilaxia de Pinotti, bem como a características farmacocinéticas do composto, a tornaram ineficaz para a maioria dos casos (WONGSRICHANALAI et al., 2002).

Posteriormente à cloroquina, muitos outros quinolínicos foram introduzidos, a exemplo da amodiaquina, piperquina, primaquina e mefloquina, esta última, introduzida por volta de 1980, também de muita importância devido à sua atividade em baixas concentrações (KAUR et al., 2010; FOLEY; TILLEY, 1997), mas pouco tempo depois da implementação do fármaco surgiram relatos de resistência (**Tabela 01**).

Os compostos quinolínicos são bases fracas, que contém um núcleo aromático heterocíclico (anel quinolínico), que facilmente penetram em membranas biológicas proporcionando atividade antimalárica, bactericida, antifúngica, anti-helmíntica, cardiotônica, anti-convulsiva, anti-inflamatória, analgésica e anticancerígena (MARELLA et al., 2013; FOLEY; TILLEY, 1997). A atividade antimalárica destes compostos está diretamente relacionada ao seu anel quinolínico (**Fig. 05**), os quais podem ser modificados quimicamente dando origem a vários derivados, com a perspectiva do surgimento de novas alternativas farmacêuticas para essa e outras nosologias (MARELLA et al., 2013; FOLEY; TILLEY, 1997).

A mefloquina e outros quinolinometanóis como o quinino, diferentemente da cloroquina, não se acumulam em grandes proporções no vacúolo digestivo, mas alguns estudos sugerem sua afinidade por lipoproteínas de alta densidade do soro, que são encaminhadas para os eritrócitos interagindo especificamente com proteínas da membrana celular (FOLEY; TILLEY, 1997).



**Fig. 05.** Estrutura do anel quinolínico (A); Alguns antimaláricos quinolínicos (B - G). Adaptado de Marella et al. (2013) e Foley; Tilley (1998)

Os alcalóides quinolínicos podem ser extraídos de diversas plantas ou sintetizados quimicamente conferindo-lhes características que possibilitem sua ação biológica (FOURNET et al., 2002). Recentemente, um grupo do Centro de Estudos Farmacêuticos da Universidade de Paris – França isolou um grupo de derivados quinolínicos na árvore boliviana *Galipea longiflora* (Rutaceae) que apresentaram em estudos muitas atividades biológicas entre elas leishmanicida, anti-retroviral, antifúngica, tripanocida, bactericida, antimalárica etc (VIEIRA et al., 2008; AKAGAH et al., 2008; DESRIVOT et al., 2007a; DESRIVOT et al., 2007b; DESRIVOT et al., 2007c; FAKHFAKH et al., 2003; FOURNET et al., 2002).

Em um desses trabalhos, 2 de 3 derivados testados, mostraram grande afinidade com eritrócitos, com baixa concentração encontrada no soro após poucas horas de administração, esse fato os autores atribuem ao possível papel das células do sangue no endereçamento destes compostos (DESRIVOT et al., 2007b). Desses isolados, derivados semissintéticos foram obtidos e apresentaram equivalente propriedade biológica, enfatizada a atividade leishmanicida (VIEIRA et al., 2008; AKAGAH et al., 2008; DESRIVOT et al., 2007a; DESRIVOT et al., 2007b; DESRIVOT et al., 2007c; FAKHFAKH et al., 2003; FOURNET et al., 2002). Nessa

perspectiva, os compostos quinolínicos e seus derivados despontam como promissores para a quimioterapia para diversas enfermidades, incluindo a malária.

## 2.5 HEMOZOÍNA: PIGMENTO MALÁRICO

A hemozoína é o produto final do metabolismo da hemoglobina do eritrócito hospedeiro, que é degradada pelo plasmódio durante desenvolvimento intra-eritrocítico para, dentre outras coisas, utilizá-la como fonte de aminoácidos, uma vez que, muitos destes necessários ao seu metabolismo, não são produzidos pelos próprios protozoários (RABELO et al., 2013). Como consequência desse processo, ocorre à liberação de ferriprotoporfirina IX, que livre é tóxico para o parasito (SIGALA; GOLDBERG, 2014; FRANCIS; SULLIVAN; GOLDBERG, 1997). Esse resíduo liberado reage com membranas da célula por sua alta interação lipofílica (GORKA; DIOS; ROEPE, 2013) contribuindo para alterações de permeabilidade de membrana, organização lipídica, e desestabilização de interações de membranas com proteínas do citoesqueleto, além de provocar desequilíbrio do sistema redox por meio de liberação de espécies reativas que leva à depleção da glutathione, peroxidação lipídica, além de oxidação do DNA e proteínas (GORKA; DIOS; ROEPE, 2013; WUNDERLICH; ROHRBACH; DALTON, 2012; KAUR et al., 2010; FOLEY; TILLEY, 1997)

A hemoglobina compreende cerca de 95% do conteúdo protéico do citoplasma do eritrócito (FRANCIS; SULLIVAN; GOLDBERG, 1997) e embora acredite-se que o fornecimento de aminoácidos seja a principal finalidade para seu consumo durante o desenvolvimento do parasito, pode ser também atribuída à manutenção do balanço osmótico no interior da célula parasitada, bem como para a liberação de espaço na célula hospedeira para o desenvolvimento do parasito e consequentemente evitando o rompimento precoce da hemácia (EGAN, 2007; 2008). Isso é evidenciado pelo fato de que em média o parasito utiliza apenas 16% da hemoglobina degradada para a produção de proteínas (KRUGLIAK; ZHANG; GINSBURG, 2001).

A degradação da hemoglobina ocorre no interior do vacúolo digestivo do parasito, uma organela de conteúdo ácido que acredita-se ser especializada na degradação da hemoglobina e envolve diversas proteases incluindo cisteíno-proteases, metaloproteases e aspartases (EGAN, 2008; BANERJEE et al., 2002;

GAVIGAN; DALTON; BELL, 2001; EGGLESON; DUFFIN; GOLDBERG, 1999). Inicialmente, a hemoglobina aspártica I e plasmepsinas I e II clivam a hemoglobina em duas frações: ferriprotoporfirina e globina. Posteriormente, falcipainas, que são cisteíno proteases, clivam a porção globina em peptídeos e aminoácidos (SIGALA; GOLDBERG, 2014; FRANCIS; SULLIVAN; GOLDBERG, 1997) que então podem ser utilizados pelo protozoário para a fabricação de suas próprias proteínas.

Carente de uma hemeoxigenase, essencial para a conversão do produto gerado na digestão da hemoglobina em um heme de cadeia aberta que possibilitasse a excreção deste resíduo pela célula, o parasito detoxifica o heme livre através da neutralização mediada por uma histidine-rich protein (HRP II), degradando-o pela ação da glutathione reduzida ou mais representativamente convertendo em hemozoína (MEN et al., 2012; HUY et al., 2003; SULLIVAN JR.; GLUZMAN; GOLDBERG, 1996).

Os mecanismos que envolvem a formação da hemozoína ainda são pouco compreendidos, com algumas hipóteses sendo discutidas para elucidação do processo (CORONADO et al., 2014). Dentre essas, quatro são as mais evidenciadas: 1) a polimerização ocorreria automaticamente pelas condições de pH do interior do vacúolo digestivo, sem a necessidade de um gatilho ou processo catalítico (ORJIH; MATHEW ; CHERIAN, 2012); 2) os cristais seriam formados a partir de cristais pré-existentes dentro desta organela ácida (CHEN; SHI; SULLIVAN JR., 2001); 3) a cristalização seria mediada por enzimas, com algumas candidatas já listadas para a função (CORONADO et al., 2014); e 4) a reação seria catalizada por moléculas lipídicas, hipótese essa defendida por numerosos autores (HOANG et al., 2010; AMBELE; EGAN, 2012). Outra hipótese, associada ao papel dos lipídeos é tratada no trabalho de Kapishnikov e colaboradores (2012) que concluem que a nucleação da hemozoína ocorre por meio de um filme lipídico de acilgliceróis adsorvidos à membrana interna do vacúolo digestivo do *Plasmodium* sp. ou que fazem parte da própria membrana.

A hemozoína, também chamada de pigmento malárico, é liberada no momento da ruptura da hemácia hospedeira ao final de um ciclo de divisão e um importante fator modulador da resposta imune do hospedeiro à infecção pelo parasito (REBELO et al., 2013). Estudos sugerem que essa modulação está diretamente envolvida na fisiopatologia da malária, através de uma intensa resposta

inflamatória seguida de uma supressão do sistema imunológico do hospedeiro (OLIVER et al., 2014). Num estudo recente, realizado por Oliver e colaboradores (2014) foi evidenciada uma relação entre os níveis de hemozoína fagocitados por macrófagos e neutrófilos e a severidade da doença.

## 2.6 RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS

O principal desafio para o controle ou erradicação da malária consiste no aparecimento de cepas resistentes aos fármacos disponíveis atualmente para o tratamento da doença (OMS, 2014). Apesar de toda a expectativa depositada na cloroquina quando da sua introdução para a quimioterapia antimalárica, o rápido aparecimento de cepas resistentes a esta droga logo fez esmorecer a esperança de controle da doença (WONGSRICHANALAI et al., 2002).

Dois processos são importantes para o estabelecimento de cepas capazes de continuar seu ciclo de desenvolvimento e disseminação mesmo após a introdução do tratamento com fármacos: o primeiro compreende a ocorrência ocasional de uma mutação genética que conferiria a espécimes parasitários a capacidade de bloquear a ação dos fármacos, seja impedindo a ligação deste em seu sítio de ação, ou através de bombas de efluxo que bombeiam o fármaco para longe do seu alvo (SINHA; MEDHI; SEHGAL, 2014). O segundo processo seria a seleção das cepas resistentes por meio do tratamento com esses medicamentos. Assim, as cepas sensíveis seriam eliminadas com o tratamento e abririam espaço para que aqueles que não sofreram com a ação do medicamento possam ocupar agora o nicho vago. Assim as cepas não responsivas a quimioterapia se espalham pela área de abrangência da doença levando ao insucesso no tratamento da doença (OMS, 2014).

Wongsrichanalai e colaboradores (2002) resumizam em seu trabalho o que seriam determinantes para os casos refratários, correlacionados com o desenvolvimento e disseminação de resistência, entre elas as mais importantes são: adesão aos regimes adotados nos tratamentos; características intrínsecas da droga - como meia-vida; características do hospedeiro – tanto humano como o vetor; além de fatores ambientais.

**Tabela 01.** Sumário de introdução e registro de resistência de alguns antimaláricos\*.

<b>Antimaláricos</b>	<b>Introdução</b>	<b>Primeiro registro de resistência</b>	<b>Diferença em anos</b>
Quinino	1820	1910	90
Cloroquina	1945	1957	12
Proguanil	1948	1949	1
Sulfadoxina-pirimetamina	1967	1967	0
Mefloquina	1977	1982	5
Atovaquona	1996	1996	0

\*Traduzido e adaptado de Wongsrichanalai et al., 2002.

Vários genes já foram listados como candidatos a motivadores do aparecimento das cepas resistentes aos tratamentos empregados contra a malária até então (VALDERRAMOS; FIDOCK, 2006). Entre esses, o gene *pfmdr 1* (*Plasmodium falciparum multiple drug resistance*) confere aos parasitos característica de resistência à múltiplas drogas, tornando ainda mais difícil a luta contra este patógeno (SINHA; MEDHI; SEHGAL, 2014; WILSON et al., 1993).

Como tentativa de reduzir a disseminação de cepas resistentes, têm-se adotado, conforme preconização da OMS, a utilização de fármacos combinados, em especial com mecanismos de ação distintos, o que, em teoria, retardaria o aparecimento de cepas não-sensíveis aos tratamentos. Entretanto, vários trabalhos têm registrado casos de não-responsividade até mesmo às combinações em uso atualmente (OMS, 2014; SANTOS; TORRES, 2013; THOMÉ et al., 2013).

Assim, à crescente disseminação de cepas de *Plasmodium* sp. resistentes aos tratamentos utilizados atualmente na quimioterapia antimalárica, inclusive à terapia combinada a base de artemisinina, indica a necessidade de descoberta de novas alternativas terapêuticas com alvos de ação seletivos e que contemplem desde formas assexuadas intraeritrocíticas e gametócitos, à formas hepáticas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, *in vitro*, a atividade antimalárica de novos derivados quinolínicos (sob sigilo patentário) BS 260 (2-(2-metoxietenil), BS 318 (2-(2-furiletênil) e BS 373 (2-(2-hidroxi-prop-2-enil), sobre cepas resistentes à cloroquina de *Plasmodium falciparum*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Avaliar o potencial anti-parasitário dos novos derivados quinolínicos sobre *Plasmodium falciparum*, cepa w2, cloroquina-resistente.

2) Verificar o potencial citotóxico dos novos derivados quinolínicos, compreendendo a possível ação hemolítica das substâncias sobre hemácias humanas, bem como a atividade citotóxica sobre outras células de mamíferos.

3) Investigar o potencial inibidor dos novos derivados quinolínicos sobre a formação de cristais de  $\beta$ -hematina e hemozoína.

4) Verificar a capacidade dos parasitos em reverter o efeito gerado pelos novos derivados quinolínicos.

5) Investigar as alterações ultraestruturais geradas pelos tratamentos com os novos derivados quinolínicos em culturas de *Plasmodium falciparum*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 SUBSTÂNCIAS TESTADAS

Foram utilizados três derivados quinolínicos, BS 260 (2-(2-metoxietenil) (Q1) (Fig. 6 - **A**), BS 318 (2-(2-furiletênil) (Q2) (Fig. 6 - **B**) e BS 373 (2-(2-hidroxi-prop-2-enil)quinolina (Q3) (Fig. 6 - **C**), sintetizados a partir de precursores quinolínicos extraídos de *Galipea longiflora* (Rutaceae), pelo grupo do Centro de Estudos Farmacêuticos da Universidade de Paris – França (Figura 6). As soluções estoque das substâncias foram preparadas por diluição em dimetilsulfóxido (DMSO) a 100 % e para a realização dos ensaios a diluição final em meio RPMI 1640 ou solução correspondente com concentração final de DMSO não ultrapassando 1%.

