

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE COMPLEXOS METÁLICOS COM
AMODIAQUINA PARA O TRATAMENTO DA MALÁRIA EXPERIMENTAL

MARIANA DA CRUZ BORGES SILVA

Salvador – Bahia

2019

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

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

AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE COMPLEXOS METÁLICOS COM
AMODIAQUINA PARA O TRATAMENTO DA MALÁRIA EXPERIMENTAL

MARIANA DA CRUZ BORGES SILVA

Orientador: Dr. Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira

Co-Orientadora: Dr^a. Milena Botelho Pereira Soares

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do grau em Mestre.

Salvador – Bahia

2019

"AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE COMPLEXOS METÁLICOS COM AMODIAQUINA PARA O TRATAMENTO DA MALÁRIA."

MARIANA DA CRUZ BORGES SILVA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 25 de julho de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Cristiane Flora Villarreal
Professora Permanente
UFBA



Dr. Leonardo Paiva Farias
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos a **DEUS**, por me dar o dom da vida, ser o meu porto seguro e me erguer em todos os momentos de desânimo.

Aos **meus pais**, Newma e José, minha eterna gratidão. Sou o espelho da educação que me deram. Sempre pacientes persistentes e confiantes em dias melhores. Obrigada por todo o apoio durante o caminho que escolhi trilhar. O amor que sinto por vocês não consegue ser descrito.

À **minha irmã**, Havana, por ser a minha melhor amiga, o meu escudo, minha proteção e o meu grande amor. Seu equilíbrio é o meu.

Ao **meu orientador** e amigo, Dr. Diogo, que desde a iniciação científica me dá todo apoio, suporte, ensinamentos e oportunidades possíveis. Não tenho palavras para agradecer tudo que você já proporcionou na minha vida profissional. Sei que eu não poderia ter feito escolha melhor. Gratidão.

À **minha co-orientadora**, Dr^a Milena, por todos os ensinamentos, atenção, torcida e carinho nesse período.

Ao professor **Dr. Alzir Azevedo** e **Dr^a. Legna Colina**, da Universidade Federal de São Carlos, pela síntese e envio dos fármacos.

Ao professor **Dr. Miguel Prudêncio** e sua aluna **Dr^a. Diana Fontinha**, da Universidade de Lisboa, pela oportunidade de visitar e integrar o seu grupo de pesquisa mesmo que por poucas semanas em Lisboa. O aprendizado adquirido jamais será esquecido.

Ao **malária team** (Carol, Bruno, Rômulo, Helenita, Adrielle e Camila), pela amizade, ajuda, aprendizados e momentos de descontração nos exaustivos experimentos.

Ao **Dr. Cássio Meira**, pela amizade, companheirismo, lições, oportunidades e contribuições de importância valiosa ao meu trabalho.

Ao **Msc. Renan Fernandes**, por toda ajuda que sempre foi oferecida de forma espontânea e genuína. Muito obrigada!

À **Clarissa Cunha**, pela ajuda imprescindível na cultura de plasmódio. Obrigada pela paciência e disponibilidade em compartilhar suas experiências!

Aos **meus amigos do LETI**, melhor laboratório do Norte-Nordeste. Obrigada pela parceria e amizade que criamos! Ninguém é feliz sozinho, e tenho muita sorte de viver diariamente rodeada de amor.

À **minha família** de forma geral, pelo suporte, carinho e amor.

Aos **meus amigos** da faculdade e da vida, não tenho palavras. Todo dia recebo comentários de como sou rodeada de gente do bem, e graças a Deus são muitos! Tenho muito orgulho de vocês.

À **Plataforma de Citometria de Fluxo** e sua equipe, por sempre me ajudarem e socorrerem nos infinitos experimentos GFP.

À **Biblioteca** e todos os colaboradores, por auxílio nos momentos de estudo e finalização da dissertação.

À **Fiocruz**, por disponibilizar todos os meios possíveis para viabilizar esse trabalho e por ser a minha segunda casa nos últimos 6 anos.

Às **agências financiadoras** do projeto FAPESB, CNPq e CAPES.

SILVA, Mariana da Cruz Borges. Avaliação farmacológica de complexos metálicos com amodiaquina para o tratamento da malária experimental. 2019. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A malária, doença grave e complexa, tem impactos significativos no mundo, particularmente na África, América do Sul e Ásia, onde atualmente se dissemina por milhões de pessoas e é uma das principais causas de morte decorrentes de doenças infecciosas. A resistência aos antimaláricos disponíveis agravou o cenário mundial do tratamento da doença, tornando necessário o desenvolvimento de novos agentes com atividade antiparasitária e que atuem em estágios diversos do ciclo de vida do *Plasmodium* spp. Nosso grupo de pesquisa tem demonstrado nos últimos anos, atividade antiparasitária potente de complexos metálicos conjugados a antimaláricos. **OBJETIVO:** No presente trabalho, três complexos de rutênio (RuAQ, RuPAQ e RubipyAQ) e um complexo de ouro (AuPAQ) conjugados à amodiaquina (AQ) foram avaliados quanto à atividade antiparasitária *in vitro*, utilizando a cepa W2 de *P. falciparum*. **MATERIAL E MÉTODOS E RESULTADOS:** Os complexos de rutênio e ouro mostraram atividade antiparasitária *in vitro*, com valores de CI₅₀ próximos ou menores que os demonstrados com a amodiaquina sozinha, e também tiveram baixa citotoxicidade quando testados em culturas de J774 e HepG2 (células de mamíferos). Os complexos AuPAQ e RuPAQ apresentaram atividade potente frente a esporozoítos de *P. berghei*, caracterizando um perfil multiestágio desses complexos. Esses complexos apresentaram atividade potente contra as formas sexuadas do *P. falciparum*, os gametócitos, quando comparados com a AQ. Os compostos AuPAQ e RuPAQ foram testados *in vivo* em camundongos da linhagem Swiss Webster infectados com a cepa NK65 de *P. berghei*. No modelo de supressão da infecção por *P. berghei in vivo*, os animais tratados com AuPAQ e RuPAQ apresentaram parasitemia reduzida em relação aos controles tratados apenas com veículo, e as taxas de sobrevivência dos animais tratados com os compostos foram superiores às do grupo não tratado e, sendo o AuPAQ, superior ao tratado com AQ. Por fim, o complexo de ouro foi capaz de reduzir a formação de cristais de hemozoína em camundongos infectados com *P. berghei* tratados por 24 horas de maneira potente, sendo mais eficaz do que a AQ. **CONCLUSÃO:** Nossos dados mostram que os complexos inéditos de rutênio e ouro conjugados à AQ aqui testados são efetivos e atuam de forma multiestágio, sendo assim, bons candidatos a novos compostos antimaláricos.

Palavras-chave: Malária, Antiparasitários, Amodiaquina, Complexos metálicos.

SILVA, Mariana da Cruz Borges. Pharmacological evaluation of metal complexes with amodiaquine for the treatment of experimental malaria. 2019. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Malaria, a serious and complex illness, still has a significant impact on the world, particularly in Africa, South America and Asia, where it is currently spread to several million people and is a leading cause of death from infectious disease. Resistance to the available antimalarials has worsened the worldwide scenario of the treatment of this disease, therefore demanding for the development of new agents with antiparasitic activity and acting at different stages of the *Plasmodium* life cycle. Our research group has demonstrated in recent years that the most potent and fast-killing antiparasitic activity is obtained with metal complexes conjugated with antimalarials. **AIM:** In the present work, three ruthenium (RuAQ, RuPAQ and RubipyAQ) and one gold (AuPAQ) complexes associated with amodiaquine (AQ) were evaluated for *in vitro* antiparasitic activity using *P. falciparum* W2 strain. **MATERIAL AND METHODS AND RESULTS:** The ruthenium and gold complexes showed *in vitro* antiparasitic activity, with IC₅₀ values close to or less than those demonstrated with amodiaquine alone and low cytotoxicity when tested in cultures of J774 and HepG2. The AuPAQ and RuPAQ presented potent sporozoite activity of *P. berghei*, characterizing the multistage profile of the complexes. Against sexual forms of *P. falciparum*, the gametocytes, the complexes presented potent activity when compared to the AQ. The AuPAQ and RuPAQ compounds were tested *in vivo* on Swiss Webster mice infected with *P. berghei* strain NK65. In the suppression model of *P. berghei* infection *in vivo*, the animals treated with AuPAQ and RuPAQ showed reduced parasitaemia relative to the vehicle-treated controls and the survival rates of the animals treated with the compounds were higher than that of the non-control group treated and, in the case of AuPAQ, higher than those treated with AQ. Finally, the gold complex was able to reduce the formation of hemozoin crystals in *P. berghei*-infected mice treated for 24 hours, being more effective than the AQ. **CONCLUSION:** Our data show that the newly-discovered complexes of ruthenium and gold conjugated with AQ are effective antiparasitic by acting as multistage agents, thus being good candidates for new antimalarial compounds.

Keywords: Malaria, Antiparasitics, Amodiaquine, Metal complexes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial do risco de transmissão da Malária.....	16
Figura 2. Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	18
Figura 3. Degradação da hemoglobina e formação de hemozoína dentro de eritrócito infectado com <i>Plasmodium</i> spp	20
Figura 4. Atuação dos antimaláricos no ciclo de vida do plasmódio.....	22
Figura 5. Ação antiparasitária da CQ e AQ frente cepas sensíveis e resistentes à CQ	24
Figura 6. Via de conversão da AQ após absorção	26
Figura 7. Esquema representando os mecanismos de ação da AQ como antiparasitario frente ao plasmódio.....	27
Figura 8. Estrutura química dos complexos rutênio/amodiaquina e ouro/amodiaquina	35
Figura 9. Avaliação da atividade antiparasitária in vitro dos compostos frente à cepa W2 do <i>P. falciparum</i>	43
Figura 10. Os compostos exercem ação antiparasitária por inibirem a formação da β -hematina	46
Figura 11. Avaliação de potencial hemolítico	48
Figura 12. Teste de atividade contra esporozoítos do <i>P. berghei</i>	50
Figura 13. Padronização da avaliação da parasitemia por citometria do fluxo	53
Figura 14. Desenho experimental do teste de Peters.....	54
Figura 15. Atividade supressora da parasitemia do complexo de rutênio/amodiaquina RuPAQ e AQ.....	54
Figura 16. Atividade supressora da parasitemia do complexo ouro/amodiaquina AuPAQ	55
Figura 17. Efeito dos compostos AQ e AuPAQ na biossíntese da hemozoína em camundongos infectados com o <i>P. berghei</i>	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade antiparasitária dos complexos de ouro e rutênio em fases intraeritrocíticas do <i>P. falciparum</i> , citotoxicidade em células J774 e HepG2 e índice de seletividade	45
Tabela 2. Valores de CI_{50} frente a atividade antiparasitária em fases intraeritrocíticas da cepa NF-54 (CQ-sensível) do <i>P. falciparum</i> e atividade inibitória na formação da β -hematina	46
Tabela 3. Atividade <i>in vitro</i> dos complexos de rutênio associados à amodiaquina contra gametócitos do estágio V de <i>P. falciparum</i> da cepa 3D7	52
Tabela 4. Resumo de atividade <i>in vivo</i> do complexo RuPAQ e AQ em modelo murino de infecção	55
Tabela 5. Sumário da atividade <i>in vivo</i> do complexo AuPAQ e amodiaquina em modelo murino de infecção	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACTs	Terapias combinadas à base de artemisinina
AQ	Amodiaquina
ART	Artemisinina
CQ	Cloroquina
dAQ	Metabólito desetilamodiaquina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
IFN-γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
GFP	Proteína fluorescente verde
GSH	Glutathiona reduzida
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
Hb	Hemoglobina
HDP	Proteína de Desintoxicação de Heme
HEMOBA	Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado da Bahia
Hz	Hemozoína
Luc	Luciferase
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MQ	Mefloquina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
<i>P. berghei</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>

PfCRT	Proteína de transporte transmembrana do <i>P. f.</i> resistente a cloroquina
<i>P. berghei</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
<i>P. knowlesi</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
PQ	Primaquina
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TFF	Co-ligante trifenilfosfina
VD	Vacúolo digestivo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.2	O HEME COMO CO-FATOR METABÓLICO.....	20
2.3	A IMPORTÂNCIA DOS ANTIMALÁRICOS	21
2.4	COMPLEXOS METÁLICOS	30
3	OBJETIVOS	32
3.1	GERAL.....	32
3.2	ESPECÍFICOS	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	PREPARAÇÃO QUÍMICA DOS COMPLEXOS	33
4.2	PARASITOS	36
4.3	ENSAIO DE HEMÓLISE.....	37
4.4	ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA CONTRA FORMAS ASSEXUADAS	37
4.5	AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS	38
4.6	ENSAIO DA β -HEMATINA	38
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CONTRA O ESTÁGIO HEPÁTICO DO <i>P. BERGHEI</i>	39
4.8	AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA FRENTE A GAMETÓCITOS DO <i>P. FALCIPARUM</i>	40
4.9	AVALIAÇÃO DA PARASITEMIA POR CITOMETRIA DE FLUXO	40
4.10	ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA <i>IN VIVO</i>	41
4.10.1	<i>Animais</i>	41
4.10.2	<i>Ensaio de atividade antiparasitária in vivo (metodologia de Peters)</i>	41
4.11	QUANTIFICAÇÃO DE HEMOZOÍNA	41
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
5	RESULTADOS	43
5.1	COMPLEXOS METÁLICOS COM A AMODIAQUINA SÃO ANTIPARASITÁRIOS POTENTES E SELETIVOS FRENTE AO ESTÁGIO SANGUÍNEO ASSEXUADO DA MALÁRIA	43
5.2	COMPLEXOS METÁLICOS COM A AMODIAQUINA SÃO ANTIPARASITÁRIOS FRENTE À MALARIA SEM INDUZIR HEMÓLISE DAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS	47
5.3	COMPLEXOS METÁLICOS COM A AMODIAQUINA SÃO POTENTES ANTIPARASITÁRIOS NA PREVENÇÃO E CONTROLE DA MALÁRIA HEPÁTICA	49

5.4	COMPLEXOS METÁLICOS COM A AMODIAQUINA SÃO POTENCIAIS ANTIPARASITÁRIOS NA TRANSMISSÃO DA MALÁRIA	51
5.5	OTIMIZAÇÃO NA CONTAGEM DE PARASITEMIA EM ANIMAIS INFECTADOS COM <i>P. BERGHEI</i> ATRAVÉS DA CITOMETRIA DE FLUXO.	52
5.6	AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DE ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA	53
5.7	COMPLEXO DE OURO COM AMODIAQUINA REDUZ A FORMAÇÃO DE CRISTAIS DE HEMOZOÍNA EM ANIMAIS INFECTADOS COM O <i>P. BERGHEI</i>	56
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	66
	ANEXOS	75

1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença grave e complexa causada por parasitas do gênero *Plasmodium*, que afetam múltiplos tecidos, à medida que estes conseguem evadir da resposta imune (SMITH et al., 2018). É classificada como doença de notificação obrigatória, e é também conhecida nominalmente como paludismo, febre terçã ou febre quartã. A transmissão do parasito ocorre durante o repasto sanguíneo por fêmeas dos mosquitos pertencentes ao gênero *Anopheles* (PIMENTA et al., 2015). Em todo o mundo, estima-se que 216 milhões de novos casos e 445.000 mortes por malária ocorreram em 2016, tendo 90 e 92% destes, respectivamente, ocorridos na região africana (WHO, 2017).

A infecção pelo *Plasmodium* continua a infligir extensa morbidade e mortalidade em países com poucos recursos, por conta da biologia parasitária insuficientemente compreendida, do aumento da virulência e da resistência aos medicamentos antimaláricos disponíveis, e pela falta de uma vacina eficaz (MINKAH et al., 2018). Assim, o desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos se faz importante no cenário atual da doença.

Dentre as classes de moléculas com potencial terapêutico para o desenvolvimento de fármacos antimaláricos, compostos de coordenação com metais de transição apresentam diversas atividades terapêuticas (GLANS et al., 2012; MARTINEZ et al., 2009; NAVARRO et al., 2014; SUPAN et al., 2012). Em química medicinal, um complexo de coordenação consiste de um átomo metálico de transição, circundado quimicamente por moléculas orgânicas ou inorgânicas, conhecidas como ligantes. Tem-se, como exemplos clássicos, a cisplatina, a carboplatina, o auranofin e o glucantime (CLAVEL et al., 2015). O complexo metálico pode apresentar maior solubilidade em água, coeficiente de partição mais adequado, aumento da biodisponibilidade oral, proteção metabólica ou ganho de afinidade pelo receptor. Classicamente, o ligante utilizado é uma molécula sintética contendo um par de elétrons livres, tais como nitrogênio, enxofre ou fósforo. Dentre os metais de transição comumente estudados na química inorgânica, o rutênio e o ouro são considerados os mais adequados do ponto de vista químico-farmacêutico para o desenvolvimento de fármacos (CLAVEL et al., 2015).

Desde 2009, nosso grupo vem trabalhando com o planejamento estrutural, a síntese e avaliação das propriedades farmacológicas de fármacos anti-*P. falciparum* (BAHL et al., 2010; JUNEJA et al., 2014, INAM et al., 2014; MOREIRA et al., 2015). Até o momento, os melhores resultados em termos de atividade e espectro de ação foram observados quando complexos de rutênio ou platina contendo a cloroquina na sua composição foram estudados. Após a triagem de 18 complexos metálicos, foram identificados complexos de rutênio/cloroquina com atividade anti-*P. falciparum* mais potente, seletiva e de espectro de ação mais amplo do que a cloroquina. A atividade superior dos complexos rutênio/cloroquina foi atribuída à ação antiparasitária mais rápida que a cloroquina sem metal, agindo dentro de 6-18 horas após incubação (MACEDO et al., 2016).

Esta descoberta levantou a hipótese de que complexos de rutênio com outros antimaláricos poderiam melhorar as suas propriedades farmacológicas. No presente estudo, a amodiaquina foi escolhida como ligante para preparação de complexos metálicos pelo seu amplo uso no tratamento da malária não complicada e pela sua eficácia, mesmo em áreas de intensa resistência à cloroquina (ABACASSAMO et al., 2004). Assim, o objetivo desta pesquisa foi investigar complexos metálicos do tipo rutênio/amodiaquina e ouro/amodiaquina no desenvolvimento de fármacos antiparasitários potencialmente úteis ao tratamento (ação frente ao estágio sanguíneo) e controle da transmissão (ação frente à fase hepática e formas sexuadas) da malária.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MALÁRIA: HISTÓRICO, EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO

As doenças parasitárias afetam uma grande parcela da população mundial, provocando muitas mortes e influenciando na qualidade de vida e no desenvolvimento de muitos países (FRANÇA et al., 2008; WHO, 2018). Os protozoários são os responsáveis pela maioria das infecções parasitárias que afetam os seres humanos e, dentre as protozooses mais conhecidas, destaca-se a malária. A malária é uma doença infecciosa causada por parasitas apicomplexos do gênero *Plasmodium*, sendo mais prevalente em espécies tropicais e áreas subtropicais do mundo, locais onde as condições são favoráveis para o vetor, fêmea do mosquito *Anopheles*, se reproduzir (NLINWE et al., 2018; WHO, 2017).

A malária, do italiano “mal aria” (ar ruim), é uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade, tendo seus sintomas sido registrados em antigos escritos médicos chineses que remontam a 2.700 anos a.C. (CDC, 2010). A doença chegou a ser relacionada com a punição dos deuses e presença de maus espíritos nos pântanos, superstição essa que foi descartada pelo médico grego Hipócrates em 460-370 a.C., o qual descreveu os sintomas e classificou os acessos febris causados pela doença (BIGGS E BROWN, 2001). A descoberta do agente etiológico ocorreu em 1880, quando um cirurgião do exército francês chamado Charles Louis Alphonse Laveran, após examinar o sangue de um paciente que apresentava febre há 15 dias, verificou a existência do parasita dentro das hemáceas, descoberta essa que lhe rendeu o Prêmio Nobel em 1907 (CDC, 2010).

A epidemiologia da malária varia geograficamente, dependendo da intensidade da transmissão local ou da classe de endemicidade (NKUMAMA et al., 2017). A maioria dos casos de malária e mortes relacionadas à doença acontece na África Subsaariana. Entretanto, a Ásia, América Latina e Oriente Médio também são áreas de risco (Figura 1). Em 2017, 91 países e territórios apresentaram transmissão da malária, e, segundo a OMS, ocorreram 219 milhões de casos, levando 435.000 pessoas a óbito (WHO, 2018).

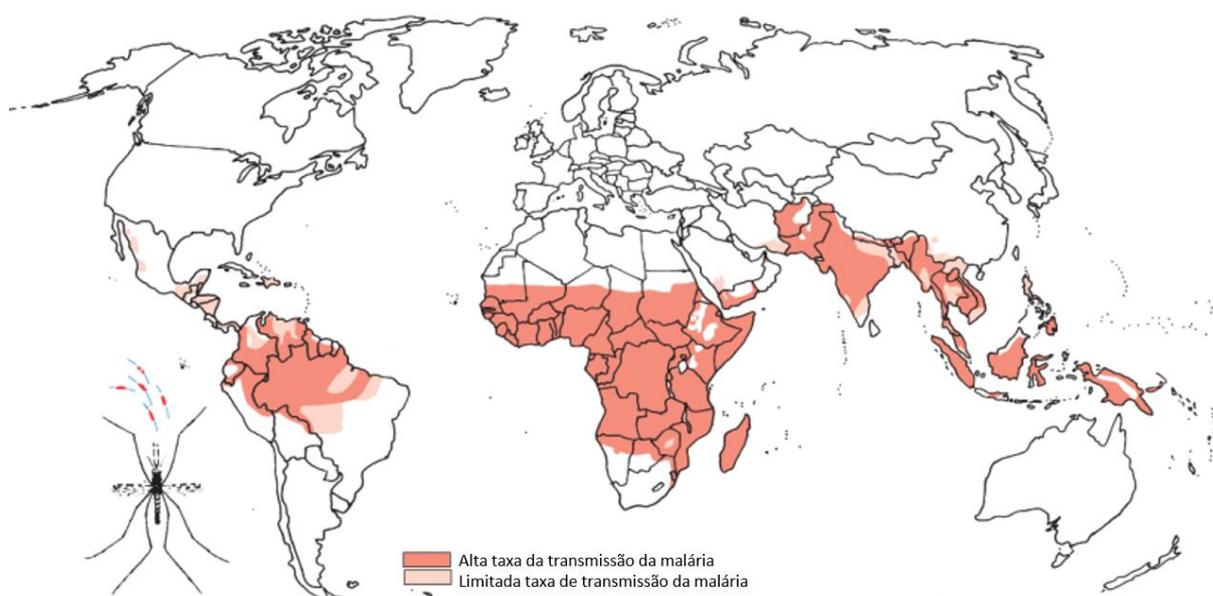


Figura 1. Distribuição mundial do risco de transmissão da Malária (Adaptado de CDC, 2010).

Durante a última década, aumentos no financiamento de apoio à ampliação das intervenções visando ao controle da malária contribuíram para reduções substanciais nas taxas de morbidade e mortalidade. Segundo a OMS, entre 2010 e 2016, a incidência global da malária diminuiu em 18% e as taxas de mortalidade específicas por malária diminuíram em todas as regiões, com exceção da região do Mediterrâneo Oriental (COTTER et al., 2013; WHO, 2017).

A malária é transmitida por várias espécies de protozoários do gênero *Plasmodium*, podendo afetar vários mamíferos e pássaros, sendo que cinco espécies são responsáveis pela malária humana: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (BALAKRISHNAN et al., 2001). A maioria dos casos de malária grave e consequentes óbitos são causados pelo *P. falciparum*, que se multiplica de forma rápida na corrente sanguínea, destruindo de 2% a 25% do total de hemácias e provocando um quadro de anemia grave. Na infecção por *P. falciparum*, o paciente também pode sofrer com quadros de trombose e embolias em diversos órgãos do corpo, levando até a chamada malária cerebral, devido a alterações na hemácia causadas pelo parasito. Por conta desses agravantes, a malária causada por *P. falciparum* é considerada uma emergência médica e o tratamento deve ser iniciado nas primeiras 24 horas do início da febre (GOMES et al., 2011; MAITLAND et al., 2004).

Os parasitas da malária se adaptaram a um ciclo de vida bastante complexo envolvendo o mosquito do gênero *Anopheles*, nos quais apenas as fêmeas exercem hematofagia, e os humanos (MIOTO et al., 2016). Muitas espécies de anofelinos têm potencial para transmitir a malária, sendo no Brasil o *Anopheles darlingi* a espécie considerada como principal vetor (BRASIL, 2005). Apesar da transmissão através da picada da fêmea do mosquito *Anopheles* ser o método de transmissão mais comum, pelo fato dos parasitas da malária estarem presentes nas hemácias, podem também ser transmitidos por transfusões sanguíneas, transplantes de órgãos ou através do compartilhamento de materiais perfurocortantes. A possibilidade de transmissão de mãe para filho durante o parto (transmissão neonatal) também existe, mas é de rara ocorrência (BRASIL, 2005; MEIBALAN et al., 2017).

O ciclo de vida do *Plasmodium* é caracterizado por ser heteroxeno, necessitando do hospedeiro invertebrado (mosquito) e vertebrado (homem) para ocorrer (Figura 2). O ciclo se inicia quando a fêmea do mosquito *Anopheles* inocula esporozoítos, forma infectante do *Plasmodium*, na circulação sanguínea durante o repasto sanguíneo. Os esporozoítos, após atingirem ativamente a circulação periférica, migram para o fígado, onde se replicam dentro dos hepatócitos, formando merozoítos que são liberados novamente na corrente sanguínea. Parte desses merozoítos são fagocitados, enquanto que outra parte consegue atingir os glóbulos vermelhos, dentro dos quais dão início ao desenvolvimento em formas de anéis, trofozoítos e esquizontes, rompendo a hemácia e liberando novos merozoítos que irão infectar outras hemácias saudáveis. Os parasitas de estágio sanguíneo, especialmente os trofozoítos, catabolizam a hemoglobina e liberam Fe (II) heme. O heme liberado se oxida rapidamente para a hematina Fe (III), que é tóxica para o parasita em seu estado livre. O principal mecanismo de desintoxicação implementado pelo parasita é através da cristalização da hematina, gerando os cristais de hemozoína, os quais não são tóxicos ao parasita. O bloqueio da cristalização da hematina tem sido o principal alvo molecular para fármacos antimaláricos (OLAFSON et al., 2017). A duração desse ciclo eritrocítico varia de acordo com a espécie responsável pela infecção (BIGGS et al., 2001; BRASIL, 2005; MAIER et al., 2009).

Uma pequena fração de parasitas no estágio sanguíneo evolui para estágios sexuais, os gametócitos, onde atingem a derme e são capturados por um mosquito saudável durante o repasto sanguíneo, dando início à fase sexuada do ciclo (BUSULA

et al., 2017). Após a sua ingestão pelo mosquito, os gametócitos se transformam em formas masculinas e femininas, micro e macrogametócitos, respectivamente. Dentro do estômago do anofelino ocorre a fusão e a meiose, gerando um zigoto. O zigoto então se aloja na parede do intestino, formando o oocisto. O desenvolvimento do parasita continua através de divisões assexuadas até a maturação do oocisto, o qual passa a conter milhares de esporozoítos, forma infectante. Após a ruptura do oocisto, os esporozoítos migram até as glândulas salivares do mosquito e serão inoculados no homem durante o repasto sanguíneo, finalizando o ciclo (CASTRO et al., 2009; CURRÀ et al., 2016).

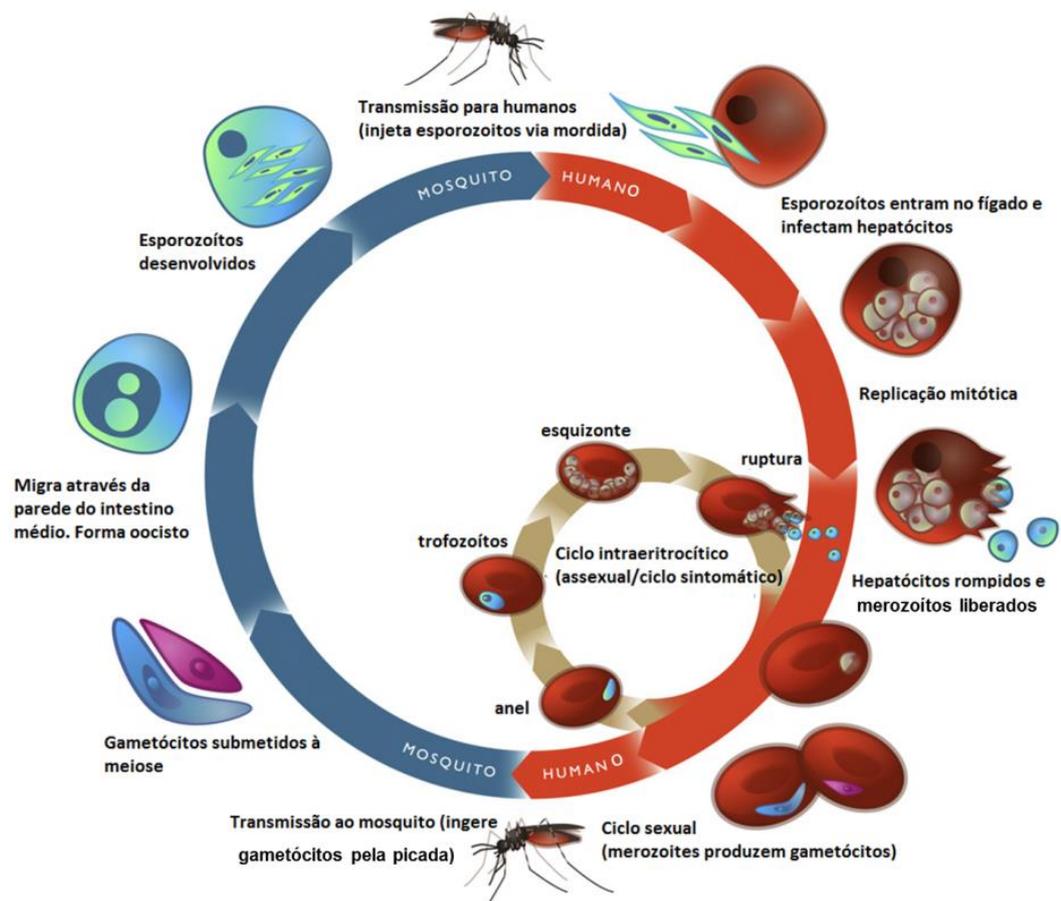


Figura 2. Ciclo de vida do *Plasmodium* (Adaptado de Klein, 2013).

Infecções recorrentes pelo parasita podem levar o indivíduo a desenvolver a chamada imunidade ativa. Essa imunidade se estabelece lentamente e varia de indivíduo para indivíduo, de acordo com seu grau de nutrição, duração da infecção, espécie inoculada, condições de repouso, entre outros fatores. A imunidade ativa pode ser capaz de suprimir os sintomas sem interferir na formação dos gametócitos,

não impedindo a transmissão da doença (DOOLAN et al., 2009). Recém-nascidos em áreas de alta transmissão, como África e algumas regiões da Ásia, são protegidos naturalmente da malária grave durante seis meses, devido à transferência de anticorpos IgG maternos. Já em áreas de baixa transmissão, as crianças e os adultos são igualmente acometidos (MIOTO et al., 2016).

Os sintomas característicos da infecção por *Plasmodium* são causados pelo estágio sanguíneo do ciclo de vida do parasito. Episódios de febre acompanhados por calafrios e sudorese são associados à esquizogonia eritrocítica, e o intervalo de tempo entre esses acessos varia de acordo com a espécie responsável pela infecção. Por exemplo, o ciclo eritrocítico do *P. falciparum* dura 48 horas e a febre a cada 3 dias, enquanto o ciclo do *P. malariae* dura 72 horas e os episódios de febre a cada 4 dias. Esses episódios podem vir acompanhados de náuseas, vômitos, dores de cabeça e musculares. Se a doença não for tratada, os sintomas podem se agravar, levando, por exemplo, a anemias graves e à malária cerebral (BIGGS, 2001; BROWN et al., 1969).

O diagnóstico rápido e preciso é fundamental para o manejo eficaz da malária, já que atrasos no tratamento podem culminar no óbito do paciente. Em áreas não endêmicas, os profissionais de saúde podem ter dificuldades em identificar uma infecção por *Plasmodium*, o que é mais difícil de acontecer em áreas que sofrem com alta taxa de ocorrência. O diagnóstico clínico é baseado nos sinais e sintomas dos pacientes, e nos achados microscópicos no exame. O diagnóstico laboratorial pode ser feito por diferentes técnicas, como, por exemplo, a convencional microscopia que visa encontrar parasitos em esfregaços sanguíneos, testes rápidos e métodos moleculares, como a PCR (TANGPUKDEE et al., 2009).

2.2 O HEME COMO CO-FATOR METABÓLICO

Como já citado anteriormente, para dar suporte ao seu crescimento e replicação, o parasito absorve grandes quantidades de citosol eritrocitário e digere seu constituinte primário, a hemoglobina, em uma organela ácida especializada chamada vacúolo digestivo (VD) (Figura 3). Esta organela, a qual é mantida em pH ácido por um gradiente de prótons ativado por uma bomba de ATPase, processa cerca de 60-80% da hemoglobina eritrocitária para fornecer um *pool* de aminoácidos que é crucial para o crescimento e desenvolvimento do plasmódio. O VD contém enzimas

hidrolíticas de várias classes que digerem a hemoglobina, e o processo de digestão deixa resíduos insolúveis no vacúolo devido à liberação de heme (ferriprotoporfirina IX), que é neutralizada pela formação de dímeros de hematina coordenados (β -hematina) que se biocristalizam para a hemozoína quimicamente inerte, também conhecida como pigmento malárico (FOLEY et al., 1998; WUNDERLICH et al., 2012).

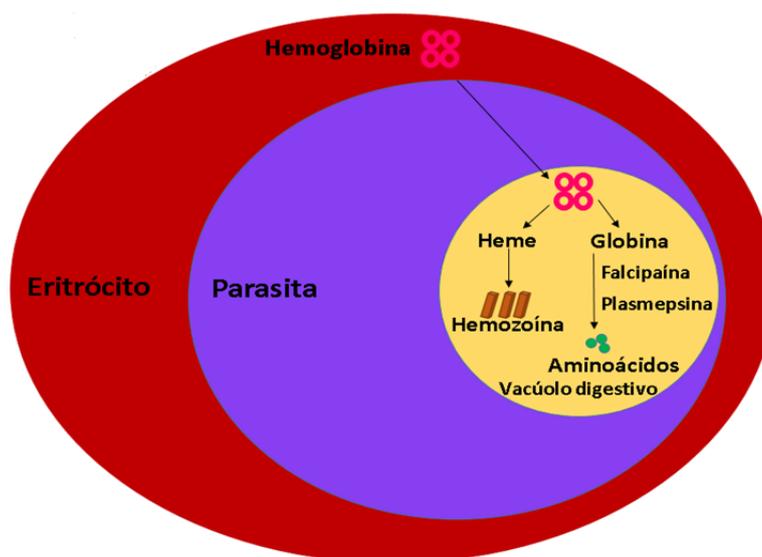


Figura 3. Degradação da hemoglobina e formação de hemozoína dentro de eritrócito infectado com o plasmódio (Adaptado de CORONADO et al., 2014).