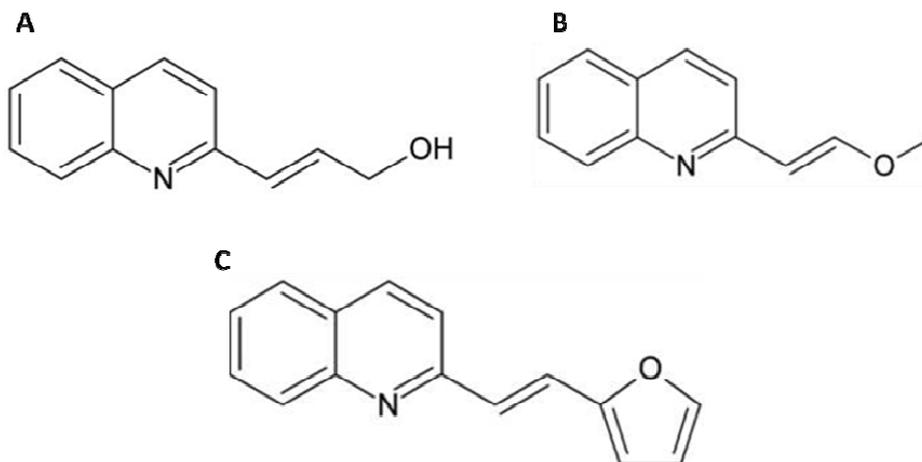


Fig. 6. Estrutura química dos novos derivados quinolínicos **A**. BS 260; **B**. BS 318 e **C**. BS 373.

### 4.2 CITOTOXICIDADE *in vitro*

Para avaliação do perfil citotóxico dos derivados frente a células de mamíferos, foram utilizadas células de baço de camundongos BALB/c (106 céls/poço), incubadas à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em presença das substâncias testadas, em triplicatas das diferentes concentrações, e de [3H]-timidina (1 µCi/poço), durante 24 horas.

Os controles continham apenas células incubadas com meio de cultura e [3H]-timidina. Após o período de incubação, as células foram coletadas, utilizando coletor MPXRI 96TI (Bradel, Gaithersburg, MD, USA).

Para determinar a incorporação de [3H]-timidina foi utilizado contador de radiação beta (Multilabel Reader, Hidex, Turku, Finland). A viabilidade das células foi determinada pela incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina e a citotoxicidade calculada em relação à incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina nos poços não tratados.

#### 4.3 ENSAIO DE HEMÓLISE

Para corroborar o perfil citotóxico dos derivados, bem como garantir que sua ação ocorra diretamente sobre o parasito e não pela lise das hemácias hospedeiras, eritrócitos humanos foram incubados com diferentes concentrações das substâncias por 1 hora em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

O potencial hemolítico foi verificado por leitura espectrofotométrica a 540 nm como descrito em Wang et al. (2010). Os valores foram convertidos em porcentagem de hemólise em relação ao controle com saponina (1%) pela seguinte fórmula:

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

#### 4.4 CULTURA DE *P. falciparum* E SINCRONIZAÇÃO DE ESTÁGIOS INTRA-ERITROCÍTICOS

*P. falciparum* (cepa W2), foram mantidos em cultura contínua em eritrócitos humanos (sangue tipo O+) e meio RPMI 1640 suplementado com 25 mM de HEPES, 21 mM de bicarbonato de sódio, 300 µM de hipoxantina, 11 mM de glicose, 20 µg/mL de gentamicina e 10% (v/v) de plasma humano inativado tipo O+ conforme descrito por Trager e Jensen (1976).

As garrafas foram mantidas em estufa à 37°C, com trocas diárias de meio de cultura e submetidas a uma atmosfera gasosa contendo 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>. A parasitemia foi monitorada diariamente em esfregaços fixados e corados seqüencialmente com solução de triarilmetano a 0,1%, solução de xantenos a 0,1% e solução de tiazinas a 0,1% que compõem o Kit para coloração em hematologia Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, Brasil), e visualizados ao microscópio óptico (100x).

Para os ensaios in vitro, a sincronização dos estágios foi realizada com utilização de solução de sorbitol 5% em salina, como proposto em Lambros e Vanderberg (1979).

#### 4.5 ENSAIO DE INIBIÇÃO DE *P. falciparum in vitro*

Culturas de *P. falciparum*, sincronizadas em estágio de anel, foram incubadas em placas de 96 poços com diferentes concentrações dos derivados a serem testados por 24 horas em estufa 37°C e com mistura gasosa contendo 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>. Após este período, foram adicionados 25 µL da solução de [<sup>3</sup>H]-hipoxantina (0,5 µCi/poço), retornando as placas para mais 24 horas de incubação como descrito em Desjardins et al. (1979).

Após este período as placas foram congeladas a -20°C, para promover a lise das hemácias, e posteriormente coletadas com coletor MPXRI 96TI (Bradel, Gaithersburg, MD, USA) e a quantificação da radioatividade incorporada realizada usando o contador de radiação beta Multilabel Reader (Hidex, Turku, Finland).

A inibição do crescimento parasitário foi avaliada através da incorporação de [<sup>3</sup>H]-hipoxantina, comparando com o controle não tratado, onde a incorporação de [<sup>3</sup>H]-hipoxantina foi total, determinando a concentração capaz de inibir 50% da proliferação / sobrevivência parasitária (IC<sub>50</sub>).

#### 4.6 TESTE DE INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE β-HEMATINA

A ação das substâncias sobre a formação de cristais de β-hematina foi avaliada como descrito por Basílico e colaboradores (1998).

Os ensaios foram realizados utilizando solução contendo 125 µg/mL de cloreto de hemina e 250 mM de tampão acetado de sódio pH 4,4. As soluções foram plaqueadas juntamente com diferentes concentrações dos derivados e incubadas em estufa 37°C por um período de 18-24 h.

Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 800 g por 10 minutos e os sobrenadantes descartados. Os pellets então foram ressuspensos em 200 µL de DMSO a fim de remover a hemina não reagida e as placas submetidas a mais um ciclo de centrifugação.

O pellet final, consistindo de precipitado de β-hematina, foi dissolvido em 150 µL de NaOH 0,1 M e a quantificação realizada em espectrofotômetro a 405 nm.

#### 4.7 INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE HEMOZOÍNA NOS PARASITOS *in vitro*

Hemácias infectadas com a forma de anel foram incubadas na presença de 50 µM das substâncias, por um período de 18 horas. Após este período, as culturas já apresentando trofozoítos adultos de *Plasmodium falciparum*, passaram por

processo para lise das hemácias e liberação dos parasitos que posteriormente foram ressuspendidos em 1 mL de PBS (salina tamponada com fosfato), e então centrifugados a 23.708 g por 5 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante descartado.

O *pellet* foi ressuspendido em 1,0 mL de tampão bicarbonato de sódio 0,1 M pH 9,1 com 2,5 % de SDS. As amostras foram agitadas por 15 minutos e novamente centrifugadas a 23.708 g em microcentrifuga por 10 minutos a temperatura ambiente (procedimento repetido 3 vezes). Após esse processo, as amostras foram novamente ressuspendidas em 1 mL de água destilada e passadas no agitador de tubos (vortex) por 1 minuto. Então novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado (procedimento repetido 2 vezes).

Por fim, as amostras foram ressuspendidas em 1,0 mL de NaOH 0,1 M, agitadas por 1 minuto e o heme total quantificado em espectrofotômetro a 400 nm (OLIVEIRA et al., 2000).

#### 4.8 REVERSIBILIDADE DO EFEITO DOS COMPOSTOS

Para verificar se o efeito das substâncias sobre os parasitos estava relacionado à sua capacidade citostática ou citotóxica, culturas sincronizadas em estágio de anel foram tratadas com 50 µM dos quinolínicos 24 e 48h e cultivadas em meio RPMI à 37°C e sob uma atmosfera gasosa contendo 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>. Após o período de tratamento, as células foram lavadas e ressuspendidas em meio RPMI com 10% de plasma e novamente incubadas, com repiques diários realizados até o fim do experimento. Para acompanhamento do efeito do tratamento, esfregaços foram realizados diariamente, fixados e corados com o Kit para coloração em hematologia Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, Brasil) e a parasitemia verificada por meio de contagem de células em microscópio óptico em aumento de 100X com contagem mínima de 1000 hemácias por amostra. Registros fotográficos dos esfregaços foram realizados para melhor visualização da morfologia dos parasitos.

#### 4.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Após tratamento com 10 e 20 µM do quinolínico BS 373, trofozoítos de *P. falciparum*, foram fixadas em glutaraldeído a 2,0% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio

0,1M, ferricianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5 mM ao abrigo da luz por 40 minutos em temperatura ambiente.

A seguir, as células foram lavadas no mesmo tampão e desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30 – 100%) por 10 minutos em cada. As amostras então foram infiltradas e polimerizadas em resina epoxi Polybed (Polysciences). Após polimerização, cortes ultrafinos obtidos em ultramicrótomo e coletados em grades de cobre de malha 400. Posteriormente, fez-se a contrastação com acetato de uranila alcóolico a 7% e citrato de chumbo 6% por 5 minutos e observadas ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1230 (LEE et al., 2012).

#### 4.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

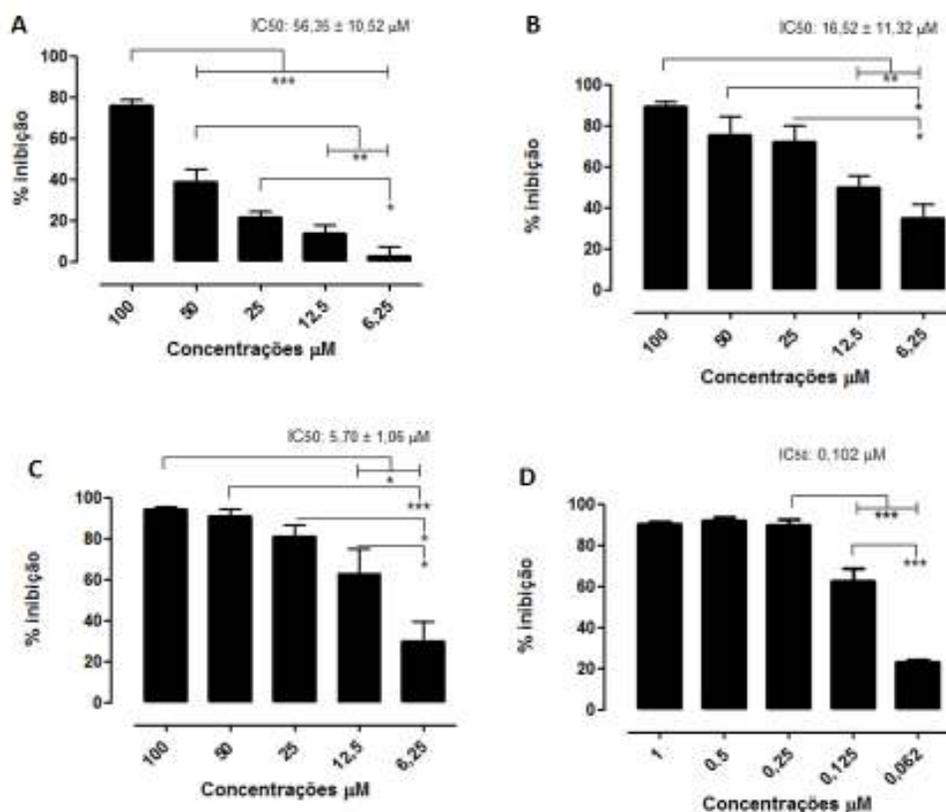
Os dados obtidos são representados como média da porcentagem de inibição ou média  $\pm$  desvio padrão. Para determinar a diferença entre as médias de pelo menos três grupos analisados, utilizamos análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey ou Dunnet. Todos os testes foram considerados significativos quando apresentaram valores de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

A fim de avaliar o potencial dos derivados quinolínicos em inibir o crescimento de *Plasmodium falciparum*, *in vitro*, as células foram incubadas com diferentes concentrações dos compostos e a viabilidade verificada pela incorporação de [<sup>3</sup>H]-hipoxantina (**Fig. 7**).

As IC<sub>50</sub> encontradas para os derivados foram de 56,35 ± 10,52 μM para o BS 260; 16,32 ± 11,32 μM para BS 318 e 5,70 ± 1,06 μM para o derivado BS 373.

A figura 7 mostra as curvas de concentração *versus* efeito representando o padrão de inibição do crescimento parasitário apresentado pelas substâncias testadas e a tabela 2 apresenta um resumo dos valores de IC<sub>50</sub> encontrados.



**Figura. 7.** Determinação das IC<sub>50</sub> em culturas de *Plasmodium falciparum* cepa w2, após a incubação com os derivados quinolínicos. **A** representa a % de inibição de crescimento da cultura incubada com o derivado quinolínico BS 260; **B** derivado BS 318; **C** derivado BS 373; e **D** mefloquina, controle positivo. As substâncias foram testadas em culturas sincronizadas de *P. falciparum* mantidas em incubação por 48 horas. O percentual de inibição foi determinado em comparação ao controle com solvente (meio RPMI). A viabilidade celular foi avaliada através da técnica de incorporação de hipoxantina tritiada. Os gráficos são representativos e os valores de IC<sub>50</sub> foram obtidos em pelo menos três experimentos independentes, empregando cinco diferentes concentrações das drogas isoladas, realizados em triplicata. Cada barra representa a média da porcentagem de inibição. Os valores de IC<sub>50</sub> foram determinados a partir do programa GraphPad.PRISM 5.0 utilizando o teste Anova e pós-teste de Tukey com p < 0,05.

**Tabela 2.** Atividade antimalárica dos novos derivados quinolínicos.

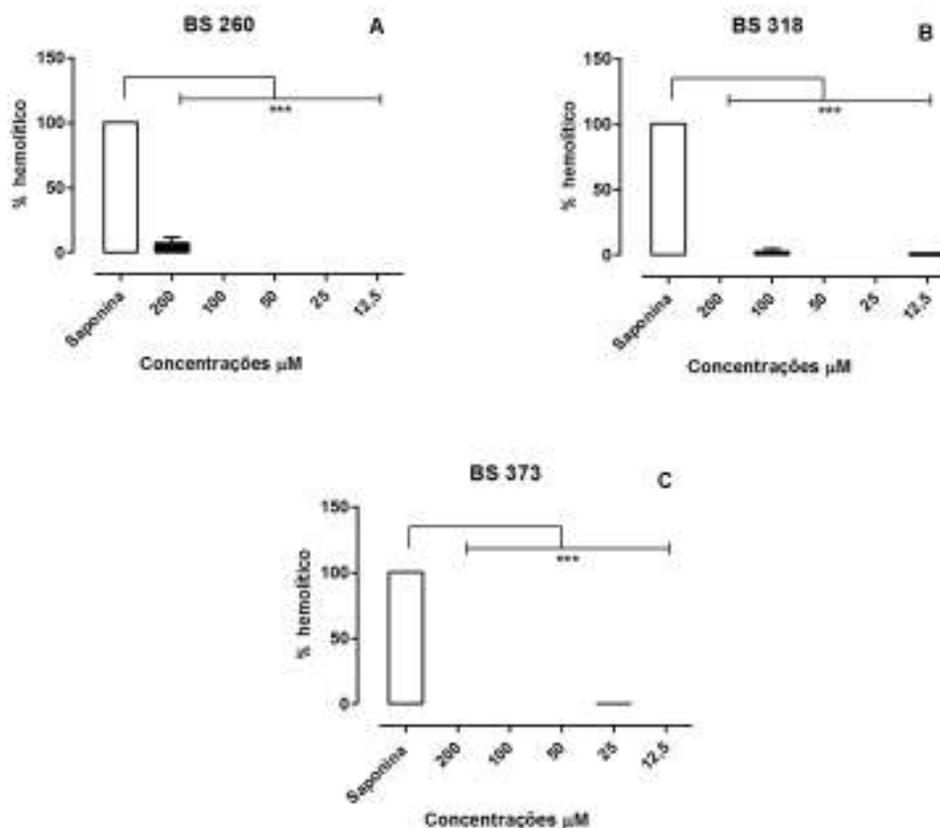
SUBSTÂNCIA	IC <sub>50</sub> em condições experimentais próprias
BS 260	56,35 ± 10,52 µM
BS 318	16,32 ± 11,32 µM
BS 373	5,70 ± 1,06 µM
Mefloquina	0,10 µM*

\*Representa valor obtido em experimento único

Os resultados mostram que os quinolínicos apresentaram uma relação entre as concentrações testadas e o efeito inibitório do crescimento parasitário, indicando que esta última é diretamente proporcional ao aumento das concentrações testadas.

A partir dos resultados encontrados para a inibição do crescimento em culturas do parasito, partimos para a avaliação do potencial citotóxico destes derivados frente a células de mamífero. Para tal, avaliamos o potencial hemolítico destas substâncias utilizando hemácias humanas incubadas por 1 hora com os compostos (**Fig. 8**), bem como a avaliação do potencial inibidor destes derivados na proliferação e viabilidade de esplenócitos murinos pelo método de incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina (**Fig. 9**).

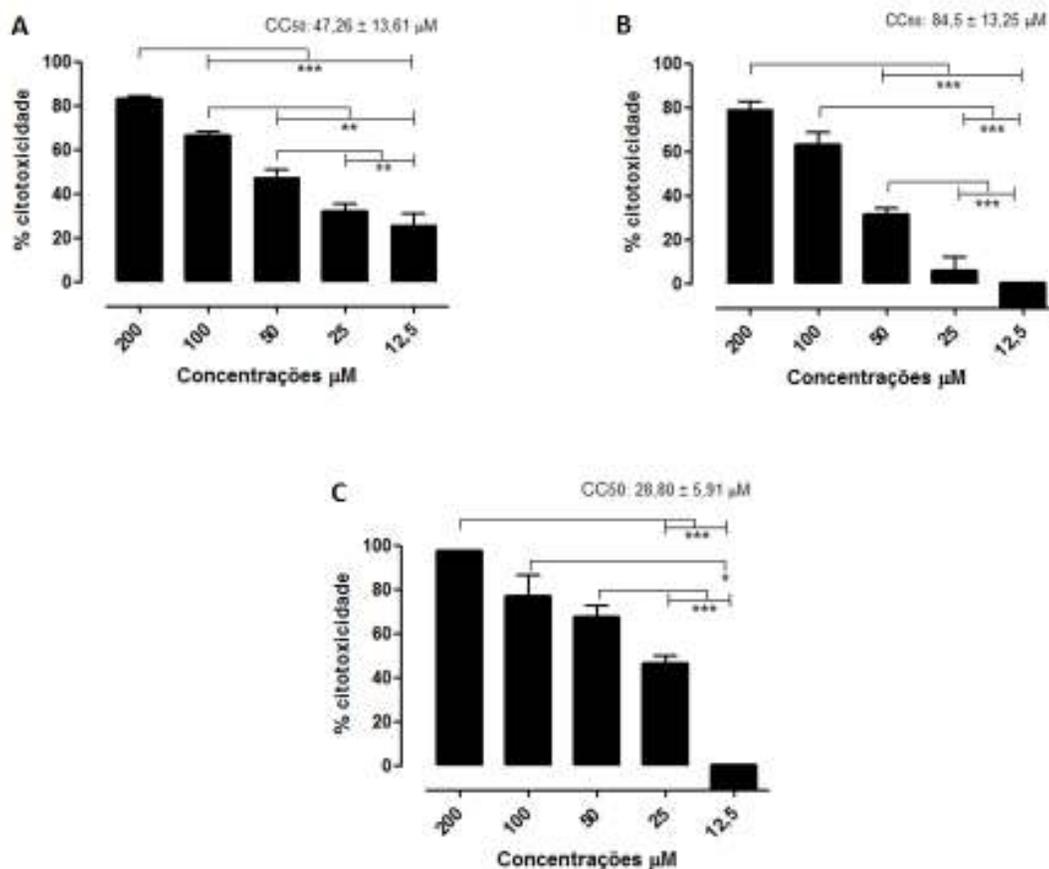
Como resultados, verificamos que nenhum dos três derivados testados apresentou atividade hemolítica (**Fig. 8**) quando incubados às hemácias humanas e os valores comparados ao controle positivo, saponina a 1%, que apresenta elevada atividade hemolítica.



**Figura 8:** Atividade hemolítica dos compostos quinolínicos. As hemácias (hematócrito de 1%) foram incubadas com as substâncias BS 260 (A), BS 318 (B) e BS 373 (C) por 1 hora, posteriormente foi avaliada a taxa de hemólise em relação ao controle positivo com saponina e para todas as substâncias e concentrações testadas, não foi observado efeito hemolítico para nenhum dos casos. Os gráficos são representativos de três experimentos realizados em triplicata e a análise estatística foi realizada através do programa Graph.Pad prism 5.0 utilizando o teste Anova e pós-teste de Dunnet com  $p < 0,0001$ .

A partir do experimento de avaliação da inibição da proliferação em esplenócitos murinos, foi possível calcular os valores de concentração citotóxica para 50% das células (CC50). Os valores encontrados para os derivados quinolínicos foram de  $47,26 \pm 13,61 \mu\text{M}$ ,  $84,50 \pm 13,25 \mu\text{M}$  e  $28,80 \pm 5,91 \mu\text{M}$  para BS 260, BS 318 e BS 373, respectivamente (Fig. 9).

Assim como os resultados apresentados para os estes utilizando culturas de *P. falciparum*, os gráficos de citotoxicidade apresentam uma relação positiva entre as concentrações utilizadas e o efeito sobre as células, onde a maior concentração foi responsável pela maior citotoxicidade.



**Figura 9:** Determinação das  $CC_{50}$  em esplenócitos murinos, após a incubação com os derivados quinolônicos. **A** representa a citotoxicidade do derivado quinolônico BS 260; **B** derivado BS 318; e **C** derivado BS 373; Os valores encontrados respectivamente foram 47,26, 84,50 e 28,80. As drogas foram incubadas com  $1 \times 10^6$  esplenócitos murinos, durante 24 horas. O percentual de inibição foi determinado a partir do controle não tratado. A proliferação foi avaliada através da técnica de incorporação de timidina tritiada. Cada barra representa a média da porcentagem de inibição entre os experimentos. Gráficos representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata e as  $CC_{50}$  determinadas pelo GraphPad PRISM 5.0 utilizando o teste Anova e pós-teste de Tukey com  $p < 0,05$ .

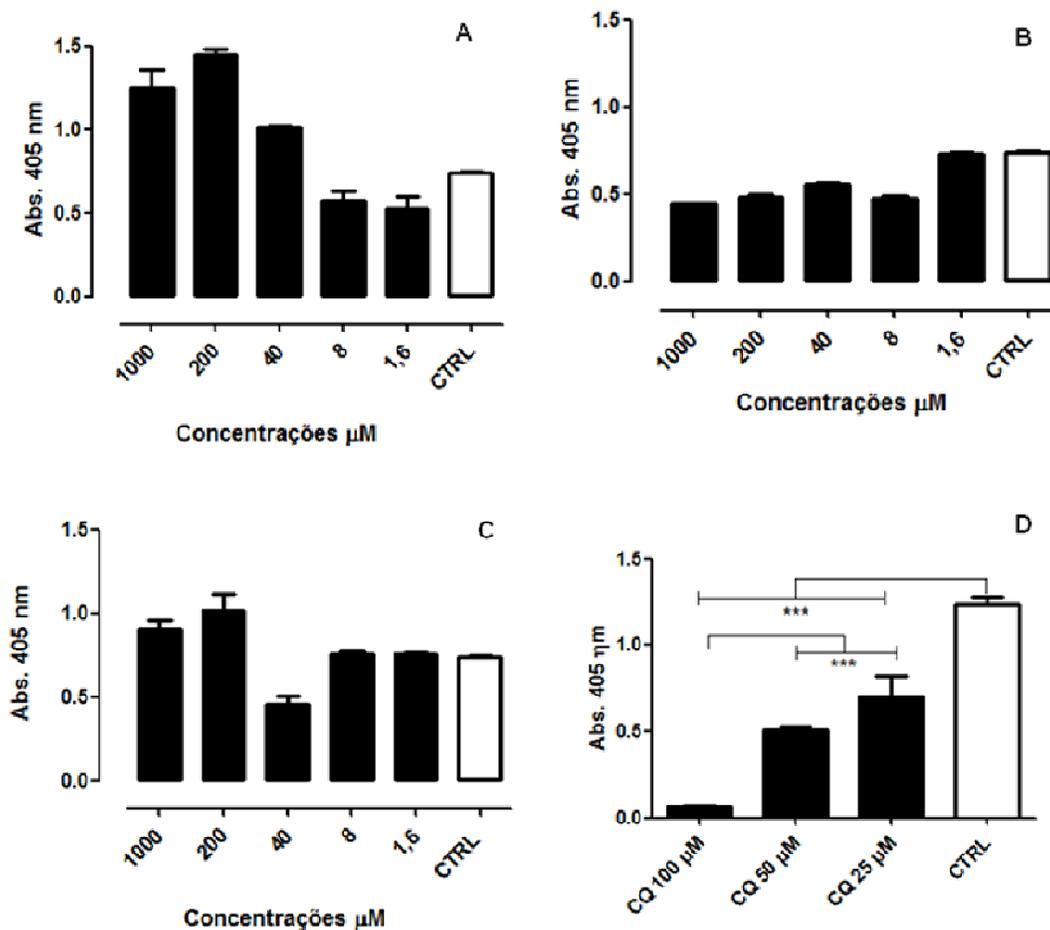
Com a obtenção dos valores de  $IC_{50}$  sobre formas intra-eritrocíticas de *Plasmodium falciparum* e os valores de  $CC_{50}$  sobre células de mamíferos, calculamos o índice de seletividade (IS), que indica o nível de seletividade dos derivados para as células parasitárias alvo, em relação às células de mamíferos. Esse índice é obtido pelo quociente entre o valor de  $CC_{50}$  e o valor de  $IC_{50}$ . Os dados são apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Índices de seletividade dos derivados quinolínicos

<b>DERIVADO</b>	<b>CC<sub>50</sub></b>	<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>IS</b>
BS 260	47,46 µM	56,35 µM	< 1
BS 318	84,50 µM	16,32 µM	<b>5,1</b>
BS 373	28,80 µM	5,70 µM	<b>5,0</b>

Como observado na tabela anterior, BS 318 e BS 373 apresentaram maiores índices de seletividade. Confirmada a atividade antimalárica das substâncias, partimos para a investigação do mecanismo de ação destes derivados. Uma vez que alguns dos principais fármacos antimaláricos da classe dos quinolínicos, como a cloroquina, têm seu mecanismo de ação associado à inibição da polimerização do resíduo heme em cristais de hemozoína, que conseqüentemente desencadeia uma cascata de eventos que culminam com a morte do parasito, objetivamos verificar se os derivados quinolínicos possuem atividade semelhante. Para tal realizamos o ensaio de inibição da polimerização de hemina em  $\beta$ -hematina, *in vitro*. Neste ensaio, solução de hemina é incubada com diferentes concentrações dos compostos por 24 horas e, ao final do período de incubação, as amostras são lidas por espectrofotometria.

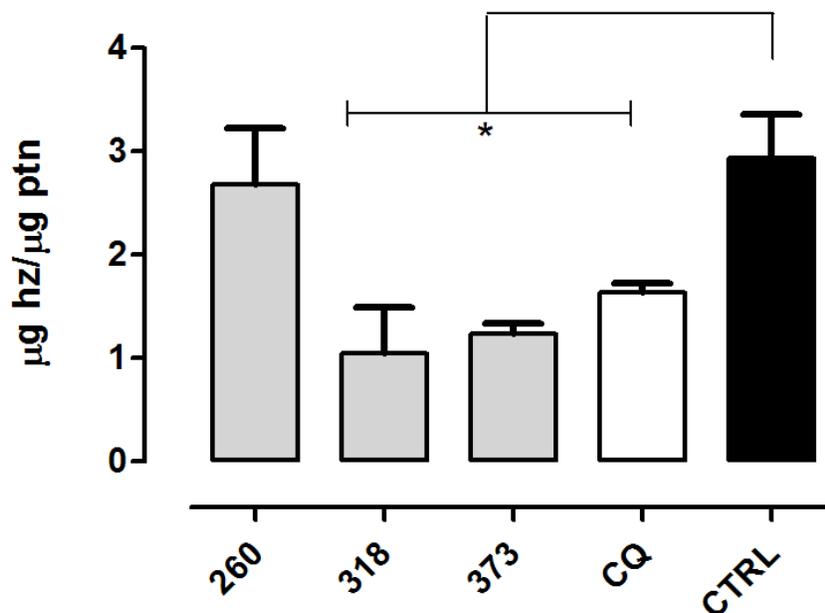
Neste experimento, não foi possível obter um padrão de inibição da  $\beta$ -hematina em relação ao controle para os derivados quinolínicos (**Fig. 10**), por não ter havido reprodutibilidade entre os ensaios realizados, mesmo quando utilizadas altas concentrações dos derivados (1 mM). Entretanto, como esperado, a cloroquina apresentou um padrão de inibição ainda que com concentrações em µM.