Apesar do acesso a essa fonte abundante de heme, o plasmódio é capaz de codificar e expressar todas as enzimas para uma via de biossíntese completa de heme. Entretanto, estudos de *knockdown* de enzimas da biossíntese de heme sugerem que o plasmódio não necessita usar esta rota de biossíntese durante os estágios sanguíneos intraeritrocíticos, mas que esta é essencial para os estágios hepático e no inseto (GOLDBERG et al., 2017).

A hemoglobina ingerida é degradada dentro dos VD ácidos através de um processo seqüencial semi-ordenado específico, que envolve múltiplas proteases (CORONADO et al., 2014). Chugh e colaboradores (2013) relataram a presença de um complexo protéico de cerca de 200 kDa no VD do parasito que é necessário para os processos de degradação da hemoglobina, mas também para a síntese de hemozoína. Este complexo é formado pelas enzimas mais importantes envolvidas durante estes dois processos: falcipaina 2, plasmepsina II, plasmepsina IV, protease aspártica e uma proteína denominada de proteína de desintoxicação de heme (HDP).

As conseqüências bioquímicas da acumulação de heme não sequestrada incluem lise de membrana e inibição de proteases parasitárias. Foi relatado que concentrações de heme baixas, como 20 mM, já são suficientes para retardar o crescimento dos parasitos da malária em 10 minutos, quantidade essa que pode ser produzida pela destruição de apenas 0,1% da hemoglobina total presente nos eritrócitos, sendo que no estágio de trofozoíto o plasmódio consome quase que 75% de hemoglobina do eritrócito, com liberação concomitante de heme livre (TEKWANI et al., 2005).

O mecanismo de formação da hemozoína dentro do vacúolo do parasito tem se demonstrado um dos principais alvos dos antimaláricos, que atuam inibindo a detoxificação de heme. Um dos mais conhecidos antimaláricos, a cloroquina, tem seu mecanismo de ação baseado nessa etapa essencial para o parasito (TEKWANI et al., 2005). Além da cloroquina, a hematina é conhecida por ser o alvo de outros esquizonticidas, como a halofantrina, mefloquina, quinidina e 8-aminoquinolinas, portanto, evitar o sequestro de heme em hemozoína é uma abordagem adequada para desenvolvimento de novos antimaláricos (KUMAR et al., 2018). Porém, a resistência de cepas aos antimaláricos disponíveis vem avançando cada vez mais e, a exemplo da cloroquina, foi demonstrado por Lin e colaboradores (2015) que, em cepas resistentes a esse clássico antimalárico, a degradação da hemoglobina está gravemente comprometida e a produção de hemozoína se torna quase nula. Mesmo assim, há persistência de parasitos viáveis, indicando que os estágios sanguíneos de *P. berghei* podem se desenvolver em esquizontes maduros, apesar da digestão de hemoglobina estar significativamente reduzida, evidenciando assim que, apesar de ser uma via clássica de sobrevivência do parasito em eritrócitos, a degradação da hemoglobina e posterior cristalização da hematina podem ser substituídas por outros mecanismos de escape ao tratamento com os antimaláricos no desenvolvimento do patógeno.

2.3 A IMPORTÂNCIA DOS ANTIMALÁRICOS

O tratamento com quimioterapia adequada e oportuna previne a ocorrência de casos graves da malária, reduzindo, assim, o número de óbitos e eliminando fontes de infecção para o vetor, contribuindo, assim, para a redução da transmissão da

doença. O conjunto de medicamentos antimaláricos inclui moléculas que diferem amplamente na forma em que são utilizados, principalmente devido a diferenças regionais da resistência dos patógenos. Exceto para malária grave, estes medicamentos são administrados como combinações, cujos componentes são escolhidos com base na resistência local e outros fatores, como as cepas e os tipos de malária desenvolvidos mais incidentes (VAN HUIJSDUIJNEN et al., 2018).

A ação das drogas antimaláricas difere não só entre as espécies, mas também com relação à forma evolutiva do parasito. Assim, as drogas antimaláricas atuam nas diferentes formas parasitárias ao longo do ciclo de vida do *Plasmodium*, como pode ser visto na Figura 4.

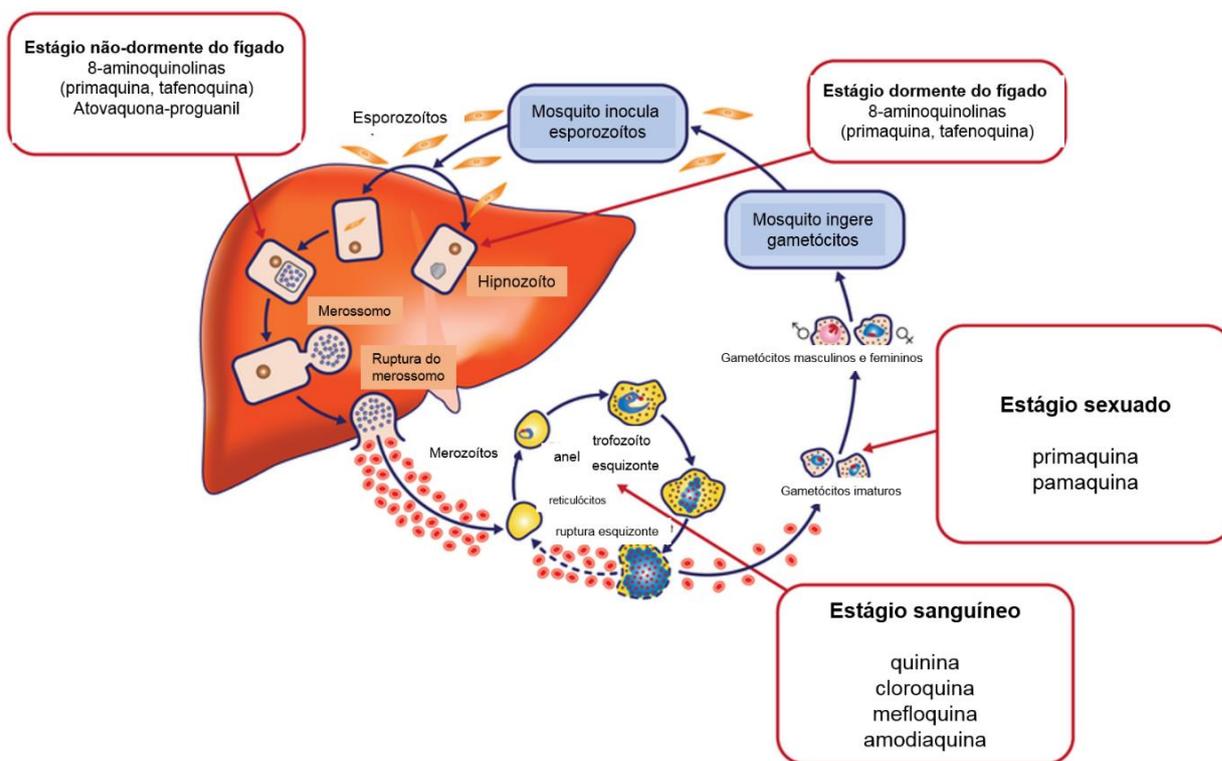


Figura 4. Atuação dos antimaláricos no ciclo de vida do plasmódio. (Adaptado de BASSAT et al., 2011).

O primeiro fármaco utilizado contra a malária foi a quinina, um produto natural extraído da casca da *Cinchona*, no século XVII. Esse fármaco permaneceu como o principal no tratamento da doença até a década de 1920, quando a produção de outros antimaláricos se tornou disponível. A mais importante dessas novas drogas era cloroquina, extensivamente usada a partir da década de 1940. A resistência à cloroquina foi desenvolvida lentamente, e a quinina novamente desempenhou um papel fundamental no tratamento da doença. A quinina tem ação esquizonticida rápida

contra parasitas da malária na fase intra-eritrocítica, inibindo, principalmente, a heme polimerase do protozoário, além de interferir nas etapas de transcrição e tradução do parasito (ACHAN et al., 2011; CABRAL, 2010).

A cloroquina é um agente quimioterápico para o tratamento clínico da malária e, desde o seu desenvolvimento, a sua eficiência, segurança, estabilidade, baixo custo e a facilidade de fabricação contribuíram para torná-la uma droga antimalárica sintética amplamente utilizada, substituindo, assim, a quinina. Nenhum problema grave com toxicidade foi encontrado na época, e assim, a cloroquina foi recomendada para uso profilático e no tratamento de todas as infecções humanas em estágios sanguíneos (SLATER et al., 1993). A propagação subsequente da resistência causou uma redução substancial na utilidade clínica da cloroquina (FRANÇA, 2008). O mecanismo de resistência do *Plasmodium* à cloroquina parece estar associado a mutações em uma proteína do parasito denominada PfCRT (proteína de transporte transmembrana do *P. falciparum* cloroquina resistente), reduzindo o acúmulo de cloroquina no vacúolo digestivo do patógeno (CHINAPPI et al., 2010). O principal mecanismo de ação da cloroquina é através da inibição da digestão de hemoglobina pelo *Plasmodium*, sendo também um agente esquizonticida que pode eliminar gametócitos imaturos (CABRAL, 2010).

Para o tratamento contra o *P. falciparum* resistente à cloroquina, tem-se a mefloquina, agente antimalárico com atividade esquizonticida altamente ativa, mas sem ação gametocida conhecida, desenvolvido em meados de 1970. O mecanismo de ação da mefloquina ainda não é totalmente conhecido, porém possui uma alta afinidade por membranas eritrocitárias, com atividade relacionada na polimerização de heme. O surgimento de resistência à mefloquina, assim como a muitos outros agentes antimaláricos já citados, também já foi reportada (SCHLAGENHAUF, 1999; WELLS et al., 2013).

A resistência à cloroquina surgiu como um problema militar durante a Guerra do Vietnã, estimulando a realização de um programa de rastreio massivo de novos fármacos nos Estados Unidos no fim da Segunda Guerra Mundial, no qual foi produzida outra 4-aminoquinolina, a amodiaquina (AQ) (Figura 5). A AQ foi introduzida como uma alternativa à cloroquina e tem sido usada na profilaxia da malária *falciparum* há mais de 40 anos. A AQ foi adicionada pela primeira vez à Lista de Medicamentos Essenciais da OMS em 1977. Em 1979, o comitê decidiu eliminá-la da lista devido a

relatos de eventos adversos graves em viajantes, porém, foi rapidamente reintegrada no mesmo ano (D'ALESSANDRO et al., 2006; OLLIARO et al., 2003).

Como observado na Figura 5A, a AQ possui dois grupos químicos iguais ao existente na cloroquina: a 4-aminoquinolina e a *N,N*-dietil-amina. O grupo químico 4-aminoquinolina é atribuído como essencial para inibir a formação do pigmento malárico, enquanto que o grupo *N,N*-dietil-amina é importante para a difusão na membrana plasmática e permeabilidade celular (FOLEY et al., 1998).

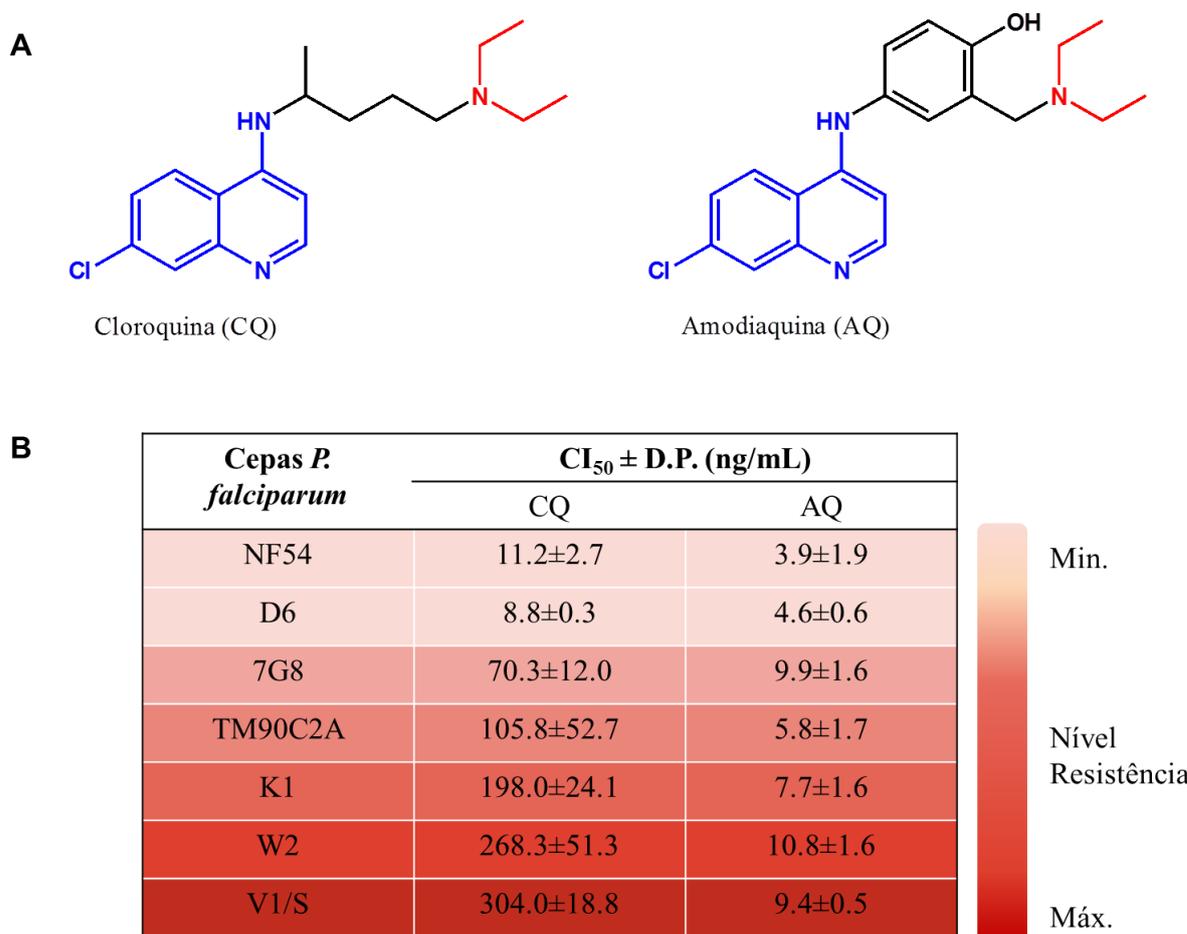


Figura 5. Ação antiparasitária da CQ e AQ frente cepas sensíveis e resistentes à CQ. (A) Estruturas químicas da cloroquina e amodiaquina. **(B)** Valores de CI₅₀ da AQ e CQ frente a cepas sensíveis e resistentes à CQ (adaptado de DELVES et al., 2012).

Apesar de haver resistência cruzada com a cloroquina, a amodiaquina é eficaz em cepas cloroquina-resistentes (Figura 5B), sendo que em muitas partes da África ocidental e central permanece mais eficaz que a cloroquina, ou frente a combinação sulfadoxina – pirimetamina (ROSENTHAL, 2007). Isso talvez seja devido ao fato de que a AQ inibe a formação dos cristais de hemozoína de maneira distinta e mais eficaz

do que CQ, já que se liga às faces laterais e axiais do cristal, enquanto que a CQ atua somente na área axial, embora a CQ iniba a β -hematina de forma mais potente *in vitro* (OLAFSON et al., 2017; PARAPINI et al., 2000).

A AQ é prontamente absorvida pelo trato gastrointestinal e rapidamente convertida pela enzima CYP2C8 do citocromo P450 (CYP) no metabólito desetilamodiaquina (dAQ). De fato, a AQ tem um tempo de meia vida ($t_{1/2}$) de 5.2 ± 1.7 horas e não é mais detectada após 8 horas, enquanto que a dAQ é detectada em até 96 horas após administração. Baseado nisto, tem sido assumido que a desetilamodiaquina contribui para quase todo o efeito antimalárico do tratamento com a AQ (WINSTANLEY et al., 1987). Além do dAQ, a AQ também produz um outro metabólito, a quinona-imina, no qual é considerado de reatividade química elevada. Foi demonstrado em modelo experimental que este metabólito quinona-imina é extensivamente conjugado com a glutatona (Figura 6). Enquanto que o metabólito dAQ é uniforme nas populações, a formação do metabólito quinona-imina é dependente do polimorfismo hepático e da idiosincrasia humana, podendo assim contribuir para os efeitos colaterais da AQ (HARRISON et al., 1992; TINGLE et al., 1995).