**Figura 10:** Efeito dos derivados quinolônicos sobre a formação da  $\beta$ -hematina *in vitro*. **A** representa dados referentes ao quinolônico BS 260; **B** o quinolônico BS 318; **C** o quinolônico BS 373 e **D** a cloroquina. Diferentes concentrações das substâncias foram incubadas com cloreto de hemina, DMSO e NaOH por 24 horas. Após esse período, avaliou-se o total de cristal formado através do espectrofotômetro a 405 nm. Não foi possível estabelecer um padrão de inibição de formação de  $\beta$ -hematina, mesmo utilizando altas concentrações dos quinolônicos testados. Gráfico representativo de dois experimentos independentes, realizados em triplicata. Análise estatística realizada pelo GraphPad PRISM 5.0 utilizando o teste Anova e pós-teste de Tukey com valor de  $p > 0,05$

Como não obtivemos um resultado conclusivo a respeito do potencial inibidor das substâncias sobre a formação de cristais de  $\beta$ -hematina, partimos então para verificar se estes derivados são capazes de inibir a formação de hemozoína em extratos do parasito. Para tal, culturas em estágio de anel foram incubadas por 24 horas com 50  $\mu$ M dos derivados quinolônicos ou da cloroquina, utilizada como controle positivo devido a sua conhecida capacidade de inibição da formação de hemozoína. Posteriormente os parasitos foram lisados e a hemozoína formada quantificada em espectrofotômetro. A figura 11 apresenta os resultados de inibição da formação de hemozoína nos extratos, normalizados pela quantidade final de proteínas.

Neste ensaio, verificamos que os quinolínicos BS 318 e BS 373 foram capazes de inibir a formação de hemozoína nas culturas de parasitos, em níveis semelhantes aos obtidos com a cloroquina. O BS 260 não apresentou inibição quando comparado com o controle não tratado.

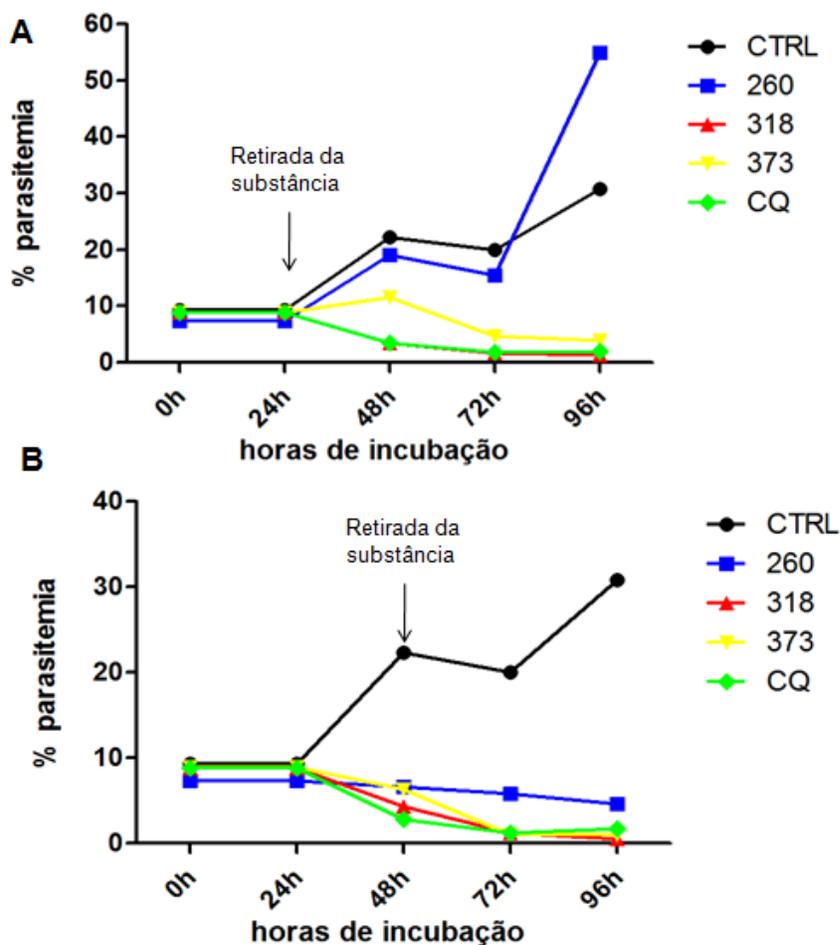


**Figura 11:** Efeito dos derivados quinolínicos sobre a formação da hemozoína nos parasitos. Culturas em estágio de anel foram tratadas com 50 µM das substâncias por 24h. Após esse período, as culturas foram processadas e avaliou-se o total de cristal formado através do espectrofotômetro a 405 nm. Os quinolínicos BS 318 e BS 373, bem como a cloroquina (CQ), foram capazes de inibir significativamente (\* $p < 0,05$ ) a polimerização de hemozoína nos extratos parasitários, quando comparados aos não tratados (CTRL – células incubadas com RPMI). As barras representam média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos realizados em triplicata. A significância estatística foi determinada pela análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Dunnet com o programa Graph.Pad prism 5.0.

Uma vez verificada a atividade das substâncias em *Plasmodium falciparum*, buscamos verificar se este dano é reversível e o crescimento parasitário poderia ser reestabelecido após a retirada das substâncias. Para tal, culturas em estágio de anel foram incubadas com 50 µM dos derivados quinolínicos por 24 ou 48h, lavadas e mantidas em cultivo sem nova adição das substâncias testadas. A avaliação do crescimento parasitário foi realizada diariamente através de contagem de esfregaços sanguíneos.

Neste experimento, pudemos observar que todos os derivados quinolínicos apresentam atividade antimalárica na concentração testada quando utilizados por 48

horas no tratamento das culturas (**Fig. 14-B**). Já quando o tratamento foi empregado por 24 horas, os parasitos tratados com o quinolínico BS 260 conseguiram reverter o efeito da droga, apresentando crescimento superior ao controle não tratado por volta das 96 horas após o tratamento inicial, já os derivados BS 318 e BS 373 apresentaram efeito anti-*Plasmodium* em apenas 24 horas de incubação (**Fig. 14-A**).



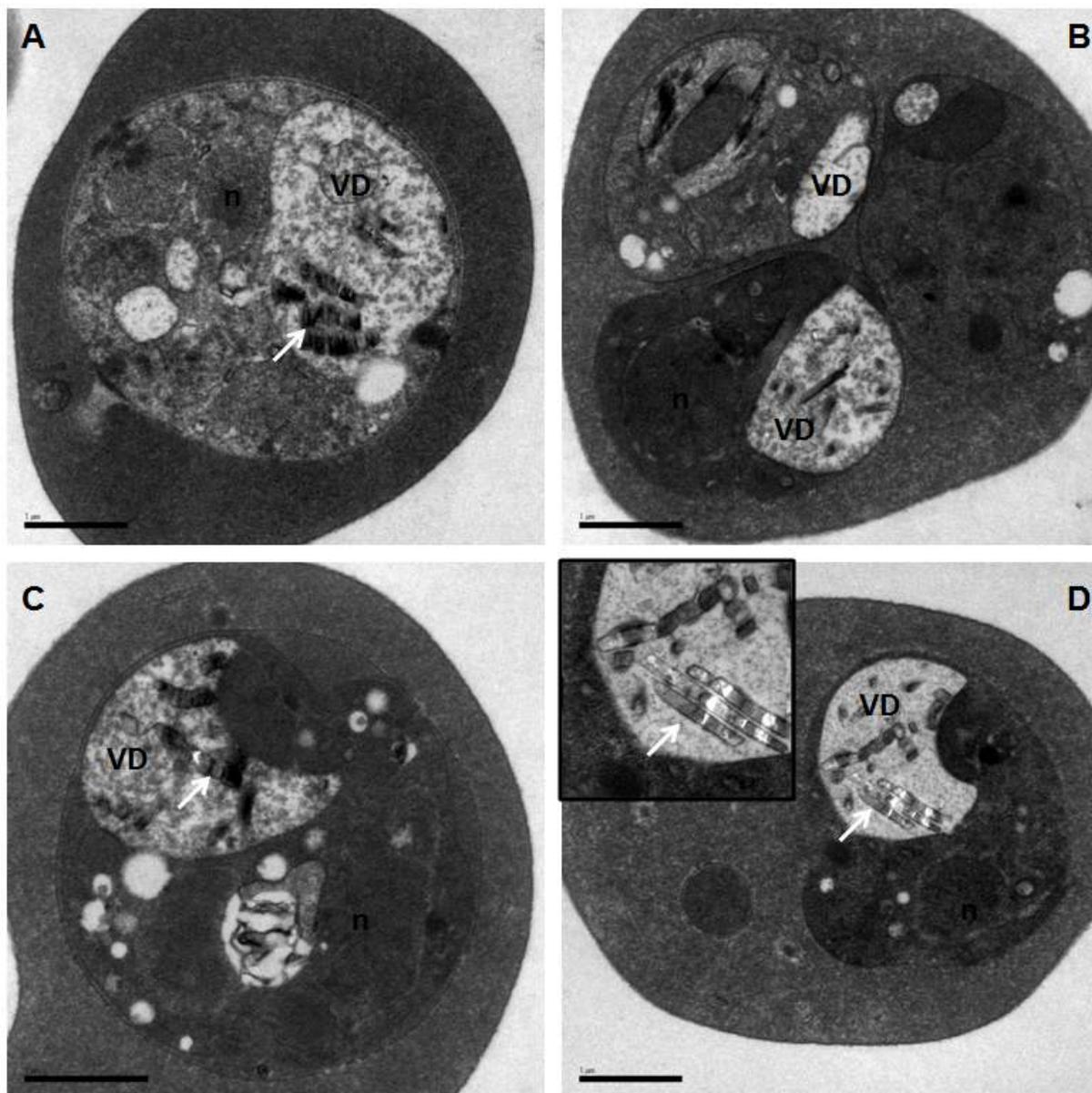
**Figura 14:** Avaliação da reversibilidade do efeito das substâncias sobre *Plasmodium falciparum*. **A** representa a parasitemia de culturas tratadas por 24 horas e **B** representa culturas tratadas por 48 horas. Com exceção do BS 260 em 24 horas de tratamento, o efeito dos quinolônicos mostrou-se irreversível para ambos os tempos de tratamento. Parasitemia avaliada por contagem em esfregaços sanguíneos em microscópio óptico com aumento de 100X e contagem mínima de 1000 hemácias. Dados de um experimento representativo.

As culturas tratadas apresentaram alterações morfológicas como redução do volume celular, principalmente nos tratados com os quinolônicos BS 318 e BS 373, sendo este último o que apresentou maior dano às células observadas por microscopia óptica (dados não apresentados).

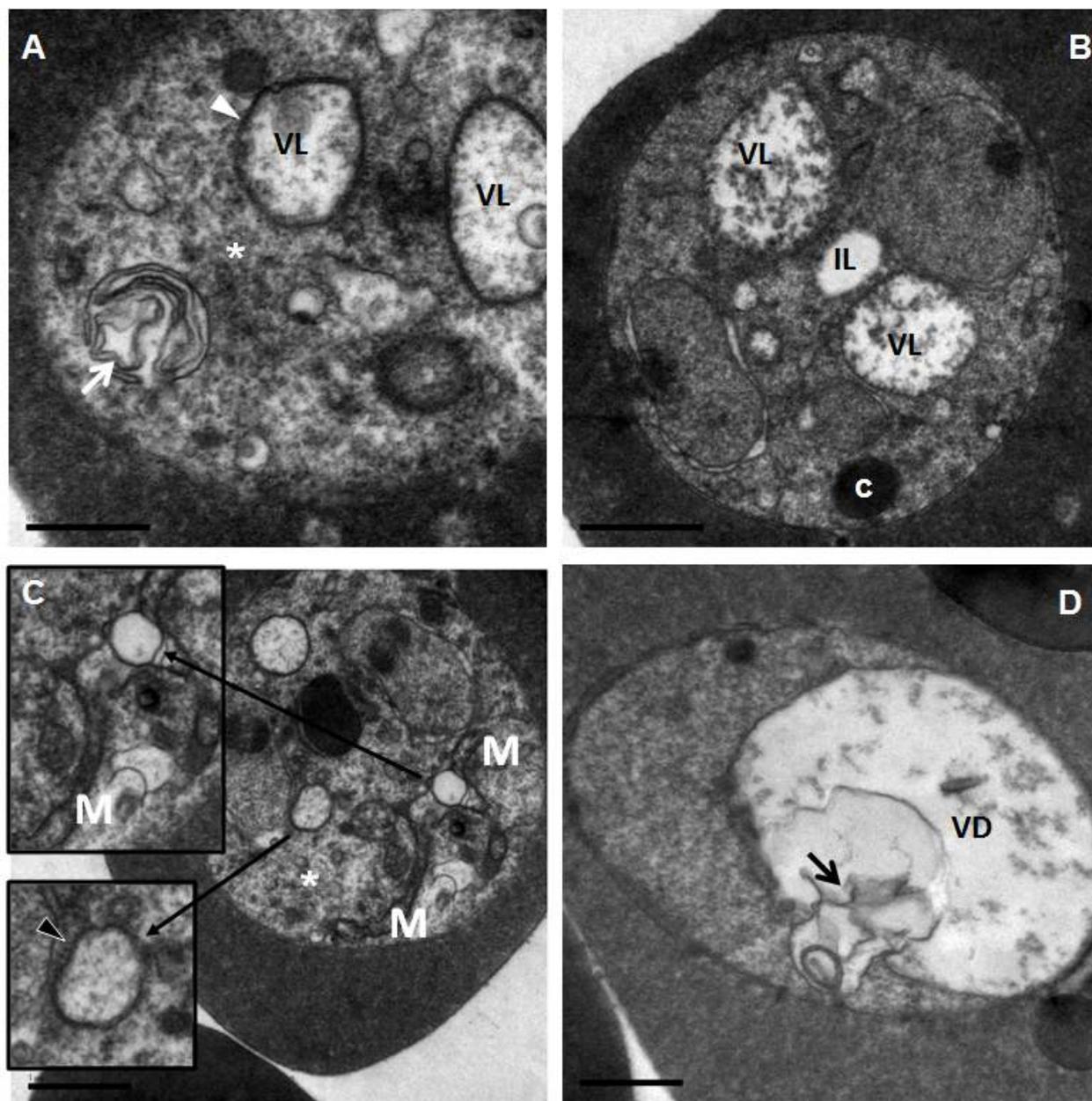
Na tentativa de elucidar os eventos que culminariam com a morte do parasito após os tratamentos com os derivados quinolônicos, utilizamos a microscopia

eletrônica de transmissão para avaliar os possíveis danos ultraestruturais após incubação com as substâncias. Para isto utilizamos apenas o quinolínico BS 373, visto sua melhor atividade antimalárica, sua evidenciada capacidade de inibir a formação de hemozoína, bem como alterações morfológicas observadas por microscopia óptica na avaliação da reversibilidade. Considerando o valor de IC50 encontrado para este quinolínico, foram escolhidas as concentrações de 10 e 20  $\mu\text{M}$  para este ensaio.