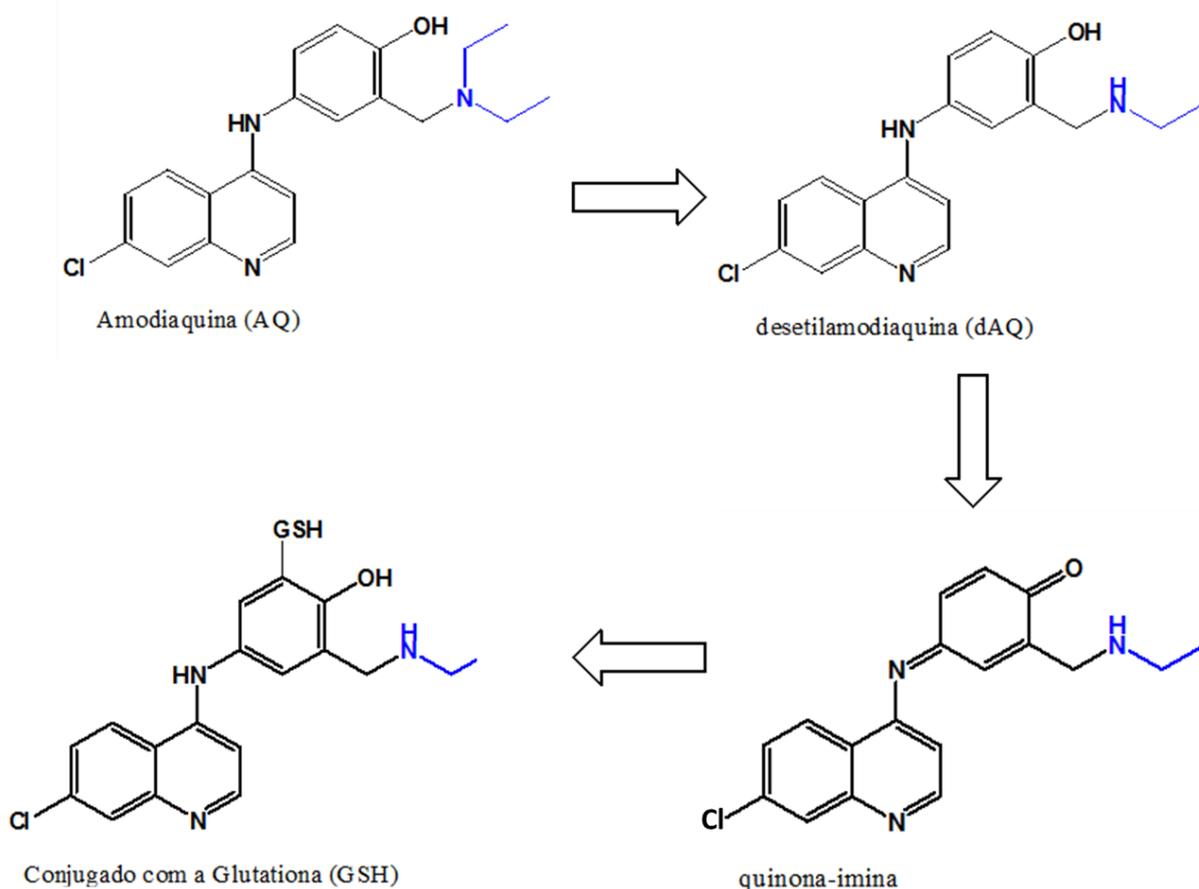


Figura 6. Via de conversão da AQ após absorção.

Inicialmente, foi postulado que o modo de ação da AQ em hemácias parasitadas era provavelmente semelhante ao da cloroquina, a qual é concentrada nos vacúolos digestivos dos parasitos, onde bloqueia a polimerização de heme, que é um processo natural de desintoxicação do parasito, resultando no acúmulo de heme, tóxico para o parasito (SIRIMA et al., 2007). Porém, um trabalho recente mostrou que a amodiaquina inibe a hemozoína por meio de um processo diferente do descrito para a cloroquina, agindo através da redução da velocidade de crescimento do pigmento malárico pela inibição da formação de novas camadas do pigmento (OLAFSON et al., 2017). Além da cristalização de heme livre pelo parasito, outro destino pode ser dado a esse produto tóxico para o plasmódio: este pode ser sequestrado e translocar através das membranas, atingindo o citosol do parasito ou da célula hospedeira, onde existem mecanismos para sua detoxicação. Um desses mecanismos ocorre através da glutathiona reduzida (GSH) do parasito. Porém, a CQ e a AQ são capazes de inibir totalmente a degradação de heme dependente de GSH, o que permite que sejam atingidos níveis críticos de heme nas membranas da célula infectada e conseqüente perturbação na homeostase dos íons no parasito, o que causa a morte do parasito (Figura 7) (GINSBURG et al., 1998).

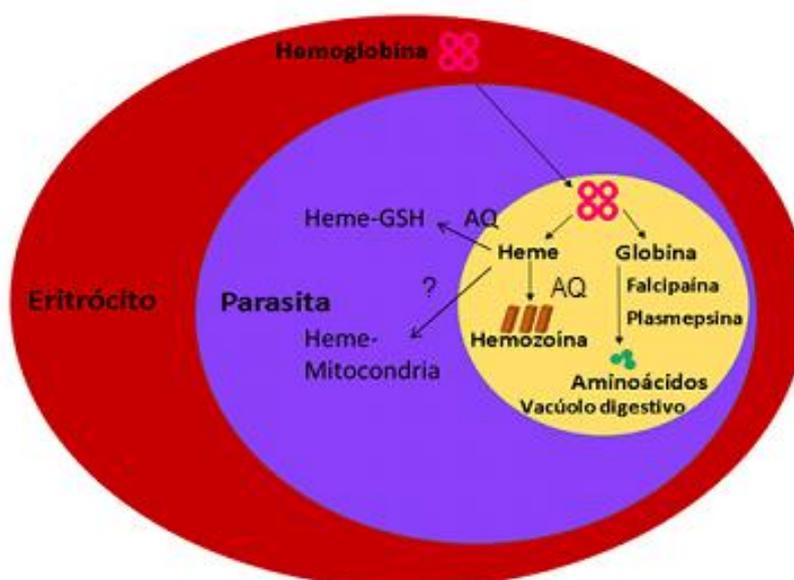


Figura 7. Esquema representando os mecanismos de ação da AQ como antiparasitario frente ao plasmódio.

Até pouco tempo atrás, o único mecanismo conhecido de degradação do grupamento heme livre era pela GSH. Entretanto, estudos mais recentes mostraram que as enzimas mitocondriais desempenham dois processos fisiológicos importantes que beneficiam o parasito:

(1) reciclagem de heme, liberando ferro, útil ao parasito;

(2) utilização de heme como substrato para a síntese *de novo* do citocromo *c* na mitocôndria, fazendo assim a manutenção da homeostasia parasitária (GOLDBERG et al., 2017).

A amodiaquina, em combinação com artesunato, é indicada para o tratamento da malária não complicada por *P. falciparum* ou *P. vivax* e é considerada eficaz contra *P. ovale*, *P. knowlesi* e *P. malariae*. Essa combinação provou ser bastante eficaz em eliminar o sintoma de febre e os parasitos circulantes em até dois dias de tratamento (ABUAKU et al., 2017). O artesunato-amodiaquina não deve ser usado na profilaxia, pois seu acúmulo aumenta os riscos de hepatotoxicidade e agranulocitose (WHO, 2015).

A primaquina e pamaquina compõem a única classe de drogas de uso comum que é conhecida por eliminar gametócitos maduros de *P. falciparum* (BURGESS et al., 1961). A primaquina age de maneira eficiente como esquizonticida hepático e gametocida, além de ser a droga mais utilizada deste grupo. Embora a sua farmacocinética não seja bem compreendida, sabe-se que é rapidamente metabolizada, com uma meia-vida de seis horas (WHITE et al., 1992). A primaquina não afeta diretamente os estágios assexuais do *P. falciparum* que causam a doença clínica, e parece não afetar os gametócitos precoces ou em maturação (ARNOLD et al., 1955; WHITE et al., 1992). Geralmente é coadministrada com um esquizonticida eritrocitário, para evitar recaídas. Uma das desvantagens do uso generalizado da primaquina é que a droga é conhecida por ser um gatilho hemolítico em pessoas com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), podendo causar quadros graves de anemia hemolítica, hemoglobinemia e insuficiência renal. Esse efeito adverso depende do grau de deficiência enzimática, e da dose da droga (EZIEFULA et al., 2014; GRAVES et al., 2014).

Com a constante necessidade de novos antimaláricos que pudessem contornar a resistência aos já disponíveis, em 1967 a República Popular da China deu início a um programa sistemático em busca de novos medicamentos a partir de plantas nativas usadas como remédios em sua medicina tradicional (TARANTO, 2006). Uma dessas plantas, a *Artemisia annua* L., já tinha uma longa história de uso, e o seu princípio ativo, isolado em 1971, ficou conhecido como artemisinina. Desde o seu isolamento, vários derivados foram sintetizados, dentre eles, o artesunato de sódio, que atua aumentando o estresse oxidativo no plasmódio intra-eritrocítico (BARRADELL e FITTON, 1995; WHITE, 2008). Os derivados de artemisinina são usados para tratar a doença clínica, reduzindo rapidamente o número de esquizontes e merozoítos circulantes no paciente, o que também reduz o potencial de desenvolvimento de gametócitos para transmissão, de modo mais eficaz do que a cloroquina e a quinina. Entretanto, cepas com certo nível de resistência à artemisinina e seus derivados já foram detectadas em países asiáticos (WHO, 2016).

As terapias combinadas à base de artemisinina (ACTs) são atualmente recomendadas em todo o mundo como o principal tratamento para a infecção com *P. falciparum*. Recomenda-se o uso de um medicamento convencional, como a mefloquina, com um derivado da artemisinina, como o artesunato. Ao combinar os medicamentos com diferentes modos de ação, melhora-se a eficácia e o número de gametócitos se reduz, favorecendo uma possível redução na transmissão da malária e retardo no surgimento de cepas resistentes aos medicamentos (LIN et al., 2010; WHO, 2017). No Brasil, o Ministério da Saúde por meio de uma política nacional de tratamento da malária orienta a terapêutica e disponibiliza gratuitamente os medicamentos antimaláricos utilizados em todo o território nacional, em unidades do Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2010).

Em resumo, os agentes antimaláricos de primeira linha, como cloroquina (CQ), amodiaquina (AQ), mefloquina (MQ) e artemisinina (ART) são altamente eficazes contra a malária suscetível a drogas e amplamente utilizada na prática clínica. No entanto, a eficácia destes antimaláricos está em constante declínio devido à rápida evolução e disseminação de parasitas resistentes a todos os atuais antimaláricos, exigindo o desenvolvimento urgente de novos antimaláricos com mecanismos múltiplos, alta potência, perfis bem tolerados e pouco tóxicos (FAN et al., 2018).

2.4 COMPLEXOS METÁLICOS

A química de compostos inorgânicos oferece uma série de opções para o design de fármacos que não seriam possíveis pela química orgânica. Um amplo número de coordenações e geometrias, os diferentes estados redox disponíveis, várias propriedades termodinâmicas e cinéticas, bem como as propriedades intrínsecas dos íons metálicos, podem resultar em uma variedade de reações em sistemas biológicos (KOMARNICKA et al., 2015). Embora o desenvolvimento de agentes anticancerígenos seja uma das maiores áreas de pesquisa dentro do campo, outras aplicações, tais como agentes antimaláricos, também vêm gerando interesse científico.

A estrutura química das quinolinas, compostos aromáticos com dois anéis hexagonais fundidos, tem sido bastante utilizada para o planejamento químico e triagem de novos compostos com atividade antimalárica. Os compostos quinolínicos estão presentes nos fármacos antimaláricos em uso, como a cloroquina, mefloquina e amodiaquina e, apesar desses fármacos terem ação voltada para o estágio sanguíneo do ciclo do parasito, já existem novos compostos quinolínicos com espectro de ação mais amplo. Portanto, é possível realizar modificações estruturais em quinolinas visando aumentar o espectro de ação dos compostos (MACEDO et al., 2016).

Até agora, vários trabalhos mostraram que a incorporação de íons de metais de transição em farmacóforos oferece novas oportunidades para projetar compostos exclusivos contendo metais que complementam a diversidade molecular, resultando no aumento da atividade biológica. Um exemplo bem estabelecido nessa área é a ferroquina. Em 1994, a ferroquina foi projetada na Universidade de Lille. Mais tarde, foi sintetizada incorporando uma unidade de ferroceno no esqueleto básico da cloroquina. A ferroquina é caracterizada por ser extremamente eficaz contra *P. falciparum* resistente à cloroquina e não ter efeitos imunotóxicos em camundongos jovens infectados, inibindo a formação de hemozoína (WANI et al., 2015). Existem também vários relatos de aumento da eficácia de fármacos existentes, como a cloroquina, quando íons de metais de transição foram coordenados com as estruturas das drogas (HUBIN et al., 2014; MACEDO et al., 2016).

Outro exemplo de complexo metálico que tem apresentado boa atividade antiparasitária é o complexo de rutênio, contendo ligantes bioativos em sua estrutura. O rutênio é capaz de formar complexos com os mais variados ligantes e é bastante estável, o que amplia as possibilidades de aplicações biológicas. Apresentam estrutura octaédrica que proporciona a formação de ligações fortes com o DNA. Além disso, têm demonstrado efeito inibitório sobre a enzima topoisomerase e indução de espécies reativas de oxigênio (MARKOWSKA et al., 2015; ZENG et al., 2016). Outras propriedades interessantes do rutênio são a sua ampla variedade de coordenações, vários estados de oxidação (Ru (II), Ru (III) e Ru (IV)) em condições fisiológicas, lenta taxa de substituição de ligante (LEVINA et al., 2009) e baixa toxicidade (MALINA et al., 2001).

Foi demonstrado que complexos de coordenação de rutênio e complexos organometálicos de rutênio/cloroquina possuem atividade antimalárica aumentada em relação a cepas resistentes à cloroquina, em comparação com a própria cloroquina (EKENGARD et al., 2015). Recentemente, Macedo e colaboradores (2016) também demonstraram uma atividade antiparasitária mais potente e rápida de complexos de rutênio associados à cloroquina em formas assexuadas no estágio sanguíneo do parasito, quando comparados à cloroquina, além de apresentar atividade antiparasitária na fase sexuada (gametócitos) e no fígado, propriedades não descritas com o uso da cloroquina.

Atualmente, químicos e físicos também estão bastante interessados no elemento ouro, o qual merece atenção por causa de muitos recursos extraordinários da sua química, tais como a formação de interações auropílicas, a estabilização de compostos de ouro com metal em estados de oxidação mais elevados, agregação para compostos intermetálicos, bem como algumas propriedades fotofísicas incomuns (DA SILVA MAIA et al., 2014). Navarro e colaboradores descreveram um agente antimalárico de cloroquina e ouro, obtido pela coordenação da cloroquina a fragmentos de $[Au(PPh_3)]^+$, dando origem ao novo composto $[Au(PPh_3)(CQ)]PF_6$, que é mais ativo que a cloroquina sozinha *in vitro* contra culturas de cepas cloroquina-resistentes de *P. falciparum* e também contra *P. berghei* tanto *in vitro* como *in vivo* (NAVARRO et al., 1997). Além disso, foi relatado também que os complexos de coordenação de ouro (I) contendo o composto tiosemicarbazona apresentaram atividade antiplasmodial aumentada contra duas cepas de *P. falciparum* (D10 e W2)

in vitro quando comparados com a atividade do ligante isoladamente (KHANYE et al., 2010).

Tendo abordado as problemáticas que envolvem o tratamento efetivo da malária, doença que vitimiza milhares de pessoas no mundo, o avanço da pesquisa sob a busca de novas alternativas se mostra imprescindível. O significado biológico do pigmento malárico (hemozoína) na progressão da doença, bem como os mecanismos que levam a resistência do parasito ao acúmulo de heme livre tóxico, proveniente do bloqueio farmacológico da biossíntese da hemozoína, têm sido cada vez mais estudados. Portanto, o entendimento atual é que o plasmódio possui múltiplas maneiras de escapar de heme livre tóxico, tanto dentro como fora do VD. Aliado a isso, o parasito pode escapar do tratamento diminuindo a biossíntese da hemozoína. De todo modo, a intervenção terapêutica no bloqueio da biossíntese da hemozoína ainda é um componente crítico, principalmente se utilizado em combinação com outra intervenção terapêutica. Tendo em vista o papel da mitocôndria na manutenção da homeostasia parasitária, o bloqueio sincronizado tanto da biossíntese da hemozoína como da neutralização da degradação de heme livre representa uma possibilidade de intervenção terapêutica pleiotrópica, sendo em princípio de difícil escape do plasmódio ao tratamento antiparasitário.

Reconhecendo que principalmente os compostos derivados de Ouro, e com menor extensão, os derivados de Rutênio, possuem um alto acúmulo nas mitocôndrias de células de mamíferos, promovendo o bloqueio de enzimas essenciais, tais como o *citocromo c* e a tiorredoxina redutase, aliado a reconhecida habilidade da AQ em bloquear irreversivelmente a biossíntese da hemozoína (CASINI et al., 2008; HARBUT et al., 2015), nossa hipótese baseia-se na intervenção terapêutica pleiotrópica empregando compostos derivados de Ouro ou Rutenio contendo a AQ. Para responder esta hipótese levantada, realizou-se um estudo controlado, experimental, usando modelos *in vitro* e *in vivo*, de prova de conceito, avaliando-se comparativamente a sensibilidade de diferentes estágios e formas evolutivas do *P. berghei* e *P. falciparum* à intervenção terapêutica pleiotrópica com os compostos derivados de Ouro ou Rutênio contendo a AQ.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Investigar a atividade antimalárica de complexos metálicos com amodiaquina em modelo experimental.

3.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Estudar a atividade antiparasitária e a seletividade dos compostos frente às formas assexuadas do *P. falciparum*;
- ✓ Avaliar a atividade antiparasitária dos compostos frente culturas de células Huh-7 infectadas com esporozoítos do *P. berghei*;
- ✓ Avaliar a eficácia do tratamento antiparasitário *in vivo* em camundongos infectados com o *P. berghei*;

- ✓ Avaliar a atividade antiparasitária dos compostos frente às formas sexuadas do *P. falciparum*;
- ✓ Avaliar a capacidade dos compostos em inibir a formação dos cristais de hemozoína.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PREPARAÇÃO QUÍMICA DOS COMPLEXOS

Os complexos foram sintetizados em colaboração com o Prof. Alzir Azevedo Batista do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, utilizando metodologias semelhantes ao descrito por Bennett et al. (1982) e Pereira et al. (2015).