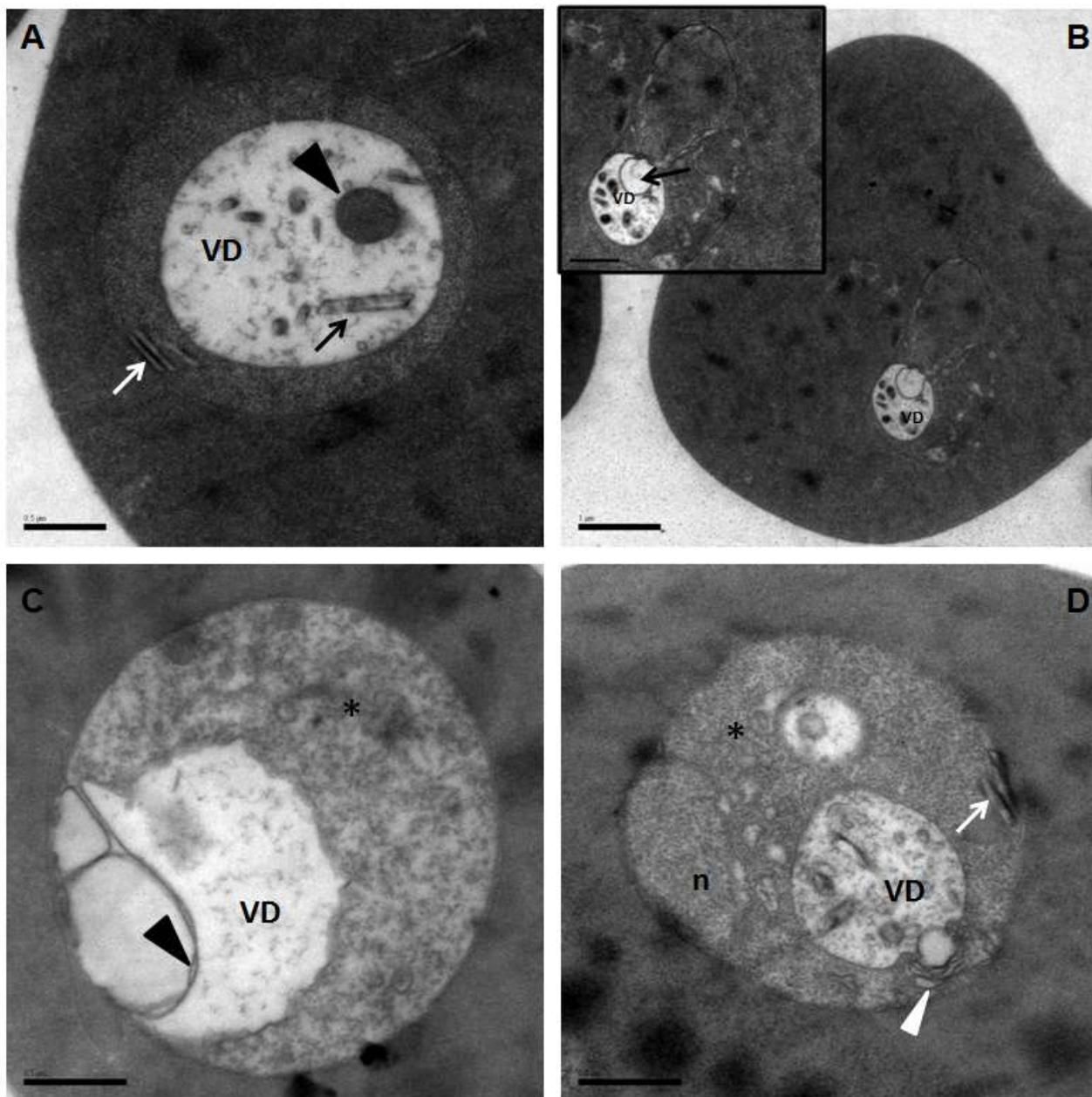
Pudemos perceber que após os tratamentos com o derivado BS 373, as células frequentemente apresentaram desorganização estrutural, vacúolo digestivo dilatado e reduzido número ou tamanho de cristais em seu interior, presença de cristais dispersos no citoplasma, consequência do rompimento da membrana do vacúolo digestivo, além da presença de estruturas membranosas na periferia do vacúolo em ambas as concentrações testadas (**Fig. 16 e 17**). Verificamos ainda a presença de vacuolização citoplasmática, o que pode indicar um processo de degradação celular. Notamos, ainda, a presença de figuras de mielina, que são indicativas de processo autofágico após o tratamento com o derivado.



**Figura 15:** Microscopia eletrônica de transmissão de hemácias infectadas por *Plasmodium falciparum* sem tratamento. Culturas sincronizadas e concentradas por gradiente de Percoll. As micrografias (A-D) mostram as células em sua configuração normal, com numerosos e densos cristais de hemozoína (setas brancas) formados no interior do vacúolo digestivo (VD), bem como núcleo (n) e demais estruturas em aspecto normal. A figura B representa uma célula poliparasitada e o *inset*, em D, mostra a configuração e disposição característica dos cristais de hemozoína no interior do vacúolo digestivo (VD).



**Figura 16:** Microscopia eletrônica de transmissão de hemácias infectadas por *Plasmodium falciparum* e tratadas com 10  $\mu$ M do BS 373. Culturas sincronizadas e concentradas por gradiente de Percoll, As micrografias (A-D) mostram as células com perda de compartimentalização citoplasmática (\*), vacúolo digestivo (VD) com presença de estruturas membranosas no interior, também sugestiva de fusão de compartimentos (D – seta preta) e com reduzido número ou ausência de cristais de hemozína em seu interior, bem como presença de figura de mielina (A – seta branca). Notamos ainda a existência de múltiplas vacuolizações autofágicas no parasito (VL) com presença de ribossomos aderidos à membrana (VL – ponta de seta branca em A), além de presença de mitocôndria modificada M (inset em C) e vacúolo autofágico com ribossomos ainda aderidos (inset em C, ponta de seta preta). Em B, podemos ainda notar a presença de inclusão lipídica (IL) e presença de citóstoma (c).



**Figura 17:** Microscopia eletrônica de transmissão de hemácias infectadas por *Plasmodium falciparum* e tratadas com 20  $\mu$ M do BS 373. Culturas sincronizadas e concentradas por gradiente de Percoll, As micrografias (A - D) mostram as células com alto grau de desorganização, vacúolo digestivo (VD) dilatado com cristais de hemozoína reduzidos e dispersos (A – seta preta), bem como se apresentando fora dos limites do vacúolo digestivo (A e D – setas brancas). Em A (ponta de seta preta) podemos observar apresenta de hemoglobina não digerida no interior do vacúolo. Em B (*inset* - seta preta), e em C (ponta de seta preta) verificamos compartimento em fusão com VD. Observados ainda a presença de possível fusão de retículo endoplasmático (D - ponta de seta branca) com o vacúolo digestivo. Em tempo, observamos ainda uma redução na eletronegatividade das células em C e D (\*).

## 6. DISCUSSÃO

Compostos quinolínicos são utilizados no tratamento da malária há décadas, sendo novas moléculas dessa classe alvo de estudos atuais como alternativas promissoras para o tratamento da doença, em virtude de sua excelente atividade frente a cepas de *Plasmodium falciparum* (KAUR et al., 2015; SOARES et al., 2015; AGUIAR, 2012).

Um dos maiores desafios para o tratamento da malária é a introdução de fármacos que sejam atuantes em todas as formas do protozoário, e ao mesmo tempo, que não apresentem efeitos adversos aos pacientes (BASORE et al., 2015). Estágios intra-eritrocitários de *Plasmodium*, devido ao seu próprio curso de desenvolvimento, desencadeiam altas taxas lise de eritrócitos, contribuindo para a sintomatologia da doença, bem como anemia (WHITE et al., 2014). Assim, é importante que um candidato a antimalárico não apresente capacidade hemolítica, uma vez que essa característica poderia contribuir para o curso grave da doença, incluindo acometimento por anemia severa. Os nossos resultados mostram que as substâncias utilizadas neste trabalho não apresentaram efeito hemolítico nas concentrações testadas, *in vitro*.

A primaquina é um antimalárico utilizado para tratamento de malária vivax e ovale por sua eficiência na eliminação de formas dormentes hipnozoítas, responsáveis pelos casos recrudescentes de malária, bem como é a única capaz de bloquear a transmissão de malária em todas as espécies de *Plasmodium* devido à sua ação sobre formas gametocíticas (DECHY-CABARET; BENOIT-VICAL, 2012). Entretanto, sua utilização é restrita por apresentar altos índices de hemólise como efeito da geração de estresse oxidativo, principalmente em pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), primeira enzima na via da regeneração da glutatona oxidada (GSSG) à glutatona reduzida (GSH), que contribui para a manutenção do metabolismo redox em eritrócitos (BALAJI; TRIVEDI, 2013; DECHY-CABARET; BENOIT-VICAL, 2012; STANTON; 2012).

Adicionalmente, as substâncias testadas neste trabalho BS 318 e BS 373 apresentaram menores índices de toxicidade *in vitro* sobre outras células de mamíferos, quando comparados aos índices de toxicidade sobre culturas de *Plasmodium falciparum*. Entretanto, ambos apresentaram baixa seletividade para os parasitos, que, segundo diretrizes da OMS para malária falciparum um índice de

seletividade adequado é superior 100 (Nwaka et al., 2009), embora conforme Prayong e colaboradores (2008) é considerado altamente seletivo quando maior ou igual a 3 e para estes derivados o valor encontrado para o IS foi de aproximadamente 5.

Os antimaláricos quinolínicos, a exemplo cloroquina e a amodiaquina, atuam sobre o vacúolo digestivo do parasito, interferindo na detoxificação do heme em hemozoína, contribuindo para a liberação de espécies reativas e, conseqüentemente, para a geração de estresse oxidativo (Becker et al., 2004; Ridley et al., 1997; Raynes et al., 1996). O resíduo heme não cristalizado desencadeia no parasito uma série de eventos relacionados, levando à oxidação de membranas e a perda funcional da mitocôndria do *Plasmodium*, contribuindo para o efeito citotóxico de alguns fármacos quinolínicos. Neste trabalho buscamos avaliar se os efeitos causados pelas substâncias sobre *Plasmodium* são decorrentes da interferência destas na cristalização da hemozoína *in vitro* e em extratos de parasitos.

A utilização de cloreto de hemina para mimetizar a formação de hemozoína *in vitro* é amplamente aceita e vários trabalhos mostram que os cristais de  $\beta$ -hematina formados são quimicamente, espectroscopicamente e morfológicamente idênticos aos cristais de hemozoína formados pelos parasitos (Egan et al., 2000; Bohle et al., 1997; Egan; Ross; Adams, 1994). A utilização desta técnica baseia-se na manutenção de um pH ácido para a biocristalização do heme.

Na avaliação *in vitro*, não obtivemos um padrão de reprodutibilidade entre os experimentos, com ausência de inibição da formação de  $\beta$ -hematina pelas substâncias. Entretanto, quando utilizados extratos de cultura de *Plasmodium falciparum*, os quinolínicos BS 318 e BS 373 apresentaram padrão de inibição da formação de hemozoína semelhantes à cloroquina, enquanto que BS 260 não apresentou atividade significativa.

Nossos dados sugerem que as substâncias atuam indiretamente sobre a formação de hemozoína, não ocorrendo pela interação dos derivados quinolínicos com o resíduo heme diretamente, uma vez que há evidências de outros autores da participação de diversas enzimas na catalização da biocristalização (Chugh et al., 2013; Sullivan Jr.; Gluzman; Goldberg, 1996), envolvimento de lipídeos (Ambele; Egan, 2012; Hoang et al., 2010; Pisciotta et al., 2007; Fitch et al., 1999) e ainda o papel de cristais pré-formados na inicialização do processo (Chen;

SHI; SULLIVAN JR., 2001). Assim, nossos derivados poderiam atuar como antagonistas de uma dessas moléculas o que inviabilizaria a formação de hemozoína.

Alguns trabalhos reportam a atividade de quinolínicos em inibir a formação de hemozoína e  $\beta$ -hematina, mediada pela participação de moléculas lipídicas, cristais pré-existentes e enzimas. Chen e colaboradores (2001) mostraram que compostos quinolínicos são capazes de inibir a extensão de cristais de  $\beta$ -hematina a partir de cristais pré-existentes, *in vitro*. Pisciotta e colaboradores (2007) evidenciaram a capacidade de quinolínicos como a cloroquina e a quinina interagir com nanosferas lipídicas, impedindo a formação deste biocristal. Vale salientar ainda que a nucleação de cristais de hemozoína na luz intestinal do helminto *Schistosoma mansoni*, ocorre em ambiente lipídico (SOARES, et al., 2009; SOARES et al., 2007). Ainda, Sullivan Jr. e colaboradores (1996), mostraram a capacidade da cloroquina em inibir a formação de hemozoína mediada por uma *histidine-rich protein II*, uma proteína encontrada no vacúolo digestivo do parasito, enquanto Chugh e colaboradores (2013) indicam a presença de um proteína ligada à cristalização do heme, que também foi afetada pela ação deste fármaco.

A detoxificação do resíduo heme é feita em sua maioria através da cristalização em hemozoína, mas ainda ocorre uma pequena participação da glutatona na detoxificação deste resíduo, processo essencial para a sobrevivência do parasito (BECKER et al., 2004; ATAMNA; GINSBURG, 1997). A cloroquina possivelmente atua em ambos os processos, levando à acumulação da ferriprotoporfirina IX no plasmódio que interage com membranas, levando à permeabilização celular, bem como com proteínas do parasito (FAMIN; GINSBURG, 2003; GINSBURG; GOLENSER, 2003; FAMIN; KRUGLIAK; GINSBURG, 1999; GINSBURG et al., 1998; HAR-EL et al., 1993). Este resíduo já foi demonstrado ser capaz de afetar a atividade de importantes enzimas do parasito principalmente as envolvidas na via glicolítica, o que acarreta numa maior ação deste fármaco (FAMIN; GINSBURG, 2003). Assim, os derivados quinolínicos testados neste trabalho podem contribuir para a depleção energética no parasito, o que pode justificar sua ação antimalárica, bem como na produção de desoxirribonucleotídeos para a síntese de DNA (CAMPANALE et al., 2003).

Além de proteínas envolvidas no metabolismo energético de plasmódio, outras relacionadas ao metabolismo redox, bem como falcisinas encontradas no

vacúolo digestivo e proteínas encontradas no retículo endoplasmático do parasito, mostraram-se sensíveis a interações com a ferriprotoporfirina (CAMPANALE et al., 2003). Outra hipótese que poderia justificar o mecanismo de ação destes derivados quinolínicos, aqui representado pela diminuição da formação de cristais de hemozoína pelos parasitos, é a atuação destas substâncias no processo de captação e degradação da hemoglobina. A atividade catalítica sobre a hemoglobina é atribuída a algumas aminopeptidases, como falcipainas e plasmepsinas, que atuam degradando a hemoglonina em peptídeos e aminoácidos para a disponibilização ao parasito (TEIXEIRA; GOMES; GOMES, 2011; BANERJEE et al., 2002; GAVIGAN; DALTON; BELL, 2001; FRANCIS; SULLIVAN JR.; GOLDBERG, 1997; GOLDBERG et al., 1990). Trabalhos já demonstraram o potencial antagonista de quinolínicos e seus derivados sobre a atividade destas enzimas onde a endocitose da hemoglobina é o primeiro alvo de ação de alguns antimaláricos quinolínicos. (CHUGH et al., 2013; ROBERTS et al., 2008; FAMIN; GINSBURG, 2002; ZARCHIN; KRUGLIAK; GINSBURG, 1986). Assim, atuando sobre a captação ou degradação da hemoglobina, estes quinolínicos provocariam a redução na quantidade de resíduo heme liberado e conseqüentemente menor cristalização deste em hemozoína. Essa redução na degradação da hemoglobina contribuiria ainda para um menor aporte de aminoácidos necessários para a síntese protéica dos parasitos, contribuindo diretamente para a inibição do seu desenvolvimento (KRUGLIAK; ZHANG; GINSBURG, 2002; GINSBURG; KRUGLIAK, 1988).

Entretanto, a toxicidade de alguns quinolínicos sobre *Plasmodium* sp. aparentemente é altamente dependente da proteólise da hemoglobina. Mungthin e colaboradores (1998) e Sullivan Jr. e colaboradores (1998) apresentam que a utilização de antagonistas de proteinases envolvidas na degradação da hemoglobina reduziu, significativamente, a ação de quinolínicos sobre o parasito, representada pela menor incorporação destes quinolínicos no pigmento malárico. Isso poderia ser justificado pela necessidade da liberação do heme na degradação da hemoglobina para mediar o estresse causado por esses fármacos aos parasitos.

Considerando a auto-catalização da formação de cristais de  $\beta$ -hematina em meio ácido, e os nossos achados que mostram a ausência de ação dos derivados em inibir a formação deste cristal, podemos inferir que o pH ácido não é suficiente para a sua atuação. Diferentemente, a cloroquina depende da diferença de pH entre

o meio intra e extra-vacúolo digestivo para seu acúmulo nesta organela e conseqüente inibição da formação de hemozoína (FOLEY; TILLEY, 1998).

Considerando a capacidade de BS 318 e BS 373 em inibir a formação de hemozoína, provavelmente ocasionado um acúmulo de heme livre no parasito, buscamos verificar se estas substâncias intermediariam eventos desestabilizadores do balanço redox no parasito. Visamos ainda elucidar o provável mecanismo de ação do BS 260, uma vez que esse quinolínico não foi capaz de inibir a formação de hemozoína em nenhuma das técnicas testadas.

Em *Plasmodium* sp. determinadas proteínas são dependentes de heme para sua síntese (NAGARAJ et al., 2009), embora grandes quantidades deste produto levem à morte do parasito. Apesar do grande acúmulo de hemozoína advinda da digestão da hemoglobina, o parasito realiza a biosíntese de heme com enzimas envolvidas neste processo encontradas no interior da mitocôndria do parasito (NAGARAJ et al., 2010; NAGARAJ et al., 2009; SATO; RANGACHARI; WILSON, 2003). O heme é uma molécula capaz de doar ou receber elétrons essa habilidade é utilizada através de muitas proteínas ligadas ao heme para a realização de vários processos metabólicos oxidativos (SIGALA; GOLDBERG, 2014), entretanto, o parasito apresenta limitada demanda heme e o acúmulo deste causa danos ao seu desenvolvimento.

Assim, os derivados quinolínicos BS 318 e BS 373 além de promoverem o estresse oxidativo por meio do acúmulo de heme no parasito, adicionalmente contribuiriam ainda para o colapso da função mitocondrial.

Dentre os três quinolínicos testados, o derivado BS 260 foi o único a não apresentar potencial inibidor sobre a formação de hemozoína no parasito, bem como se mostrou menos seletivo na comparação. Ainda, foi a única substância que proporcionou ao parasito a capacidade de recuperação do crescimento, quando o tratamento foi aplicado às culturas por 24 horas. Assim, a menor atividade deste quinolínico sobre *Plasmodium falciparum*, *in vitro*, pode estar relacionada à sua incapacidade de inibir a formação de hemozoína, bem como seu efeito reversível pode estar relacionado à necessidade de maiores concentrações da substância. Uma vez que a concentração testada foi muito próxima à IC<sub>50</sub> deste derivado, talvez fosse necessário maior tempo de incubação para a geração de um efeito que não apresente possibilidade de recuperação aos parasitos. Este último pode ainda ser

evidenciado pela irreversibilidade da ação do BS 260 quando o tratamento foi aplicado por 48 horas.

A microscopia eletrônica constitui uma valiosa ferramenta para a avaliação de modificações estruturais geradas após infecção por *Plasmodium* sp. (HASSEN; GOLDIE; TYLLEY, 2010; BANNISTER et al., 2004; BANNISTER et al., 2000 ), bem como pode auxiliar na identificação de potenciais alvos quimioterápicos.

Nossos achados ultra-estruturais nos parasitos tratados com o derivado quinolínico BS 373 são condizentes com os resultados obtidos nos experimentos realizados *in vitro*. A redução da quantidade e tamanho dos cristais de hemozoína formados em parasitos tratados com as substâncias indica a interferências destas na detoxificação do resíduo heme, como foi observado na quantificação do produto cristalizado em extratos dos parasitos tratados. Ainda, a presença de cristais no exterior do vacúolo pode ser indicativa de rompimento da membrana desta organela, possivelmente também causada pelas reações desencadeadas pelo heme livre.

Outro achado que corrobora a hipótese de que esta substância causa a morte do parasito mediada pela inibição da cristalização, está na presença de estruturas membranosas no interior do vacúolo digestivo. O heme não detoxificado gera radicais livres que ao interagir com organelas celulares resulta na oxidação de membranas e, consequentemente peroxidação lipídica (HAR-EL et al., 1993).

A autofagia configura-se como uma tentativa de auto-recuperação celular, de modo a conter o dano sofrido por estruturas, bem como reciclagem de nutrientes e aminoácidos essenciais para a manutenção da atividade celular (LEE; GIORDANO; ZHANG, 2012). Processo catabólico em resposta a diversas situações de estresse a exemplo da privação de nutrientes e estresse oxidativo (FILOMENI; ZIO; CECCONI, 2015), mas que também é citado como possível mecanismo de morte celular (TOTINO et al., 2008). A produção de radicais livres é conhecida como indutora de autofagia (CHEN; AZAD; GIBSON, 2009; CHEN; GIBSON 2008).

Espécies reativas são constantemente produzidas pelo metabolismo celular dentro de condições favoráveis de desenvolvimento (NAVERRO-YEPS et al., 2014), com a participação de diversas enzimas antioxidantes mantendo o equilíbrio redox dos sistemas envolvidos, a exemplo da glutatona redutase, tioredoxina redutase e superóxido dismutase, também encontradas em *Plasmodium falciparum* (VEGA-RODRIGUEZ et al., 2015; McCARTY et al., 2015; BOUCHER et al., 2006). Entretanto, a desestabilização do balanço redox, seja pelo aumento da produção de

radicais, ou pela inibição de moléculas envolvidas na detoxificação destes geram uma sequência de eventos que podem culminar com a morte da célula envolvida (NAVERRO-YEPS et al., 2014).

O processo autofágico em *Plasmodium* sp. é controverso entre os estudiosos, onde mesmo possuindo um número de genes relacionados à autofagia em células eucarióticas, ainda não está elucidada a real função deste processo (FILOMENI; ZIO; CECCONI, 2015; NAVALE et al., 2014; SINAI; ROEPE, 2012). Entretanto, alguns estudos apontam que *Plasmodium*, dentro de condições geradas pela presença de fármacos, apresenta um mecanismo de morte similar à autofagia (TOTINO et al., 2008).

No nosso trabalho, após o tratamento com o BS 373, indícios de processos autofágicos são encontrados tanto na presença de estruturas membranares dentro e na periferia do vacúolo digestivo, indicando fusão de compartimentos celulares com esta organela ácida que neste caso atuaria de forma semelhante ao lisossomo, importante organela no processo autofágico (TOTINO, 2008; REGGIORI, 2006), quanto pela indicativa presença de figuras de mielina e vacuolizações (MARINET; MEYER, 2008; MARINET et al., 2004).

Nossos dados de microscopia evidenciam a presença de diversas estruturas membranosas nas proximidades do vacúolo digestivo, bem como vacuolização citoplasmática após o tratamento com BS 373. Apesar o processo autofágico não ser bem caracterizado em *Plasmodium*, proteínas envolvidas neste evento, como PfATG8 e PfRAB7 importantes no processo de fusão de vesículas endossomais-lisossomo, neste caso aqui representado por vacúolo digestivo, são encontradas no parasito e relacionadas com a captação digestão de hemoglobina nesta organela, além de autofagia (HAIN; BOSCH, 2013; TOMLINS et al., 2013). Tomlins e colaboradores sugerem em seu trabalho que a privação de nutrientes, relacionada à inibição da digestão da hemoglobina pelo parasita, induziu a formação de autofagossomos e vesículas positivas para PfATG8 e PfRAB7 anteriormente à fusão destas vesículas com o vacúolo, chegando a conclusão de que o parasito entra em processo autofágico como resposta ao estresse nutricional.

Compostos quinolínicos são bases fracas com características lisossomotrópicas e já foi observado que bases fracas podem induzir a formação de vacúolos nas proximidades de organelas ácidas e a longo tempo esta vacuolização leva a morte celular (HIRUMA; KAWAKAMI, 2011). Os eventos envolvidos incluem

acumulação da base e de íons  $H^+$  nestes compartimentos ácidos, que juntamente com a entrada de íons  $Cl^-$ , contribuem para modificações na osmolaridade celular e a formação de vesículas autofágicas.

Em estudo realizado por Boya e colaboradores (2003), foi observado que células HeLa tratadas com hidroxicloroquina apresentaram uma fase inicial de morte celular semelhante à autofagia, que incluía desde sequestro de organelas em autofagossomos à vacuolização citoplasmática que, posteriormente, davam lugar a sinais de morte por apoptose. Ainda, observaram que o tratamento levou a permeabilização de membrana lisossomal, que em nossas observações pode ser relacionada à ruptura da membrana do vacúolo digestivo, bem como a participação deste composto na perda de potencial de membrana mitocondrial.

Assim como no trabalho supracitado, Seitz e colaboradores (2013) também observaram o papel da cloroquina em processos autofágicos anteriores à morte por apoptose em células neuroblásticas. Eles verificaram que o tratamento com CQ leva a um acúmulo desta em lisossomos, seguida da permeabilização da membrana desta estrutura, bem como sinais de perda de função mitocondrial. O tratamento empregado nestas células foi mostrado por inibir a maturação de autofagolisossomos contribuindo para apoptose. De forma semelhante, Chaanine e colaboradores (2015) observaram que cloroquina atua na morte em cardiomiócitos com similar mecanismo envolvendo ruptura de membrana de lisossomos, perda de função mitocondrial e posterior morte por apoptose.

Gaviria e colaboradores (2013) avaliaram fatores relacionados à resistência de cepas de *Plasmodium falciparum* a efeitos a concentrações citostáticas e citotóxicas da cloroquina. Eles verificaram que os efeitos citotóxicos da cloroquina estão relacionados a eventos autofágicos e que estes são modificados em parasitos resistentes ao fármaco. Com os resultados eles concluem que a resistência apresentada pelos plasmódios é influenciada tanto por eventos fisiológicos e genéticos, que contribuem para mutações na proteína PfCRT, encontrada na membrana vacúolo digestivo. Eles ainda sugerem que esses processos, incluem alterações que apresentam semelhanças com autofagia, indicando alterações na via autofágica que culmina com a resistência. Por fim os autores concluem que para o desenvolvimento de resistência aos efeitos citotóxicos da cloroquina, primeiramente os parasitos precisariam ser expostos a uma concentração citostática do fármaco, como a  $IC_{50}$ , e após conseguirem sobreviver via mutações na proteína

transportadora, poderiam sobreviver a concentrações mais letais, via mutações adquiridas por processos autofágicos.

Assim, nossos achados indicam um processo autofágico no parasito, como consequência da degradação dos componentes celulares provocada por um possível estresse oxidativo gerado, indicando que o parasito estaria passando por um processo de reparação celular ou mesmo de morte. Neste mecanismo autofágico, o vacúolo digestivo exerceria papel de lisossomo, responsável por degradação de material, o que pode justificar a presença de cristais de hemozoína em vacúolos aparentemente autofágicos.

A inibição dos processos que levam à digestão da hemoglobina é outro mecanismo envolvido na ação deste derivado quinolínic observado em microscopia. Uma vez que o parasito necessita dos aminoácidos gerados pela degradação desta proteína contida no citoplasma da célula hospedeira para a síntese de suas próprias proteínas, entre outros processos metabólicos, uma consequência da interação das substâncias neste processo seria um menor aporte de materiais para a síntese proteica que é evidenciado na redução do volume celular dos parasitos, bem como na ausência da cristalização do pigmento malárico.