O planejamento químico dos complexos metálicos com a amodiaquina foi realizado usando como modelo a composição química do complexo BCQ (complexo de rutênio associado à cloroquina), elucidado por Macedo e colaboradores (2016). Baseado no BCQ, planejou-se um complexo análogo, RubipyAQ, contendo

amodiaquina ao invés da cloroquina (Figura 8). Isto permitiu comparar diretamente a importância dos antimaláricos quinolínicos para a composição dos complexos metálicos. Em seguida, planejou-se um complexo metálico análogo ao RubipyAQ, porém destituído do co-ligante bipyridina, levando à composição do complexo RuAQ. Com o complexo RuAQ, foi possível avaliar a importância da presença de um co-ligante para a atividade antimalárica.

Na próxima etapa, inspirado na composição química dos complexos de platina, nos quais apresentaram co-ligante fosfínico, foram planejados complexos rutênio-amodiaquina contendo co-ligante trifenilfosfina (TFF). Isso resultou na preparação do complexo RuPAQ. Por último, diante dos relatos da atividade antimicrobiana de complexos de ouro (I) e ouro (III), em especial o fármaco anticâncer e antimicrobiano Auranofino (HARBUT et al., 2015; SSEMAGANDA et al., 2018), foi planejado o complexo análogo ao RuPAQ, o AuPAQ, porém contendo átomo de ouro ao invés de rutênio.

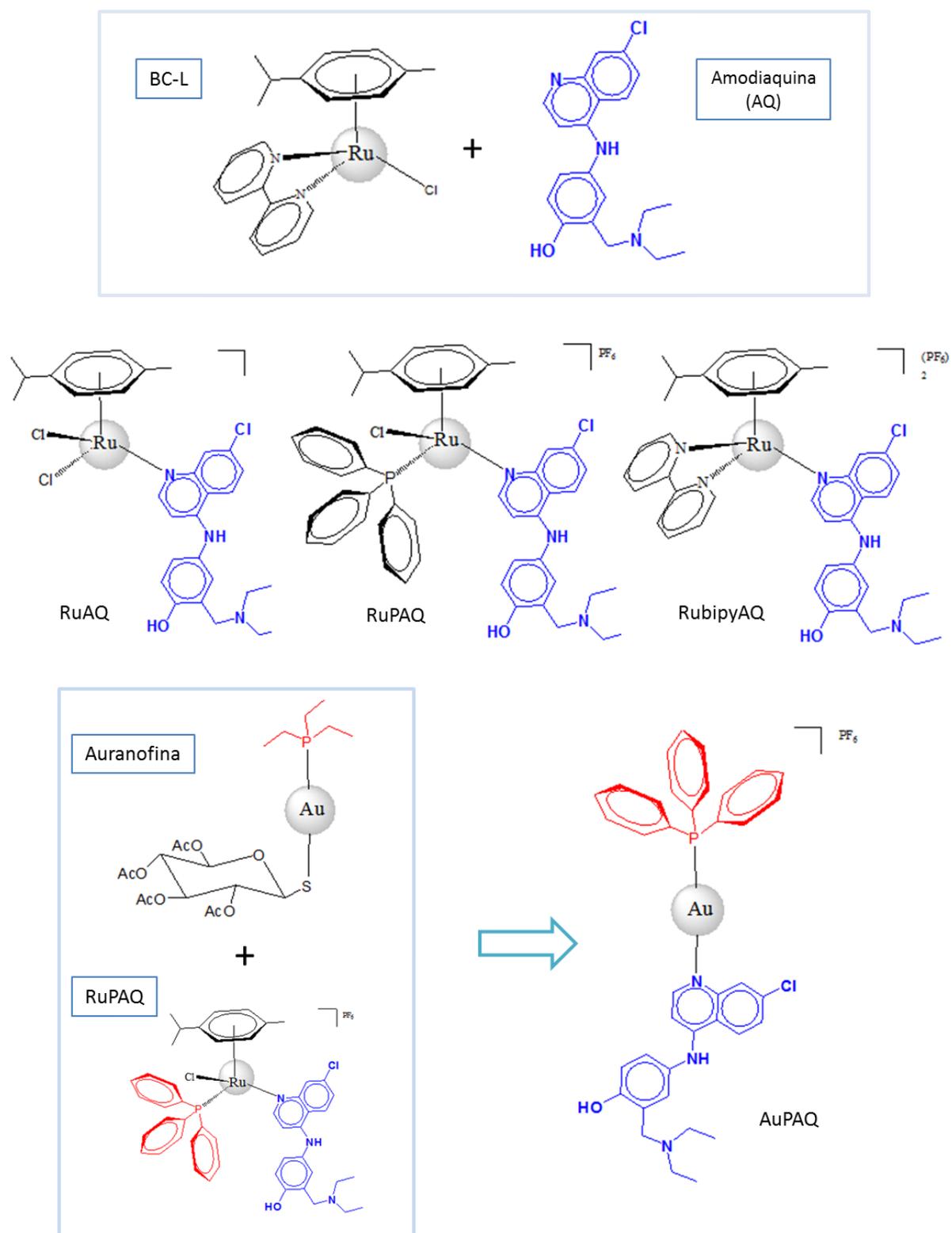


Figura 8. Estrutura química dos complexos rutênio/amodiaquina e ouro/amodiaquina. Em cor azul, destaque para a presença da AQ. Em cor vermelha, destaca-se a fosfina, presente no fármaco anticâncer e antiparasitário Auranofina e no composto RuPAQ.

4.2 PARASITOS

No trabalho foi utilizada a cepa W2 (resistente à cloroquina) do *P. falciparum*, assim como as cepas transgênicas do *P. berghei* expressando apenas a proteína verde fluorescente (GFP) (*PbGFP*) e outra expressando tanto GFP quanto luciferase (Luc) (*PbGFP-Luccon*, parasito da linhagem 676m111). Para a análise da atividade frente a gametócitos, foi utilizada a cepa 3D7 do *P. falciparum* modificada (3D7elo1-pfs16-CBG99) expressando luciferase sob o controle de um promotor específico para expressão em gametócitos.

A manutenção da cepa W2 do *P. falciparum in vitro* foi realizada todos os dias para otimizar o crescimento do parasito, conforme descrito por Trager e Jensen (1976). Primeiramente, foi feita uma centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos, descartando o sobrenadante. O *pellet* foi homogeneizado e um esfregaço sanguíneo feito, corado com Giemsa (Panótico rápido - Laborclin, Pinhais, Brasil) e visualizado ao microscópio óptico (100x) para avaliar o estágio em que o parasito se encontrava e a parasitemia da cultura. A partir da parasitemia, fez-se a avaliação do volume de sangue O+ (doado pela Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado da Bahia - HEMOBA) a ser adicionado juntamente com 10% de plasma humano O+ (doado pela HEMOBA) previamente inativado. Para finalizar, uma mistura padrão de gases (3% O₂, 5% CO₂ e 91% N₂) foi adicionada à garrafa. Para a sincronização da cultura em anéis, foi utilizado o D-sorbitol (Sigma-Aldrich) a 5% (MOLL et al., 2008).

As cepas do *P. berghei* foram mantidas através de passagens semanais em camundongos da linhagem Swiss Webster, machos, com idade entre 8-16 semanas e pesando entre 18-30 g. Os animais foram infectados por injeção intraperitoneal (i.p) de eritrócitos infectados contendo fases assexuadas do parasito, tais como formas de anel, trofozoítos e esquizontes. Quando a parasitemia atingiu 10%, o procedimento de rotina utilizado foi a coleta de sangue através da artéria braquial, em tubo heparinizado, de um camundongo infectado devidamente anestesiado com 2,2,2-tribromoetanol (Sigma-Aldrich) na dose de 250 mg/kg (i.p.). O sangue coletado foi lavado com tampão fosfato-salino 1x (PBS) por centrifugação a 2000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, foi feita a contagem de hemácias parasitadas para, por fim, inocular de 10⁵ a 10⁸ hemácias infectadas em um animal não-infectado (*naive*).

4.3 ENSAIO DE HEMÓLISE

Eritrócitos humanos O+ frescos (doados pela HEMOBA) e não infectados foram centrifugados três vezes com tampão fosfato-salino (PBS), ajustados para 1% de hematócrito e 100 µL foram distribuídos em uma placa de fundo redondo de 96 poços. Então, 100 µL dos compostos previamente solubilizados em DMSO (Sigma-Aldrich) e suspensos em PBS foram dispensados nos respectivos poços. Cada composto foi testado em sete concentrações (50-0,78 µM), em triplicata. Hemácias não tratadas receberam 100 µl de PBS contendo 0,5% de DMSO (controle negativo), enquanto para o controle positivo foi utilizada saponina (Sigma-Aldrich) a 1% v/v. As placas foram incubadas por 1 hora a 37 °C sob 5% de CO₂ e então centrifugadas a 1500 rpm por 10 min. Um volume de 100 µL do sobrenadante foi transferido para uma segunda placa, a qual foi lida em espectrofotômetro SpectraMax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 540 nm, conforme descrito em Wang et al. (2010). A porcentagem de hemólise foi calculada em comparação com os controles positivos e negativos, usando GraphPad Prisma 5.01.

4.4 ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA CONTRA FORMAS ASSEXUADAS

Eritrócitos humanos O+ (doados pelo HEMOBA) foram infectados pela cepa W2 do *P. falciparum* previamente e sincronizados em anéis com uso de sorbitol. Após centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos, o *pellet* foi ressuscitado em meio RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific). A parasitemia foi ajustada entre 1-1,5% e o hematócrito entre 2,0-2,5%, e a suspensão celular foi distribuída em placas de 96 poços. Os compostos foram solubilizados em DMSO e as concentrações de cada composto (4 – 0,0009 µM) foram obtidas após diluição seriada em meio RPMI-1640, em triplicata. Após a adição dos compostos, as placas de cultura foram mantidas por 24 horas na temperatura de 37 °C (3% O₂, 5% CO₂ e 91% N₂). A metodologia da [³H]-hipoxantina foi utilizada (DESJARDINS et al., 1979), a qual permite avaliar a viabilidade dos parasitos através da incorporação no DNA de parasitos viáveis. Após a adição da [³H]-hipoxantina (PerkinElmer) em cada poço, as placas foram incubadas por 24 horas. Após as quais as hemácias foram lisadas por meio de sucessivos ciclos

de congelamento/descongelamento, e o conteúdo transferido para placas revestidas UniFilter-96 GF/B PEI (PerkinElmer) usando um coletor celular MPXRI 96TI (Bradel, Gaithersburg, MD, USA). Após secagem, 50 µl de coquetel de cintilação líquida (MaxiLight, Hidex, Turku, Finlândia) foram adicionados em cada poço, a placa foi selada e lida em um contador de microplacas de cintilação líquida (Chameleon, Turku, Finlândia). A concentração inibitória para 50% (CI₅₀) foi determinada utilizando o Prism versão 5.01.

4.5 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS

Células de linhagem HepG2 e J774 foram plaqueadas em placas de 96 poços com meio RPMI e *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Thermo Fisher Scientific), respectivamente, a uma concentração de 1×10^4 células/poço. Os compostos foram adicionados 24 horas após o plaqueamento dando início a um período de incubação de 72 horas a 37 °C e 5% CO₂. Os compostos foram testados em oito concentrações (50-0,08 µM), em triplicata. Após o período de incubação, 25 µl de corante de resazurina (AlamarBlue - Thermo Fisher Scientific) foram adicionados e as placas incubadas por 4 horas em estufa. As leituras colorimétricas foram realizadas em 570 e 600 nm, usando o espectrofotômetro SpectraMAX Instrument 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A concentração citotóxica para 50% (CC₅₀) foi determinada utilizando o Prism versão 5.01. A partir dos valores de CC₅₀ e CI₅₀, foi possível calcular o índice de seletividade (IS) através da fórmula: $IS = CC_{50} \div CI_{50}$.

4.6 ENSAIO DA β-HEMATINA

Em uma placa de 96 poços de fundo redondo, um volume de 25 µL de uma solução de heme a 16 mM dissolvida em DMSO foi distribuída. Em seguida, um volume de 20 µL dos compostos na faixa de concentração de 8,0 até 0,125 mM foi adicionado, cada concentração em quadruplicata. Nos poços controles, foi adicionado um volume de 20 µL de DMSO. Em seguida, adicionou-se um volume de 25 µL de solução aquosa do detergente IGPAL (1%, v/v), seguido da adição de 100 µL do tampão acetato (8.0 M, pH 5). A placa foi incubada na estufa de CO₂ à 37 °C. Após 24 horas de incubação, os cristais de β-hematina foram quantificados como descrito

por Parapini et al (2000). Os valores de CI_{50} foram calculados conforme descrito acima para os demais ensaios.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CONTRA O ESTÁGIO HEPÁTICO DO *P. BERGHEI*

Células Huh-7, uma linhagem humana de hepatoma, foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% v/v SBF, 1% v/v aminoácidos não essenciais, penicilina/estreptomicina a 1% v/v, glutamina a 1% v/v e ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinoetanossulfônico (HEPES) 10 mM, pH 7 e mantido a 37 °C com 5% de CO₂. Para os ensaios de infecção, as células Huh-7 (1x10⁴/poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços no dia anterior ao tratamento com os compostos e a infecção. Após 24 horas, AuPAQ, RuPAQ e AQ foram adicionados em triplicata em concentrações que variaram de 0,001 µM a 10 µM. Um controle negativo foi utilizado contendo apenas DMSO (0,1%) mimetizando a maior concentração do diluente nos compostos. Após a adição dos compostos, foi dado início a um período de incubação em estufa a 37 °C, 5% CO₂ por 1 hora. Os esporozoítos *Pb-Luci* foram dissecados das glândulas salivares de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles stephensi* infectados. Após contagem em câmara de Neubauer, os esporozoítos foram adicionados à placa na proporção de 1:1 (1 x 10⁴/poço). Em seguida, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 1800g, à temperatura ambiente, e posteriormente incubada por 46 horas a 37 °C, 5% CO₂. O efeito dos compostos na viabilidade de células Huh-7 foi avaliado pelo ensaio AlamarBlue (Life), utilizando o protocolo do fabricante. Após a adição do corante, a placa foi incubada em estufa a 37 °C, 5% CO₂ por 1 hora e 30 minutos. Após esse período foi feita a leitura em leitor de placa a 530/590 nm (Tecan, CH). A atividade antiparasitária foi avaliada por luminescência. Para isso, as células foram lisadas com o reagente de lise celular do Promega Luciferase Assay System Kit® (Promega), centrifugadas a 1800xg por 5 minutos e 20 µl do sobrenadante transferido para placa branca de 96 poços. O substrato de ensaio de luciferase (Promega Luciferase Assay System Kit®) foi adicionado às amostras parasitadas lisadas e a intensidade de luminescência das amostras foi medida utilizando um leitor de microplacas (Tecan, CH). As medições da atividade da luciferase foram expressas como unidades de luminescência relativa (URL).

4.8 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA FRENTE A GAMETÓCITOS DO *P. FALCIPARUM*

Em colaboração com a Dr^a Nicoletta Basilico Basilico no Departamento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari da Università degli Studi di Milano (Milão, Itália), os compostos (AuPAQ, RuPAQ e AQ) foram testados frente formas sexuadas do *P. falciparum*. A cepa transgênica 3D7elo1-pfs16-CBG99 foi mantida em eritrócitos humanos tipo 0+ a 5% de hematócrito em meio completo, consistindo em RPMI-1640 (Euroclone) contendo 24 mM de bicarbonato de sódio, com a adição de 10% (v / v) de soro humano 0+ inativado pelo calor, hipoxantina 0,37 mM, L-glutamina 2 mM e HEPES 20 mM. As culturas foram mantidas a 37 °C numa mistura de gás padrão consistindo em 1-3% de O₂, 5% de CO₂ e 92-94% de N₂. Para desencadear a gametogênese, as culturas foram diluídas para 0,5% de parasitemia e o meio foi trocado diariamente sem adição de glóbulos vermelhos frescos. Quando a cultura atingiu mais de 5% de parasitemia, foi adicionada N-acetilglucosamina (NAG) 50 mM durante 48-96 h para limpar os parasitos assexuados residuais e obter uma cultura de gametócitos pura. Os compostos foram diluídos em série em placas de 96 poços (concentração: 29 – 0,22 µM) em 100 µL por poço. Então, 100 µL de gametócitos 3D7elo1-pfs16-CBG99 a 0,5–1% de parasitemia e 2% de hematócrito foram dispensados. Cada composto foi testado em triplicata, em sete concentrações. O azul de metileno foi utilizado como controle positivo. As placas foram incubadas por 72 horas a 37 °C sob 3% O₂, 5% de CO₂, 91% de atmosfera de N₂. A atividade da luciferase foi tomada como medida de viabilidade de gametócitos, previamente descrito na literatura (CEVENINI et al., 2014). 100 µl de meio de cultura foram removidos de cada poço para aumentar o hematócrito; 70 µL de cultura ressuspensa foram transferidos para placa preta de 96 poços e 70 µL de D-luciferina (1 mM em tampão citrato 0,1 M, pH 5,5) foram adicionados. As medidas de luminescência foram realizadas após 10 min com tempo de integração de 500 ms. O CI₅₀ foi extrapolado da análise de regressão não linear da curva concentração-resposta.

4.9 AVALIAÇÃO DA PARASITEMIA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para a avaliação da parasitemia dos animais infectados com a cepa *PbGFP*, foram coletados 10 µL de sangue da cauda de cada camundongo em tubos contendo 100 µL de heparina (Hemofol) (1% em salina). As amostras foram diretamente

adquiridas no citômetro FACS Calibur (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA) através da leitura de 250.000 eventos no canal FITC (isotiocianato de fluoresceína) e os dados analisados através do software FlowJo (Ashland, OR).

4.10 ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA *IN VIVO*

4.10.1 *Animais*

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss Webster obtidos e mantidos nas instalações do IGM-FIOCRUZ. Os animais ficaram alojados em gaiolas com acesso livre a comida e água. Todos os animais foram submetidos a um ciclo de luz-escuro de 12 em 12 h. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) sob o número 016/2017.

4.10.2 *Ensaio de atividade antiparasitária in vivo (metodologia de Peters)*

A avaliação da supressão de parasitemia foi feita através da metodologia de Peters (PETERS et al., 1975). Camundongos Swiss Webster, machos, com peso de 18-22 g ($n=5$ /grupo) foram infectados por inoculação intraperitoneal com 1×10^6 eritrócitos parasitados pelo *P. berghei*-GFP. Após 24 horas da infecção, os animais foram tratados, por via intraperitoneal, com 100 μ L de amodiaquina (14.5 mg/kg), de AuPAQ (30 mg/kg) ou de RuPAQ (15, 30 e 60 mg/kg) solubilizados em DMSO e salina (20%), uma vez ao dia, durante quatro dias consecutivos. O grupo controle negativo recebeu apenas salina e DMSO na mesma proporção dos compostos. A atividade antiparasitária foi determinada pela avaliação da parasitemia por citometria de fluxo nos dias 7 e 8 após a infecção. A sobrevivência foi monitorada todos os dias durante 30 dias após infecção.

4.11 QUANTIFICAÇÃO DE HEMOZOÍNA

Para avaliar a capacidade do composto em inibir a formação de hemozoína do parasito e quantificar as frações do sangue (meta-hemoglobina, hemoglobina e heme livre, hemozoína), camundongos da linhagem Swiss Webster, machos, com peso de 18-22 g ($n=3$ /grupo) foram infectados pelo *PbGFP* por inoculação intraperitoneal com 1×10^6 eritrócitos parasitados. Em seguida, a parasitemia dos animais foi monitorada por citometria de fluxo e, ao atingirem uma média 8-15 % de parasitemia, o tratamento em dose única foi administrado por via intraperitoneal. Após 24 h do tratamento, o sangue dos animais foi coletado e devidamente congelado a -20 °C até análise. A

quantificação foi feita seguindo a metodologia descrita por Combrinck et al., 2013. Além da quantificação bioquímica da hemozoína, foram coletadas amostras de sangue para obtenção de micrografias através da luz polarizada (PISCIOTTA et al., 2017). Esfregaços sanguíneos foram corados com DAPI e examinados por meio de microscopia de luz de campo claro, fluorescência e polarização. Micrografias foram feitas no aumento de 100 X para avaliar presença de cristais de hemozoína birrefringentes. Foram obtidas no mínimo 5 micrografias de cada amostra e a quantificação foi realizada de forma randomizada por no mínimo 2 microscopistas diferentes.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes ou a mediana \pm desvio padrão de dois experimentos. A significância das diferenças nos resultados foi estimada pelo teste de ANOVA, e a probabilidade das diferenças entre os resultados observados em diferentes grupos serem devido ao acaso foi avaliada pelo teste de Newman-Keuls ou Tukey. Todos os dados foram analisados utilizando o programa Prisma (GraphPad Software, Intuitive Software for Science, San Diego, CA). Diferenças estatísticas foram consideradas para $p < 0,05$. Foram considerados os valores de curva concentração-resposta, nos experimentos para determinação de CI_{50} , CC_{50} e DE_{50} , quando o R^2 apresentado foi no mínimo 0,8.

5 RESULTADOS

5.1 COMPLEXOS METÁLICOS COM A AMODIAQUINA SÃO ANTIPARASITÁRIOS POTENTES E SELETIVOS FRENTE AO ESTÁGIO SANGUÍNEO ASSEXUADO DA MALÁRIA

Inicialmente, foi realizada a avaliação da atividade antiparasitária *in vitro* dos compostos frente à cepa W2 do *P. falciparum* (cloroquina resistente). O acompanhamento do desenvolvimento do parasito foi realizado por meio da preparação de esfregaço sanguíneo em lâminas para análise em microscópio óptico, no aumento de 100X, como exemplificado na Figura 9^a. Exemplos das curvas concentração-resposta utilizadas para o cálculo da CI₅₀ podem ser vistos na Figura 9 (B e C).

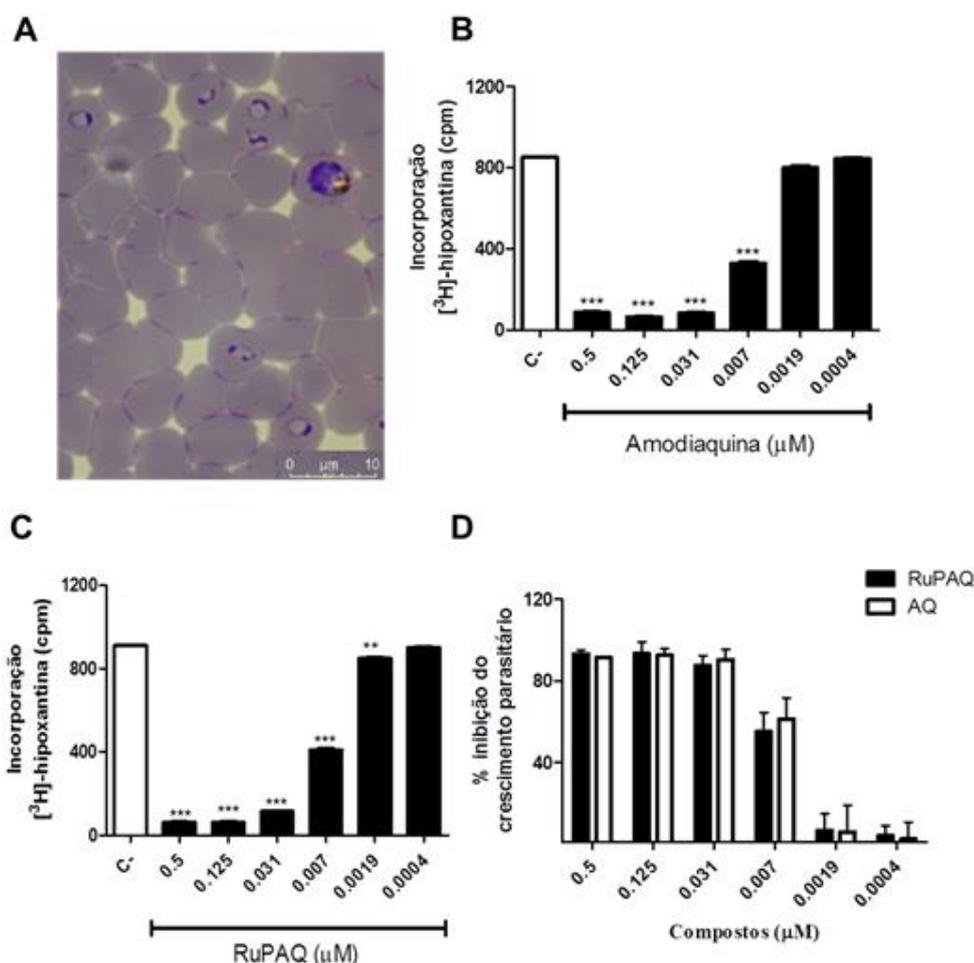


Figura 9. Avaliação da atividade antiparasitária *in vitro* dos compostos frente à cepa W2 do *P. falciparum*. (A) Micrografia do esfregaço sanguíneo corado com Giemsa representativo da cultura do

P. falciparum. **(B)** Curva concentração-resposta (0.5-0.0004 μM) da amodiaquina e **(C)** RuPAQ frente à cepa W2 do *P. falciparum*, determinada através da incorporação da [^3H]-hipoxantina **(D)** Porcentagem de inibição do crescimento dos parasitos após adição da amodiaquina e RuPAQ (0.5-0.0004 μM). Barras do erro indicam o desvio padrão. Valores representam a média \pm S.E.M de um experimento realizado em triplicata. One-Way ANOVA, *** $p < 0.001$ em comparação com o controle não-tratado (C-). CPM = contagem por minuto.

A porcentagem de inibição do crescimento do parasito após tratamento com a AQ e RuPAQ, por exemplo, pode ser visto na Figura 9D, evidenciando o comportamento dependente da concentração desses compostos. Todos os valores de CI_{50} dos 6 compostos testados podem ser vistos na Tabela 1. Quando comparados com a AQ, os compostos RuAQ e AuPAQ demonstraram atividade antiparasitária ao menos duas vezes mais potente frente à cepa W2, enquanto que os demais compostos, RubipyAQ e RuPAQ, apresentaram atividade antiparasitária equipotente à AQ. Todos os compostos mostraram atividade antiparasitária mais potente do que a CQ, indicando que resistência à CQ não causa resistência à AQ e seus derivados. Isso pode ser confirmado ao avaliar os valores de CI_{50} frente à cepa cloroquina sensível NF54, gentilmente obtidos pelo Prof. Sergio Wittlin do Instituto de Medicina Tropical da Suíça (Basel, Suíça), os quais demonstram escala de atividade similar dos compostos à observada frente cepa W2, com exceção da CQ. Os resultados mostram que os compostos apresentaram uma relação entre as concentrações testadas e o efeito inibitório do crescimento parasitário, indicando que este último é diretamente proporcional ao aumento das concentrações testadas.

Para avaliar a citotoxicidade dos compostos em teste, foram realizados ensaios de viabilidade celular em células de linhagem HepG2 (hepatocarcinoma humano) e J774 (macrófagos murinos). Duas linhagens foram utilizadas no estudo para avaliar toxicidade dos compostos frente a células tumorais e não tumorais, já que as células tumorais tendem a ser mais resistentes ao tratamento quimioterápico, além de avaliar frente linhagem murina e humana.

A AQ apresentou valores de CC_{50} de 40,5 e $7,4 \pm 0,5 \mu\text{M}$ para HepG2 e J774, respectivamente. A CQ se mostrou menos citotóxica para ambas as linhagens quando comparada com a AQ, o que se justifica pelos efeitos adversos já descritos em humanos causados pela AQ. Assim como a AQ, todos os compostos foram mais citotóxicos para linhagem J774 e menos citotóxicos na linhagem HepG2 (Tabela 1). Em suma, os compostos em teste apresentaram valores de CC_{50} muito superiores

àqueles necessários para inibir em 50% o crescimento dos parasitos da cepa W2 no teste *in vitro*.

O índice de seletividade (IS) foi calculado a partir dos valores de CI_{50} e CC_{50} , avaliando a seletividade do composto em relação às células de mamífero (J774) e do parasito (cepa W2). Com isso, quanto maior o valor do índice, mais seletivo é o composto. Os compostos RuAQ e AuPAQ se mostraram mais seletivos do que a AQ (Tabela 1). O AuPAQ foi mais citotóxico para células de mamíferos, porém, este foi mais potente frente ao parasito.

Tabela 1. Atividade antiparasitária dos complexos de ouro e rutênio em fases intraeritrocíticas do *P. falciparum* (cepas W2 e NF54), citotoxicidade em células J774 e HepG2 e índice de seletividade.

Compostos	$CI_{50} \pm DP(\mu M)^a$				I.S.
	W2	NF54	J774	HepG2	
Amodiaquina	0,0074± 0,00179	0,0114 ± 0,0052	7,4±0,5	40,5±0.9	1000
RuAQ	0,0032±0,00173	0,0063 ± 0,00067	3,7±0,1	> 50	1156
RuPAQ	0,0083±0,002312	0,0038 ± 0,00035	6,7±0,7	25,6±4,6	807
RubipyAQ	0,012 ^b	-	9,9±0,4	> 50	825
AuPAQ	0,0035±0,0024	0,0069 ± 0,00075	4,8±0,8	8,7±1,2	1371
Cloroquina	0,43±0,09	0,0075 ± 0,0001	37,6 ±3,6	>50	190

^a DP = desvio padrão. I.S. = índice de seletividade, determinado frente cepa W2 *versus* J774. ^bValor referente a 1 experimento.

Após observar que os compostos possuem atividade antiparasitária potente e seletiva frente à cepa CQ-resistente no estágio intraeritrocítico do *P. falciparum*, decidimos estudar se a atividade antiparasitária observada era devida à capacidade dos compostos em inibir a formação do pigmento malárico (hemozoína). Para avaliar o potencial dos compostos em inibir a hemozoína, estabelecemos o ensaio de inibição da β -hematina, o qual é um análogo sintético do pigmento malárico, onde sua formação ocorre em solução em condições de pH 5, mimetizando o VD (EGAN et al., 2008). A CQ é o composto de referência no ensaio da β -hematina. Portanto, para tentar correlacionar se a atividade antiparasitária é devida à inibição da β -hematina,

determinamos a atividade antiparasitária frente à cepa NF-54 do estágio intraeritrocítico do *P. falciparum* (CQ-sensível). A estrutura química dos compostos utilizados no ensaio e seus respectivos exemplos de curva, que mostra, o percentual de inibição da β -hematina, podem ser vistos na Figura 10A e B.

Como pode ser observado na Tabela 2, em comparação com a CQ, a AQ foi mais potente em cerca de duas vezes em inibir a formação da β -hematina, o que é condizente com os relatos na literatura (PARAPINI et al., 2000). Em comparação com a AQ, o composto RuPAQ foi cerca de duas vezes mais potente em inibir a formação da β -hematina, sendo o mais potente dentre os compostos. De fato, o composto RuPAQ foi cerca de três vezes mais potente em efeito antiparasitário frente ao *P. falciparum* do que a AQ (Tabela 1).

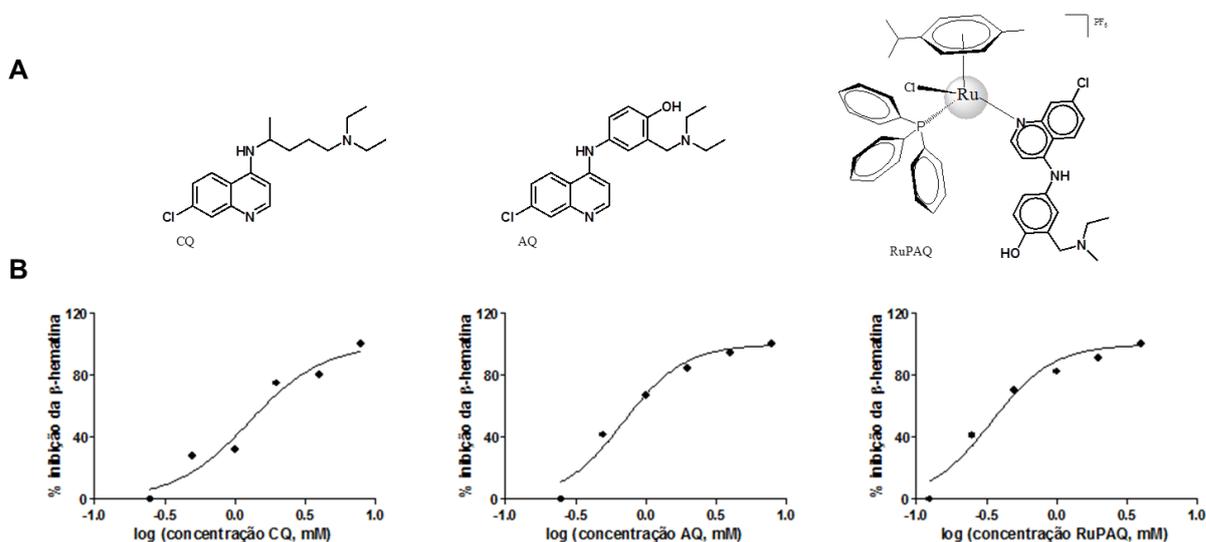


Figura 10. Os compostos exercem ação antiparasitária por inibirem a formação da β -hematina. (A) Estruturas químicas dos compostos selecionados. **(B)** Exemplos de curva concentração-resposta na atividade inibitória da formação da β -hematina.

Tabela 2. Valores de CI_{50} frente a atividade antiparasitária em fases intraeritrocíticas da cepa NF-54 (CQ-sensível) do *P. falciparum* e atividade inibitória na formação da β -hematina.

Compostos	<i>P. falciparum</i> , cepa NF-54	β -hematina
	$CI_{50} \pm D.P. (\mu M)^a$	$CI_{50} \pm (I.C.) (mM)^b$
Amodiaquina	0,011 \pm 5,2	0,47 (0,36 - 0,61)
RuAQ	0,006 \pm 0,67	0,41 (0,25 – 0,67)
RuPAQ	0,0038 \pm 0,34	0,34 (0,24 - 0,48)

Precursor RuPAQ	> 2,0 ^c	> 8,0
RubipyAQ	0,000012 ^c	1,66 (1,37 - 4,06)
AuPAQ	0,0069 ± 0,78	N.D.
Precursor AuPAQ	> 2,0 ^c	> 8,0
Cloroquina	0,0075 ± 0	1,26 (0,84 - 1,89)

^aD.P. = desvio padrão da média. I.C. índice de confiança para 95 %. ^cValores referente a cepa W2 do *P. falciparum*. N.D. = não determinado.