Com base nos dados encontrados pode-se sugerir que a diminuição da cristalização de hemozoína nos parasitos pode estar relacionada ao bloqueio digestão da hemoglobina, por inibição da atividade de moléculas envolvidas no processo catalítico como plasmepsinas e falcipainas (SIGALA; GOLDBERG, 2014; FRANCIS; SULLIVAN; GOLDBERG, 1997), ou ainda pelo bloqueio da cristalização do resíduo heme em hemozoína. Considerando a conversão de heme em hemozoína, nossos dados sugerem que a atividade dos quinolínicos esteja relacionada à interação destas substâncias com intermediadores da biocristalização, como sugerido ocorrer através de gotículas lipídicas (HOANG et al., 2010; AMBELE; EGAN, 2012; KAPISHNIKOV et al., 2012), enzimas (CORONADO et al., 2014) e até mesmo cristais pré-formados (CHEN; SHI; SULLIVAN JR., 2001), sendo a alcalinização do vacúolo insuficiente para explicar nossos achados.

Uma vez que a hemoglobina é digerida e o resíduo heme formado, não ocorrendo a formação da hemozoína, o heme livre configura uma molécula bastante reativa (GORKA; DIOS; ROEPE, 2013) contribuindo para oxidação de membranas que podem explicar a ocorrência de descontinuidade de membrana no vacúolo digestivo observada pela microscopia eletrônica de transmissão, que culminaria com

a presença de cristais de hemozoína fora desta organela, bem como alteração do pH celular e, conseqüentemente, sua desestruturação celular. Este mesmo resíduo heme ainda pode reagir com membranas da mitocôndria, contribuindo para a despolarização do potencial mitocondrial e produção de radicais superóxido (GORKA; DIOS; ROEPE, 2013; WUNDERLICH; ROHRBACH; DALTON, 2012; KAUR et al., 2010; FOLEY; TILLEY, 1997). Todos os eventos culminariam com processos com características autofágicas observadas nos nossos tratados.

## 7. CONCLUSÕES

O derivado quinolínico BS 373 foi o que apresentou melhor atividade frente à *Plasmodium falciparum*, *in vitro*, referente à potência da substância.

Dentre os derivados testados, BS 318 e BS 373 foram capazes de inibir a formação de hemozoína em parasitos tratados, mas não apresentaram padrão de inibição quando utilizado o modelo livre de células utilizando cloreto de hemina.

A atuação das substâncias pode estar relacionada com a produção de estresse oxidativo possivelmente gerado pelo resíduo heme.

As alterações estruturais encontradas nos parasitos tratados com o quinolínico BS 373 um processo autofágico de recuperação ou morte celular, que pode culminar com processo apoptótico e que o vacúolo digestivo em *Plasmodium* atuaria de forma semelhante aos lisossomos no que diz respeito à autofagia.

Nossos resultados mostram que substâncias da classe dos quinolínicos continuam a ser promissoras como potenciais agentes antimaláricos, entretanto são necessários estudos mais aprofundados que abordem seu mecanismo de ação em modelos *in vivo*, bem como a possibilidade de combinar esse derivados com outras classes de moléculas com conhecida atividade antimalárica, visando reduzir a IC<sub>50</sub> e aumentar a seletividade.

## 8. REFERÊNCIAS

AGUIAR, A. C. C. et al. Antimalarial activity and mechanisms of action of two novel 4-aminoquinolines against chloroquine-resistant parasites. **PLoS ONE**, v. 7 n. 5, 2012.

AKAGAH, B. et al. Oxidation of antiparasitic 2-substituted quinolines using metalloporphyrin catalysts: scale-up of a biomimetic reaction for metabolite production of drug candidates. **Organic; Biomolecular Chemistry**, v.6, n. 24, p. 4494–4497, 2008.

AMBELE, M. A.; EGAN, T. J. Neutral lipids associated with haemozoin mediate efficient and rapid  $\beta$ -haematin formation at physiological pH, temperature and ionic composition. **Malaria Journal**, v. 11, n. 337, p. 1-13, 2012.

ANTINORI, S. et al. Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v.4 n.1, p.1-10, 2012.

ATAMNA, H.; GINSBURG, H. The malaria parasite supplies glutathione to its host cell Investigation of glutathione transport and metabolism in human erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. **European Journal of Biochemistry**, v. 250, n. 3, p. 670-679, 1997.

AYIMBA, E. et al. Proinflammatory and regulatory cytokines and chemokines in infants with uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. **Clinical and experimental immunology**, v.166, n. 2, p.218-226, 2011.

BALAJI, S.N.; TRIVEDI, V. Methemoglobin incites primaquine toxicity through single-electron oxidation and modification. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 24, n. 2, p. 105–114, 2013.

BANERJEE, R. et al. Four plasmepsins are active in the *Plasmodium falciparum* food vacuole, including a protease with an active-site histidine. **PNAS**, v. 99, n. 2, p. 990-995, 2002.

BANNISTER, L. H. et al. A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. **Parasitology Today**, v. 16, n. 10, p. 427-433, 2000.

BANNISTER, L. H. et al. Three-dimensional ultrastructure of the ring stage of *Plasmodium falciparum*: Evidence for export pathways. **Microscopy and Microanalysis**, v. 10, n. 5, p. 551–562, 2004.

BASORE, K. et al. How do antimalarial drugs reach their intracellular targets? **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, p. 1-7. 2015.

BASILICO, N. et al. A microtitre-based method for measuring the haem polymerization inhibitory activity (HPIA) of antimalarial drugs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, n. 1, p. 55–60, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Vigilância Sanitária. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011. **Boletim Epidemiológico**, v. 44, n.1, p. 1-16, 2013.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. **Mortes por malária diminuiram 20% na última década, segundo OMS**. Portal Brasil, 2011. Disponível em: < > . Acesso em: 23 jun. 2015.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. **Mapa de risco de malária por município**. Portal Saúde, SUS. 2015. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/jpg/2015/junho/24/Mapa-de-risco-2014.jpg>>. Acesso em: 22 jul. 2015.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. **Situação Epidemiológica da malária no Brasil. Dados**. Portal Saúde, SUS. 2015. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11346-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em: 30 jun. 2015.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. **Malária**. Portal Saúde, SUS. 2015. Disponível em: <[http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=10933&Itemid=646](http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=10933&Itemid=646)><[http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=10933&Itemid=646](http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=10933&Itemid=646)>. Acesso em: 01 jun. 2015.

BECKER, K. et al. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host–parasite interactions. **International Journal for Parasitology**, v. 34,n. 2, p. 163–189, 2004.

BIAGINI, G. A. et al. Generation of quinolone antimalarials targeting the *Plasmodium falciparum* mitochondrial respiratory chain for the treatment and prophylaxis of malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 21, p. 8298–8303, 2012.

BOHLE, D. S. et al. Characterization of the products of the heme detoxification pathway in malarial late trophozoites by X-ray diffraction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 2, p. 713–716, 1997.

BOUCHER, I. W. et al. The crystal structure of superoxide dismutase from *Plasmodium falciparum*. **BMC Structural Biology**, v. 6, n. 20, p. 1-10, 2006.

BOYA, P. et al. Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. **Oncogene**, v. 22, n. 25, p. 3927–3936, 2003.

BURGESS, S. J. et al. Synthesis, structure-activity relationship, and mode-of-action studies of antimalarial reversed chloroquine compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 17, p. 6477-6489, 2010.

CAMBRIDGE UNIVERSITY LIBRARY. **Cinchona**: a short history. 2014. Disponível em: <<http://www.lib.cam.ac.uk/deptserv/rcs/cinchona.html>>. Acesso em: 01 jan. 2014.

CAMPANALE, N. et al. Identification and characterization of heme-interacting proteins in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 30, p. 27354–27361, 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Where malaria occurs**. 2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html>>. Acesso em: 15 mar. 2014.

\_\_\_\_\_. **Anopheles mosquitoes**. 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/>>. Acesso em: 24 jan. 2015.

\_\_\_\_\_. **Malaria Map. Application**. 2014. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/malaria/map/index.html>> Acesso em: 20 mar. 2015.

\_\_\_\_\_. **Brazil, Goiás and Rio de Janeiro States: Increase in Malaria**. 2015. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/malaria/new\\_info/2015/malariabrazil\\_march2015.htm](http://www.cdc.gov/malaria/new_info/2015/malariabrazil_march2015.htm)>. Acesso em: 25 mai. 2015.

CHAANINE, A.H. et al. High-dose chloroquine is metabolically cardiotoxic by inducing lysosomes and mitochondria dysfunction in a rat model of pressure overload hypertrophy. **Physiological Reports**, v. 3, n. 7, p. 1-18, 2015.

CHEN, Y.; AZAD, M. B.; GIBSON, S. B. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 7, p. 1040–1052, 2009.

CHEN, Y.; GIBSON, S. B. Is mitochondrial generation of reactive oxygen species a trigger for autophagy? **Autophagy**, v. 4, n. 2, p. 246-248, 2008.

CHEN, M. M.; SHI, L.; SULLIVAN JR., D. J. *Haemoproteus* and *Schistosoma* synthesize heme polymers similar to *Plasmodium* hemozoin and  $\beta$ -hematin. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 113, n. 1, p. 1–8, 2001.

CHIN, W. et al. A naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys. **Science**, v. 149, n. 3686, p. 865, 1965.

CHUGH, M. et al. Protein complex directs hemoglobin-to-hemozoin formation in *Plasmodium falciparum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 4, p. 5392-5397, 2013.

CORONADO, L. M.; NADOVICH, C. T.; SPADAFORA, C. Malarial hemozoin: from target to tool. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1840, n. 6, p. 2032–2041, 2014.

COWMAN, A. F.; FOOTE, S. J. Chemotherapy and drug resistance in malaria. **International Journal for Parasitology**, v. 20, n. 4, p. 503-513, 1990.

COX, F. E. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasites; Vectors**, v.1, n.3, p. 1-5, 2010.

CUNHA, C. B.; CUNHA, B. A. Brief history of the clinical diagnosis of malaria: from Hippocrates to Osler. **Vector Borne Disease**, v. 45, n. 3, p. 194–199, 2008.

DECHY-CABARET, O.; BENOIT-VICAL, F. Effects of antimalarial molecules on the gametocyte stage of *Plasmodium falciparum*: the debate. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 23, p. 10328–10344, 2012.

DESJARDINS, R. et al. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.16, n. 6, p. 710-718, 1979.

DESRIVOT, J. et al. Development of a SPE/HPLC/DAD method for the determination of antileishmanial 2-substituted quinolines and metabolites in rat plasma. **Journal of Chromatography B**, n. 854, p. 230–238, 2007a.

DESRIVOT, J. et al. Metabolism of 2-substituted quinolines with antileishmanial activity studied in vitro with liver microsomes, hepatocytes and recombinantly expressed enzymes analyzed by LC/MS. **Toxicology**, v. 235, n. 1, p. 27–38, 2007b.

DESRIVOT, J. et al. Antileishmanial 2-substituted quinolines: In vitro behavior towards biological components. **Biomedicine; Pharmacotherapy**, v. 61, n. 7, p. 441-450, 2007c.

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

EGAN, T. J. et al. Structure-function relationships in aminoquinolines: effect of amino and chloro groups on quinoline-hematin complex formation, inhibition of beta-hematin formation, and antiplasmodial activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 43, n. 2, p. 283-291, 2000.

EGAN, T. J.; ROSS, D. C.; ADAMS, P. A. Quinoline anti-malarial drugs inhibit spontaneous formation of beta-haematin (malaria pigment). **Federation of European Biochemical Societies**, v. 352, n. 1, p. 54-57, 1994.

EGGLESON, K. K.; DUFFIN, K. L.; GOLDBERG, D. E. Identification and characterization of falcilysin, a metallopeptidase involved in hemoglobin catabolism within the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 45, p. 32411–32417, 1999.

EYLES, D. E.; COATNEY, G. R.; GETZ, M. E. Vivax-type malaria parasite of macaques transmissible to man. **Science**, v.131, n. 3416, pp. 1812–1813, 1960.

FAKHFAKH, M. A. et al. Synthesis and biological evaluation of substituted quinolines: potential treatment of protozoal and retroviral co-infections. **Bioorganic; Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 23, p. 5013–5023, 2003.

- FAMIN, O.; GINSBURG, H. Differential effects of 4-aminoquinoline-containing antimalarial drugs on hemoglobin digestion in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, n. 3, p. 393-398, 2002.
- FAMIN, O.; KRUGLIAK, M.; GINSBURG, H. Kinetics of Inhibition of Glutathione-Mediated Degradation of Ferriprotoporphyrin IX by Antimalarial Drugs. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, n. 1, p. 59–68, 1999.
- FILOMENI, G.; ZIO, D.; CECCONI, F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 3, p. 377–388, 2015.
- FITCH, C. D. et al. Involvement of lipids in ferriprotoporphyrin IX polymerization in malaria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1454, p. 31-37, 1999.
- FOLEY, M.; TILLEY, L. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n. 2, p. 231-240. 1997.
- FOLEY, M.; TILLEY, L. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. **Pharmacology Therapy**, v. 79, n. 1, p. 55-87, 1998.
- FOURNET, A. et al. Substituted Quinolines induce inhibition of proliferation of HTLV-1 infected cells. **Bioorganic; Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 5, p. 891–894, 2002.
- FRANCIS, S. E.; SULLIVAN, JR., D.J.; GOLDBERG, D. E. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Annual Review of Microbiology**, v. 51, p. 97–123, 1997.
- GAVIGAN, C. S.; DALTON, J. P.; BELL, A. The role of aminopeptidases in haemoglobin degradation in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Molecular; Biochemical Parasitology**, v. 117, n. 1, p. 37–48, 2001.
- GAVIRIA, D. et al. A process similar to autophagy is associated with cytocidal chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. **PLOS ONE**, v.8, n. 11, p. 1-14, 2013.
- GINSBURG, H.; GOLENSER, J. Glutathione is involved in the antimalarial action of chloroquine and its modulation affects drug sensitivity of human and murine species of *Plasmodium*. **Redox report**, v. 8, n. 5, p. 276-279, 2003.
- GINSBURG, H. et al. Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme By chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, n. 10, p. 1305–1313, 1998.
- GINSBURG, H.; KRUGLIAK, M. Effects of quinoline-containing antimalarials on the erythrocyte membrane and their significance to drug action on *Plasmodium falciparum*. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, n. 10, p. 2013-2018, 1988.
- GOLDBERG, D. E. et al. Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: An ordered process in a unique organelle. **Biochemistry**, v. 87, n. 8, p. 2931-2935, 1990.

- GOLENSER, J. et al. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 14, p. 1427-1441, 2006.
- GORKA, A. P.; DIOS, A.L de; ROEPE, P. D. Quinoline drug-heme interactions and implications for antimalarial cytostatic versus cytotoxic activities. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 13, p. 5231-5246, 2013.
- HAIN, A. U. P.; BOSCH, J. Autophagy in *Plasmodium*, a multifunctional pathway? **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 8, n. 11, p. 1-9, 2013.
- HALDAR, K. et al. Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. **Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease**, v. 2, p. 217-249, 2007.
- HAR-EL, R. et al. Is heme responsible for the susceptibility of plasmodia to oxidant stress? **Free radical research communications**, v. 18, n. 5, p. 279-290, 1993.
- HIRUMA, H.; KAWAKAMI, T. Characteristics of weak base-induced vacuoles formed around individual acidic organelles. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 49, n. 2, p. 272-279, 2011.
- HOANG, A. N. et al. Crystallization of synthetic haemozoin ( $\beta$ -haematin) nucleated at the surface of lipid particles. **Dalton Transactions**, v. 39, n. 5, p. 1235-1244, 2010.
- ITTARAT, I.; ASAWAMAHASAKDA, W.; MESHNICK, S. R. The effects of antimalarials on the *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase. **Experimental Parasitology**, v. 79, n. 1, p.50-56, 1994.
- HANSEN, E.; GOLDIE, K. N.; TILLEY, L. Ultrastructure of the Asexual Blood Stages of *Plasmodium falciparum*. **Methods in Cell Biology**, capítulo 5, v. 96, p. 93-116, 2010.
- HUY, N. T. et al. Neutralization of toxic heme by *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2. **The Journal of Biochemistry**, v. 133, n. 5, p. 693-698, 2003.
- KAPISHNIKOV, S. et al. Oriented nucleation of hemozoin at the digestive vacuole membrane in *Plasmodium falciparum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 28, p. 11188-11193, 2012.
- KAUR, H. et al. Synthesis, antiplasmodial activity and mechanistic studies of pyrimidine-5-carbonitrile and quinoline hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 52-62, 2015.
- KAUR, K. et al. Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n.8, p. 3245-3264, 2010.
- KLAYMAN, D. L. Qinghaosu (Artemisinin): an antimalarial drug from China. **Science**, v. 228, n. 4703, p. 1049-1056, 1985.

- KRAFTS, K.; HEMPELMANN, E.; SKÓRSKA-STANIA, A. From methylene blue to chloroquine: a brief review of the development of an antimalarial therapy. **Parasitology Research**, v.111, n. 1, p. 1–6, 2012.
- KRISHNA, S.; UHLEMANN, A.; HAYNES, R. K. Artemisinins: mechanisms of action and potential for resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 4-5, p. 233–244, 2004.
- KRUGLIAK, M.; ZHANG, J.; GINSBURG, H. Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 119, n. 2, p. 249–256, 2002.
- LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **Journal of Parasitology**, v. 65, n. 3, p. 418–420, 1979.
- LEE, Y. J. et al. Molecular Mechanism of SAHA on regulation of autophagic cell death in tamoxifen-resistant MCF-7 breast cancer cells. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 10, p. 881-893, 2012.
- LEE, J.; GIORDANO, S.; ZHANG, J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling. **Biochemical Journal**, v. 441, n. 2, p. 523-540, 2012.
- LEWISON, G.; SRIVASTAVA, D. Malaria research, 1980-2004, and the burden of disease. **Acta Tropica**, v. 106, n. 2, p. 96-103, 2008.
- MCCARTY, S. E. et al. *Plasmodium falciparum* thioredoxin reductase (PfTrxR) and its role as a target for new antimalarial discovery. **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 11459-11473, 2015.
- MARELLA, A. et al. Quinoline: A versatile heterocyclic. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 1, p. 1-12, 2013.
- MARTINET, W. et al. 7-Ketocholesterol induces protein ubiquitination, myelin figure formation, and light chain 3 processing in vascular smooth muscle cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n. 12, p. 2296-2301, 2004.
- MARTINET, W.; MEYER, G. R.Y. DE. Autophagy in atherosclerosis a cell survival and death phenomenon with therapeutic potential. **Circulation Research**, v. 104, n. 3, p. 304-317, 2009.
- MEN, T. T. et al. A simple and inexpensive haemozoin-based colorimetric method to evaluate anti-malarial drug activity. **Malaria Journal**, v. 11, n. 272, p. 1-5, 2012
- MESHNICK, S. R.; DOBSON, M. J. **The history of antimalarial drugs**. In: ROSENTHAL, P. J. Antimalaria chemotherapy: mechanisms of action, resistance, and new directions in drug discovery. XI, 396 p., Hardcover, 2001.
- MILLER, L. H. et al. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nature**, v. 19, n. 2, p. 156-167, 2013.

MILLER, L. H.; GOOD, M. F.; MILON, G. Malaria pathogenesis. **Science**, v. 264, n. 5167, p. 1878-1883, 1994.

MUNGTHIN, M. et al. Central role of hemoglobin degradation in mechanisms of action of 4-aminoquinolines, quinoline methanols, and phenanthrene methanols. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 11, p. 2973–2977, 1998.

NAGARAJ, V. A. et al. Mitochondrial localization of functional ferrochelatase from *Plasmodium falciparum*. **Molecular; Biochemical Parasitology**, v. 168, n. 1, p. 109–112, 2009.

NAGARAJ, V. A. et al. Protoporphyrinogen IX oxidase from *Plasmodium falciparum* is anaerobic and is localized to the mitochondrion. **Molecular; Biochemical Parasitology**, v. 174, n. 1, p. 44–52, 2010.

NAM, J. et al. Magnetic separation of malaria-infected red blood cells in various developmental stages. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 15, p. 7316-7323, 2013.

NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES. NIAID. Understanding malaria: fighting an ancient scourge. **NIAID Science Education**, n. 07-7139, 32 p., 2007.

NAVALE, R. et al. Characterization of the autophagy marker protein Atg8 reveals atypical features of autophagy in *Plasmodium falciparum*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1-36, 2014.

NAVARRO-YEPES, J. et al. Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. **Antioxidants; Redox Signaling**, v. 21, n. 1, 2014.

NWAKA, S. et al. Advancing drug innovation for neglected diseases — criteria for lead progression. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 8, p. 1-13, 2009.

OCKENHOUSE, C. F. et al. History of U.S. Military contributions to the study of malaria. **Military Medicine**, v. 170, n. 4, p. 4-12, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **World Malaria Report**. Switzerland, 2014, 242 p.

\_\_\_\_\_. **Guidelines for registration of fixed-dose combination medicinal products**. WHO Expert committee on specifications for pharmaceutical Preparations. Geneva, 2005, 50 p.

OLIVEIRA, M.F. et al. Haemozoin formation in the midgut of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*, **Federation of European Biochemical Societies**, v. 477, n. 1-2, p. 95-98, 2000.

OLIVER, M. et al. Malarial pigment hemozoin and the innate inflammatory response. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 25, p. 1-10, 2014.

ORJIH, A. U.; MATHEW, T. C.; CHERIAN, P. T. Erythrocyte membranes convert monomeric ferriprotoporphyrin IX to  $\beta$ -hematin in acidic environment at malarial fever temperature. **Experimental Biology and Medicine**, v. 237, n. 8, p. 884–893, 2012.

PARAPINI, S. et al. Evidence that haem iron in the malaria parasite is not needed for the antimalarial effects of artemisinin. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 575, n. 1-3, p. 91–94, 2004.

PISCIOTTA, J. M. et al. The role of neutral lipid nanospheres in *Plasmodium falciparum* haem crystallization. **Biochemistry Journal**, v. 402, n. 1, p. 197–204, 2007.

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

RAYNES, K. et al. Novel bisquinoline antimalarials: synthesis, antimalarial activity, and inhibition of haem polymerization. **Biochemical Pharmacology**, v. 52, n. 4, p. 551–559, 1996.

REBELO, M. et al. A novel flow cytometric hemozoin detection assay for real-time sensitivity testing of *Plasmodium falciparum*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1-12, 2013.

REGGIORI, F. 1. Membrane origin for autophagy. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 74, p. 1-30, 2006

RIDLEY, R. G. et al. Haematin (haem) polymerization and its inhibition by quinoline antimalarials. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 91, n. 5, p. 559-566, 1997.

ROBERTS, L. et al. Differential effects of quinoline antimalarials on endocytosis in *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 1840–1842, 2008

SACHS, J.; MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 680-685, 2002.

SALLARES, R. **Malaria and Rome**. Oxford University Press Inc., New York, 2005, 358 p.

SANTOS, G.; TORRES, N. V. New targets for drug discovery against malaria. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. 1-14, 2013.

SATO, S.; RANGACHARI, K.; WILSON, R. J. M. I. Targeting GFP to the malarial mitochondrion. **Molecular; Biochemical Parasitology**, v. 130, n. 2, p. 155–158, 2003.

SHANKS, G. D. Malaria chemoprophylaxis for the long-term traveler insoutheast Asia. **Journal of Travel Medicine**, v. 1, n. 4, p. 181-183. 1994.

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO. **Boletim epidemiológico malária 001/2015**. Disponível em: <<http://www.cib.rj.gov.br/arquivos-para-baixar/anexos/1576--15/file.html>>. Acesso em: 28.07.2015.

SEITZ, C. et al. The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 and chloroquine

synergize to trigger apoptosis via mitochondrial-lysosomal cross-talk. **International Journal of Cancer**, v. 132, n. 11, p. 2682–2693, 2013.

SIGALA, P. A.; GOLDBERG, D. E. The peculiarities and paradoxes of *Plasmodium* heme metabolism. **Annual Reviews Microbiology**, v. 68, p. 259–278, 2014.

SIMPSON, J. A. et al. Population dynamics of untreated *Plasmodium falciparum* malaria within the adult human host during the expansion phase of the infection. **Parasitology**, v. 124, n. 3, p. 247–263, 2002.

SINAI, A. P.; ROEPE, P. D. Autophagy in apicomplexa: a life sustaining death mechanism? **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 358–364, 2012.

SINHA, S.; MEDHI, B.; SEHGAL, R. Challenges of drug-resistant malaria. **Parasite**, v. 21, n. 61, p. 1-15, 2014.

SINKA, M. E. et al. A global map of dominant malaria vectors. **Parasite Vectors**, v. 5, n. 69, p. 1-11, 2012.

SOARES, J. B. et al. Interference with hemozoin formation represents an important mechanism of schistosomicidal action of antimalarial quinoline methanols. **PLOS Neglected and Tropical Disease**, v. 3, n. 7, p. 1-16, 2009.

SOARES, J. B. et al. Extracellular lipid droplets promote hemozoin crystallization in the gut of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **FEBS Letters**, v. 581, n. 9, p. 1742-1750, 2007.

SIRAJ, A. S. et al. Altitudinal changes in malaria incidence in highlands of Ethiopia and Colombia. **Science**, v. 343, n. 6175, p. 1154-1158, 2014.

SRIVASTAVA, I. K.; ROTTENBERG, H.; VAIDYA, A. B. Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 7, pp. 3961–3966, 1997.

SOARES, R. R. New quinoline derivatives demonstrate a promising antimalarial activity against *Plasmodium falciparum in vitro* and *Plasmodium berghei in vivo*. **Bioorganic; Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 11, p. 2308–2313, 2015.

STANTON, R. C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. **IUBMB Life**, v. 64, n. 5, p. 362-369, 2012.

SULLIVAN JR., D. J. et al. A common mechanism for blockade of heme polymerization by antimalarial quinolines. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 47, p. 31103–31107, 1998.

SULLIVAN JR., D. J.; GLUZMAN, I. Y.; GOLDBERG, D. E. *Plasmodium* hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. **Science**, v. 271, n. 5246, p. 219-222, 1996.

TA, T. H. et al. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. **Malaria Journal**, v.13, n. 68, p. 1-7, 2014.

TANGNITIPONG, S. et al. Extracellular heme enhances the antimalarial activity of artemisinin. **Biological; Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 1, p. 29-33, 2012.

TEIXEIRA, C.; GOMES, J. R. B.; GOMES, P. Falcipains, *Plasmodium falciparum* cysteine proteases as key drug targets against malaria. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 10, p. 1555-1572, 2011.

THOME, R. et al. Chloroquine: modes of action of an undervalued drug. **Immunology Letters**, v. 153, n.1-2, p. 50-57, 2013.

TOMLINS, A. M. et al. *Plasmodium falciparum* ATG8 implicated in both autophagy and apicoplast formation. **Autophagy**, v. 9, n. 10, p. 1540–1552, 2013.

TOTINO, P. R. R. et al. *Plasmodium falciparum*: erythrocytic stages die by autophagic-like cell death under drug pressure. **Experimental Parasitology**, v. 118, n.4, p. 478–486, 2008.

TRAGER, W.; JENSEN, J. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, n. 4254, p. 673-675, 1976.

VALDERRAMOS, S.G.; FIDOCK, D. A. Transporters involved in resistance to antimalarial drugs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 11, p. 594–601, 2006.

VEGA-RODRÍGUEZ, J. et al. Implications of glutathione levels in the *Plasmodium berghei* response to chloroquine and artemisinin. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1-15, 2015.

VIEIRA, N. C. et al. Selection of the most promising 2-substituted quinoline as antileishmanial candidate for clinical trials. **Biomedicine; Pharmacotherapy**, v. 62, n. 10, 2008.

WANG, C. et al. Hemolysis of human erythrocytes induced by melamine-cyanurate complex. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 402, n. 4, p. 773–777, 2010.

WHITE, N. J. et al. Malaria. **The Lancet**, v. 383, n. 9918, p. 723-735, 2014.

WILSON, C. M. et al. Amplification of *pfmdr 1* associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 57, n. 1, p. 151-160, 1993.

WONGSRICHANALAI, C. et al. Epidemiology of drug-resistant malaria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 4, p. 209-219, 2002.

WUNDERLICH, J.; ROHRBACH, P.; DALTON, J. P. The malaria digestive vacuole. **Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)**, v. 4, p. 1424-1448, 2012.

ZARCHIN, S.; KRUGLIAK, M.; GINSBURG, H. Digestion of the host erythrocyte by malaria parasites is the primary target for quinoline-containing antimalarials. **Biochemical Pharmacology**, v. 35, n. 14, p. 2435-2442, 1986.