De maneira análoga, nós observamos que o composto RubipyAQ, no qual apresentou a menor potência da atividade antiparasitária, também foi o composto com menor potência em inibir a formação da β -hematina. Estes dois exemplos sugerem que a atividade antiparasitária dos compostos está associada à inibição da biossíntese da hemozoína. Como pode ser observado na Tabela 2, os precursores do RuPAQ e do AuPAQ foram destituídos tanto de atividade antimalárica como de inibição da β -hematina, pontuado assim que a atividade dos compostos RuPAQ e AuPAQ é dependente da presença da AQ.

5.2 COMPLEXOS METÁLICOS COM A AMODIAQUINA SÃO ANTIPARASITÁRIOS FRENTE À MALARIA SEM INDUZIR HEMÓLISE DAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS

Para garantir que o efeito antiparasitário não foi inespecífico, foi realizado o ensaio de hemólise em eritrócitos não infectados. Saponina a 1% foi utilizada como controle positivo por sua capacidade de causar desorganização das membranas das células sanguíneas (ação hemolítica). Dentre os compostos testados, apenas o complexo AuPAQ induziu hemólise na concentração de 50 μ M (Figura 11A).

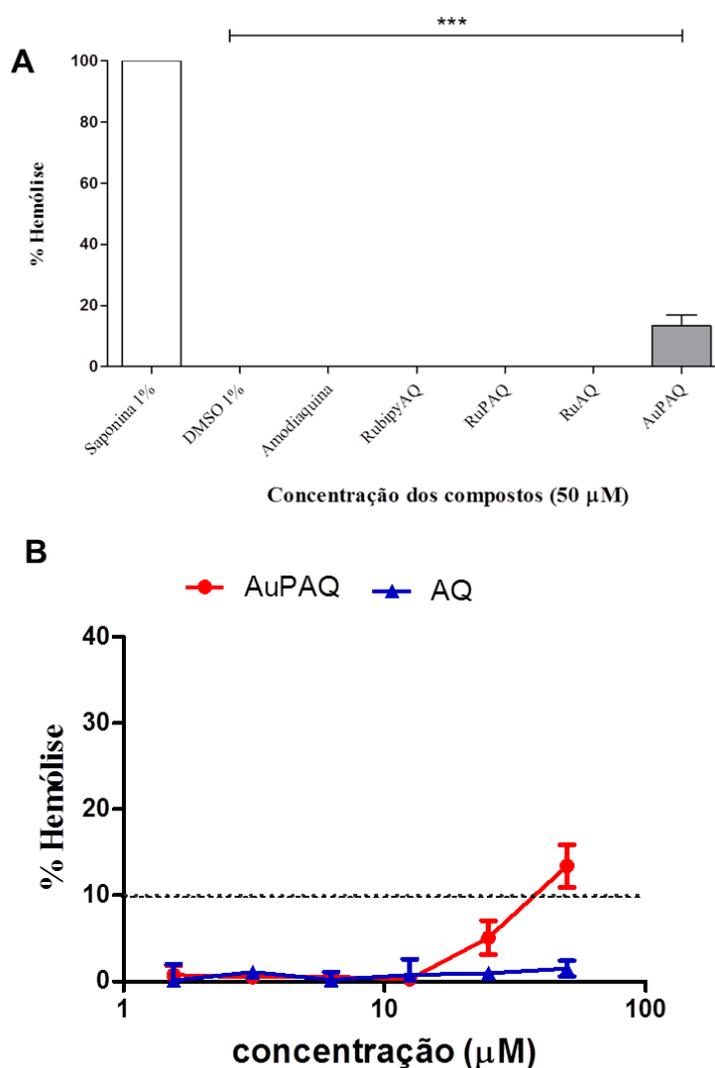


Figura 11. Avaliação de potencial hemolítico. (A) Percentual de hemólise em eritrócitos não infectados e tratados com os complexos rutênio/amodiaquina e ouro/amodiaquina (concentração de 50 µM) por 1 hora. A taxa de hemólise foi comparada em relação ao controle positivo com saponina 1%. Barras do erro indicam o desvio padrão. Valores representam a média±S.E.M de dois experimentos. One-Way ANOVA. *** $p < 0.001$ em comparação com o controle positivo. **(B)** Curva concentração-resposta referente ao percentual de hemólise em eritrócitos não infectados e tratados com o complexo AuPAQ e Amodiaquina (AQ) por 1 hora. Linha pontilhada indica valores abaixo de 10%. Barras do erro indicam o desvio padrão. Dois experimentos independentes realizados.

Um experimento de curva concentração-dependente foi realizado a fim de estimar com mais precisão o potencial hemolítico do AuPAQ, e somente em concentrações acima de 25 µM o composto AuPAQ começou a induzir hemólise, porém pouco acima de um limiar de 10% (Figura 11B), mostrando que a atividade antiparasitária demonstrada por todos os complexos *in vitro* frente cepa W2 do *P.falciparum* não foi inespecífica, não afetando células hospedeiras.

5.3 COMPLEXOS METÁLICOS COM A AMODIAQUINA SÃO POTENTES ANTIPARASITÁRIOS FRENTE ESPOROZOÍTOS DO *P. BERGHEI*

Para continuidade do estudo foram selecionados dois complexos metálicos, o AuPAQ e RuPAQ. A escolha se deu pelo fato do AuPAQ ter demonstrado ser o mais potente com relação ao efeito antiparasitário nos primeiros ensaios, e o RuPAQ por ter sido o menos citotóxico em células não tumorais (J774) e por ser análogo ao BCQ, complexo mais ativo dentre os de CQ testados pelo nosso grupo de pesquisa (MACEDO et al., 2016).

A fim de avaliar o espectro de ação dos complexos de rutênio e ouro associados à AQ, foi realizada avaliação de atividade antiparasitária frente esporozoítos do *P. berghei* em colaboração com o Dr. Miguel Prudêncio na Universidade de Medicina de Lisboa. Para tal mensuração, foi utilizada metodologia ilustrada na Figura 12A.

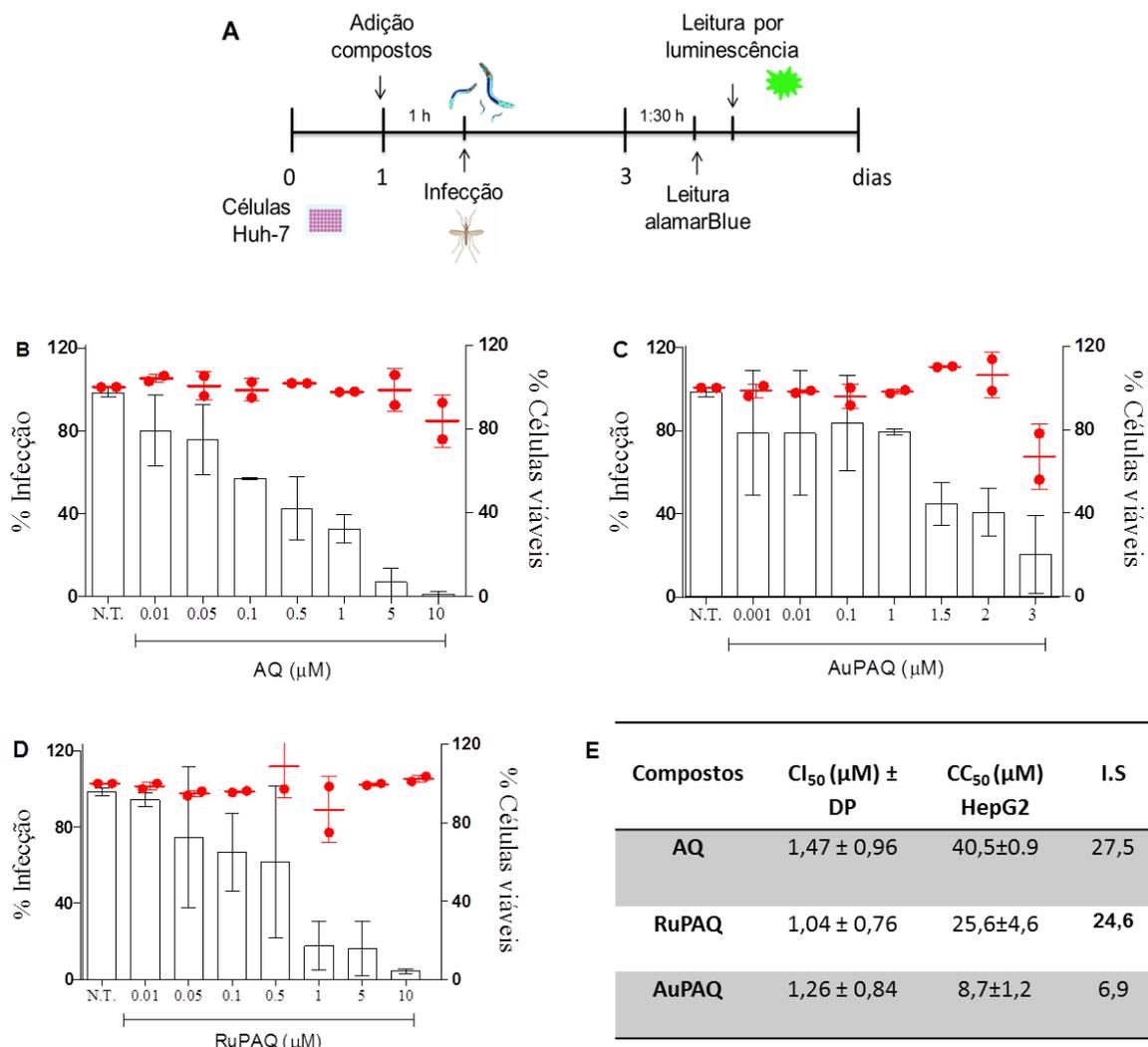


Figura 12. Teste de atividade contra esporozoítos do *P. berghei*. (A) Desenho experimental para avaliação dos compostos frente esporozoítos. Células Huh-7 plaqueadas foram tratadas com os compostos e infectadas com esporozoítos. A intensidade de bioluminescência foi medida 48 horas após a infecção. Barras representam infecção e os pontos vermelhos representam a confluência das células Huh-7. Controle negativo recebeu apenas DMSO 0.1%. (B) Ação da AQ (C) AuPAQ e (D) RuPAQ. (E) Valores de CI₅₀ calculados a partir de dois experimentos independentes. Barras de erro representam desvio padrão de cada concentração em triplicata. Resultados de dois experimentos independentes.

A Figura 12 (B, C e D) mostra as curvas de concentração *versus* efeito, representando os padrões de inibição da infecção apresentados pelos compostos e a AQ, utilizadas para cálculo dos valores de CI₅₀, assim como a citotoxicidade dos compostos frente células Huh-7. A inibição da infecção foi concentração-dependente. Os dois compostos, além da AQ, apresentaram atividade potente e eficaz frente fase hepática da doença, através da diminuição do percentual de infecção de células Huh-7 por esporozoítos do *P. berghei*. Isso evidencia atividade multi-estágio dos

compostos, que provavelmente agem através de mecanismos distintos nas diferentes fases da doença, já que os parasitos da fase hepática diferem estruturalmente e bioquimicamente dos parasitos da fase sanguínea, como por exemplo, na presença do processo de cristalização de heme tóxico dando origem aos cristais de hemozoína. Os valores de CI_{50} encontrados para os compostos podem ser vistos na Figura 12E. Diferentemente dos resultados obtidos no estágio eritrocítico, o RuPAQ demonstrou ser o mais potente e ativo frente aos esporozoítos pelo valor de CI_{50} obtido ser o mais reduzido. Os complexos metálicos não foram tóxicos para as células hospedeiras, visto que se mantém uma linearidade na viabilidade das células em comparação com o controle não tratado. Para o cálculo do índice de seletividade, foram utilizados os valores obtidos na triagem inicial dos compostos frente à linhagem HepG2, por se tratar de uma linhagem bastante similar à Huh-7. De maneira geral, os compostos se mostraram, no mínimo, 5 vezes mais seletivos para células infectadas com os esporozoítos do que para células de hepatocarcinoma humano.

5.4 COMPLEXOS METÁLICOS COM A AMODIAQUINA SÃO POTENCIAIS ANTIPARASITÁRIOS NA TRANSMISSÃO DA MALÁRIA

Visto que os compostos demonstraram atividade antiparasitária potente e seletiva frente aos estágios eritrocítico e hepático do ciclo do parasito, avaliamos a capacidade dos complexos em agir frente às formas sexuadas do *P. falciparum* da cepa 3D7, os gametócitos. O uso de compostos capazes de interromper a transmissão da malária tem sido defendido como uma forma de prevenir o desenvolvimento de resistência aos medicamentos e acelerar o processo de controle epidemiológico (NOGUEIRA et al., 2010).

Os experimentos foram realizados em colaboração com a Dr^a Nicoletta Basilico no Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari da Università degli Studi di Milano (Milão, Itália). O azul de metileno foi utilizado como controle positivo. Os valores de CI_{50} podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3. Atividade *in vitro* dos complexos de rutênio associados à amodiaquina contra gametócitos do estágio V de *P. falciparum* da cepa 3D7.

Compostos	CI₅₀ (μM) ± DP
Amodiaquina	23,6 ± 5,04
RuPAQ	8,97 ± 2,0
AuPAQ	7,38 ± 1,3
Azul de Metileno	0,038 ± 0,01

DP = Desvio padrão.

Em concentrações de até 23,6 μM, a AQ não foi tão potente em inibir os gametócitos, enquanto que os complexos AuPAQ e RuPAQ apresentaram atividade inibitória mais potente, com valores de CI₅₀ de 7,38 e 8,97 μM, respectivamente, evidenciando uma atividade dos complexos metálicos frente a gametócitos não demonstrada pelo antimalárico. Mais uma vez, a ação demonstrada sugere que os compostos atuam através de diferentes mecanismos nas fases da doença já que, na fase sexuada, há pouca produção de hemozoína, e se trata de um estágio de maturação do parasito sem caráter proliferativo, como ocorre nos estágios sanguíneos e hepático.

5.5 OTIMIZAÇÃO NA CONTAGEM DE PARASITEMIA EM ANIMAIS INFECTADOS COM *P. BERGHEI* ATRAVÉS DA CITOMETRIA DE FLUXO

O exame microscópico de esfregaços sanguíneos finos corados com Giemsa continua sendo o método padrão ouro para quantificar parasitos da malária. No entanto, esta técnica requer microscopistas treinados. Aqui, foi utilizado o método de citometria de fluxo, rápido e simples, para avaliar a parasitemia no sangue total de animais infectados com *P. berghei*. Na Figura 13A, é possível observar micrografias obtidas com microscópio confocal que confirmam a marcação do núcleo com o corante DAPI e a expressão positiva da proteína fluorescente verde (GFP) do parasito geneticamente modificado, o que permitiu fazer uso da citometria para mensuração da parasitemia. Para confirmar que o resultado obtido no citômetro era fidedigno, comparamos uma micrografia para contagem convencional do esfregaço sanguíneo e um dot-plot representativo de citometria de fluxo que expressa a parasitemia do mesmo animal infectado com o *P. berghei* GFP (Figura 13B e C). A parasitemia

observada no esfregaço sanguíneo através da contagem de parasitos/nº de hemácias foi similar ao resultado obtido no citômetro ($\cong 8\%$). A confirmação de similaridade nos valores obtidos permitiu a continuidade de uso da técnica para mensuração da parasitemia.

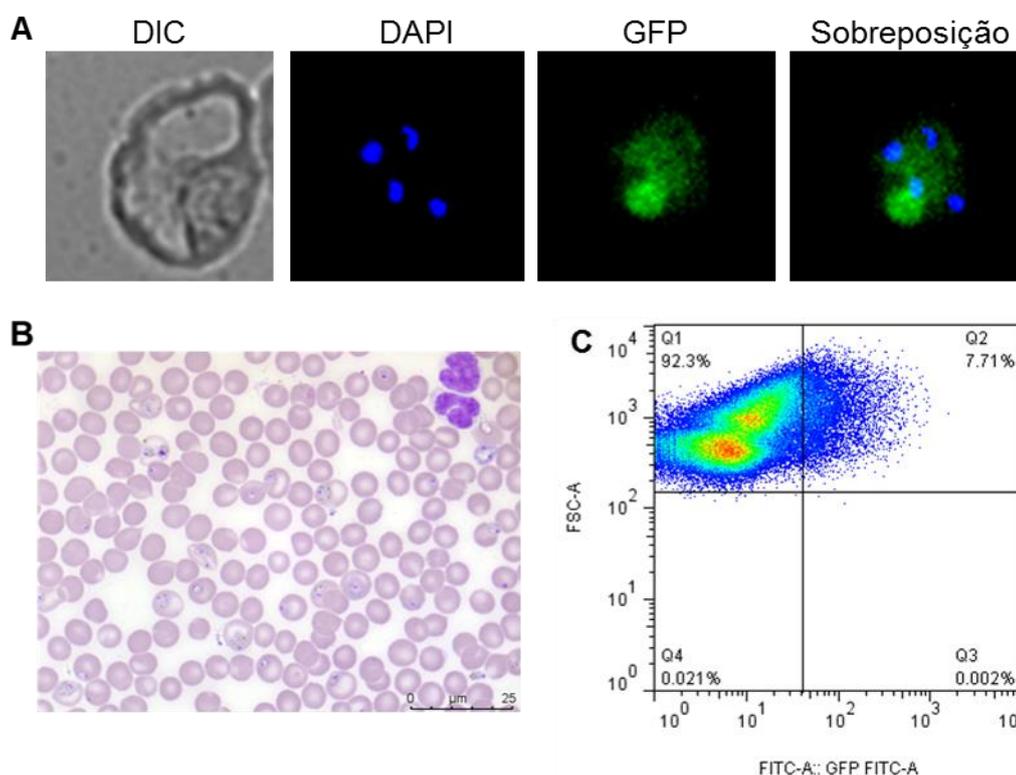


Figura 13. Padronização da avaliação da parasitemia por citometria do fluxo. (A) Micrografia do esfregaço sanguíneo obtida através de microscopia confocal. Núcleo corado com DAPI e expressão de GFP. **(B)** Micrografia de esfregaço sanguíneo de animal infectado com *P. berghei* GFP corado com Giemsa. **(C)** Dot-plot representativo de citometria de fluxo mostrando a porcentagem de parasitemia no animal infectado com *P. berghei* GFP (Canal: FITC-A).

5.6 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA

Uma vez determinada atividade antiparasitária *in vitro* dos compostos, foi dada continuidade com os estudos da avaliação *in vivo*. Para avaliar se os compostos tinham a capacidade de supressão da parasitemia em cepa NK65 do *P. berghei*, foi utilizado o protocolo de Peters de quatro dias de tratamento (Figura 14) (COLLINS et al., 1988). O composto RuPAQ foi testado em 3 doses (15, 30 e 60 $\mu\text{mol/kg}$). A escolha das doses foi baseada na faixa de doses de uso clínico da AQ já descritas na literatura (OLLIARO et al., 2003). O composto foi capaz de suprimir a parasitemia em

comparação com o grupo não tratado (Figura 15A). A supressão observada na parasitemia foi refletida nas taxas globais de sobrevivência dos camundongos tratados, onde o tratamento com o composto reduziu a mortalidade (Figura 15B).

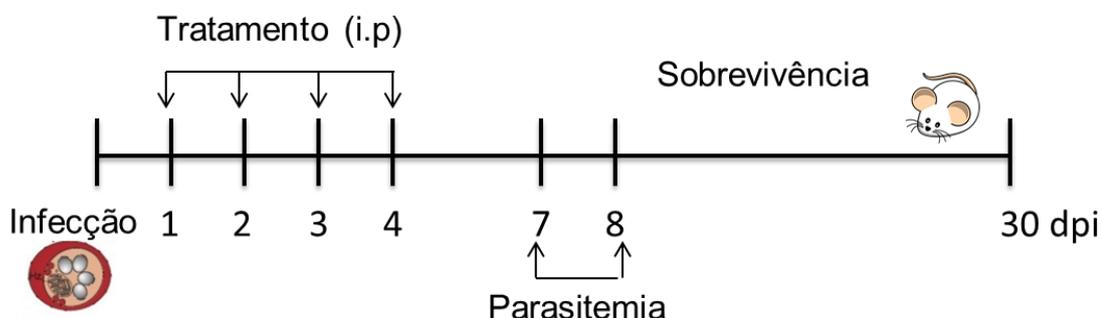


Figura 14. Desenho experimental do teste de Peters. DPI = Dias após infecção.

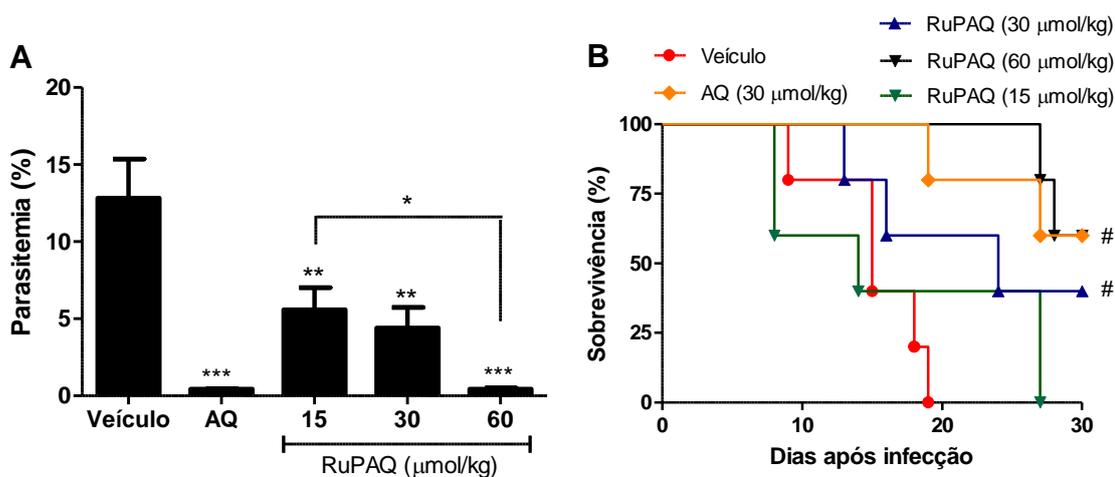


Figura 15. Atividade supressora da parasitemia do complexo de rutênio/amodiaquina RuPAQ e AQ. (A) Parasitemia para RuPAQ e (B) taxas de sobrevivência dos animais. Camundongos Swiss Webster ($n=5$) foram infectados com a cepa *P. berghei* NK65 e tratados por 4 dias consecutivos. One-Way ANOVA. *** $p<0.001$, * $p<0.05$; ** $p<0.01$, # $p<0.05$ (Log-rank, Mantel-Cox Test) em comparação com o grupo veículo. Valores referentes à média \pm E.P.M. dos dias 7 e 8 pós-infecção. Dois experimentos realizados, resultados são representativos de um experimento.

Na Tabela 4 apresenta um resumo da atividade *in vivo* do composto RuPAQ, o qual foi capaz de reduzir, em sua maior dose, a parasitemia dos animais de maneira similar à AQ, assim como aumentar a mediana de sobrevivência dos animais quando comparado com o grupo veículo.

Tabela 4. Resumo de atividade *in vivo* do complexo RuPAQ e AQ em modelo murino de infecção.

Composto	Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	% de inibição de parasitemia \pm DP	Mediana de sobrevivência (dias)	Nº animais vivos após 30 dias	% de sobrevivência
Veículo	-	-	13,2	0/5	0
RuPAQ	15	52,9 \pm 2,38	16,8	0/5	0
RuPAQ	30	88,5 \pm 0,45	19,8	2/5	40
RuPAQ	60	95,3 \pm 0,27	29	3/5	60
AQ	30	96,6 \pm 0,03	28,4	5/10 ^a	50 ^a

^a Valores referente a dois experimentos independentes.

O mesmo experimento foi realizado com o composto AuPAQ nas doses de 30, 15,5 e 7,7 $\mu\text{mol/kg}$. O composto também suprimiu a parasitemia em comparação com o grupo não-tratado, tendo atividade de supressão similar ao da amodiaquina (Figura 16A). A supressão observada na parasitemia refletiu nas taxas globais de sobrevivência de camundongos tratados (Figura 16B), onde o tratamento com o composto nas suas maiores doses reduziu a mortalidade em 70%, com uma mediana de sobrevivência de mais de 30 dias, enquanto os animais que receberam tratamento com a amodiaquina resultaram em uma taxa de sobrevivência de 50%, com uma mediana de sobrevivência de 26,8 dias (Tabela 5).

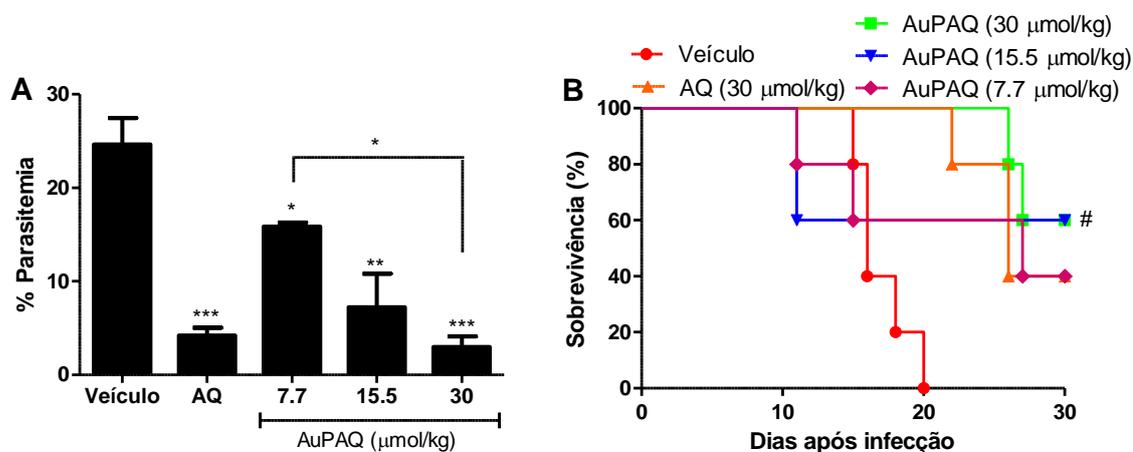


Figura 16. Atividade supressora da parasitemia do complexo ouro/amodiaquina AuPAQ. **(A)** Parasitemia para AuPAQ (30, 15,5 e 7,7 $\mu\text{mol/kg}$) e AQ (30 $\mu\text{mol/kg}$) e **(B)** taxas de sobrevivência dos animais. Camundongos Swiss Webster ($n=5$) foram infectados com a cepa NK65 do *P. berghei* e

tratados por 4 dias consecutivos. Valores representam a média±E.P.M. dos dias 7 e 8 pós-infecção de um experimento. ***p<0.001 em comparação com o grupo veículo.

Tabela 5. Sumário das atividade *in vivo* do complexo AuPAQ e amodiaquina em modelo murino de infecção.

Composto	Dose (µmol /kg)	% de inibição de parasitemia	Mediana de sobrevivência (dias)	Nº de animais vivos após 30 dias	% de sobrevivência
Veículo	-	-	13,2	0/5	0
AuPAQ	30	84,1 ± 2,73	>30	7/10 ^a	70 ^a
AuPAQ	15,5	70,6 ± 6,18	>30	3/5	60
AuPAQ	7,7	35,7 ± 0,60	27	2/5	40
AQ	30	87,1 ± 1,59	26,8	5/10 ^a	50 ^a

^a Valores referente a dois experimentos independentes.

5.7 COMPLEXO DE OURO COM AMODIAQUINA REDUZ A FORMAÇÃO DE CRISTAIS DE HEMOZOÍNA EM ANIMAIS INFECTADOS COM O *P. BERGHEI*

Visto a atuação multi-estágio dos compostos e a eficácia *in vivo*, foi dada continuidade no estudo a fim de investigar a atuação sobre a via da biossíntese de hemozoína. Como já citado anteriormente, a cristalização de heme tóxico representa uma das principais vias de escape ao antiparasitário e sobrevivência do parasito, sendo alvo farmacológico de inúmeros antimaláricos, inclusive a AQ. A quantificação de hemozoína (Hz) foi determinada tanto pelos níveis no sangue total quanto microscopicamente após o tratamento com uma dose única em camundongos da linhagem Swiss Webster infectados com *P. berghei* GFP. O tratamento foi feito com AQ e AuPAQ, visto que a atividade deste último frente a todos os estágios avaliados foi mais potente dentre os testados. Além da quantificação da Hz, nós quantificamos também outras espécies de heme, tais como o heme livre, a hemoglobina, assim como o curso da parasitemia antes e após a intervenção farmacológica, permitindo assim uma avaliação global da biossíntese da Hz. Os resultados podem ser observados na Figura 17.

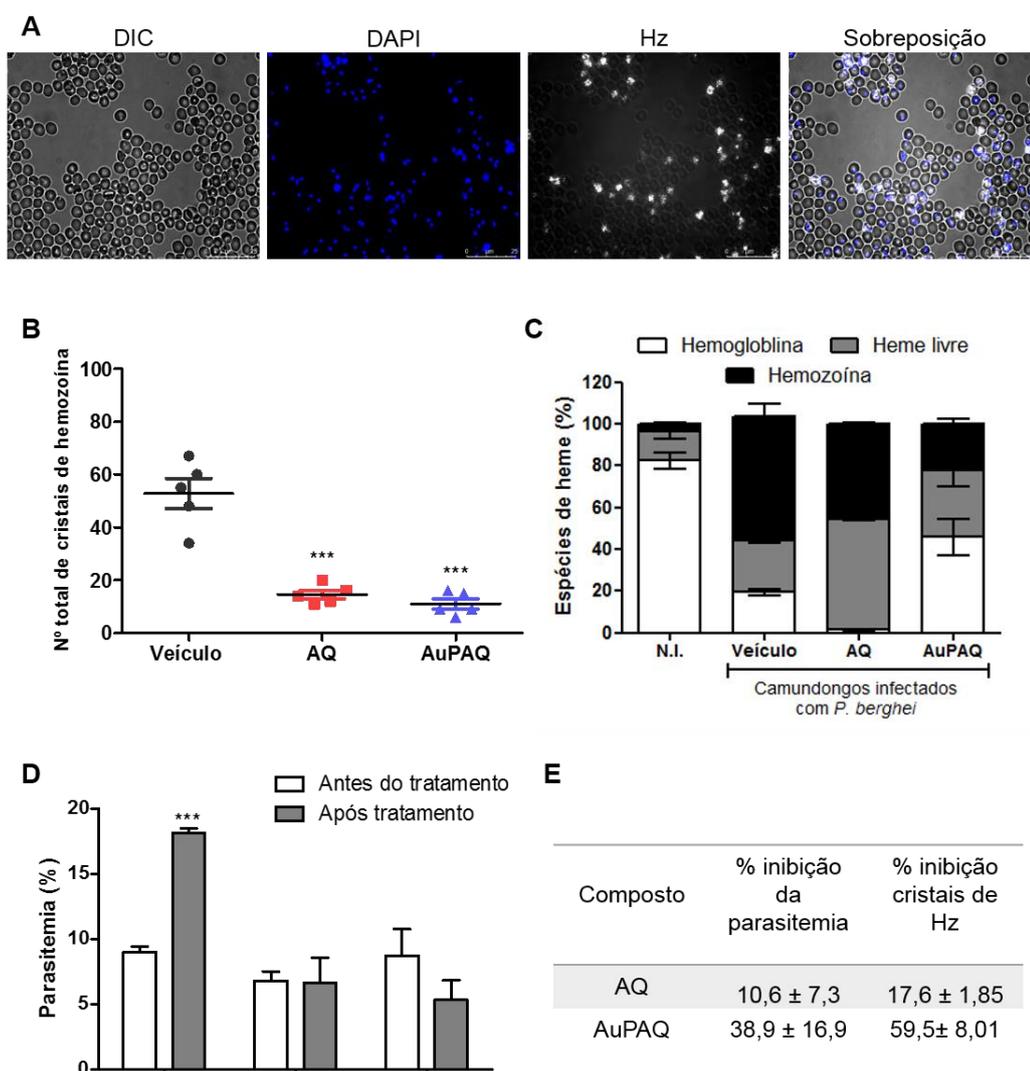


Figura 17. Efeito dos compostos AQ e AuPAQ na biossíntese da hemozoína em camundongos infectados com o *P. berghei*. (A) Micrografia obtida através de microscópio invertido de fluorescência e luz polarizada. Marcação nuclear com DAPI. (B) Quantificação bioquímica de espécies de heme obtida através de sangue de camundongos Swiss Webster ($n = 3$) infectados com *P. berghei* após 24 horas de tratamento com compostos (30 $\mu\text{mol/kg}$). (C) Quantificação de números totais de cristais de hemozoína contados a partir de micrografias de luz polarizada. (D) Parasitemia mensurada antes e após tratamento com os compostos através de citometria de fluxo (100.000 eventos. Canal FITC-A). (E) % de inibição da parasitemia e inibição da formação de cristais de Hz calculados a partir da quantificação bioquímica das espécies de heme com relação ao grupo veículo. N.I.= camundongo não-infectado. DIC = contraste diferencial de interferência; DAPI = 4',6-diamidino-2-fenilindol, corante de ácido nucléico.

Através da técnica de microscopia de luz polarizada foi possível visualizar os cristais de hemozoína dentro dos eritrócitos infectados com o plasmódio. A Figura 17A ilustra uma das micrografias obtidas para contagem dos cristais após tratamento com o complexo de ouro e AQ. A quantificação no número total de cristais pode ser visualizada na Figura 17B. Houve uma redução significativa do número de cristais

após o tratamento com ambos os compostos quando comparado com o grupo que não recebeu tratamento, evidenciando a ação da intervenção terapêutica com a AQ ou AuPAQ frente a polimerização de heme em Hz.

Em seguida, a ação do AuPAQ e AQ sobre as diferentes espécies formadas durante a biossíntese de Hz também foi avaliada no sangue total, usando uma combinação de técnicas de fracionamento das espécies por centrifugação e determinação de cada espécie por técnicas colorimétricas. O resultado pode ser visualizado na Figura 17C. Em comparação com o N.I, o grupo de animais infectados apresentou níveis de Hb reduzidos mostrando que a anemia, um dos principais sintomas da doença, já pode ser observada. Os níveis de Hb são nitidamente aumentados nos animais tratados com o AuPAQ, porque provavelmente o fármaco foi capaz de inibir o amadurecimento dos parasitos e, conseqüentemente, diminuiu a digestão da Hb. Isto pode ser correlacionado com a atenuação da parasitemia (Figura 17D) que, apesar de não ter sido significativa, reduziu no mínimo 3 x mais que a AQ, chegando a 38 % de redução (Figura 17E). O aumento de Hb não foi observado no tratamento com a AQ, e isso pode ocorrer provavelmente porque a dose administrada, apesar de ser igual a do AuPAQ, associado ao tempo de tratamento, não foi suficiente para suprimir a parasitemia, não inibindo assim a digestão da Hb.

Os níveis de heme foram então quantificados, uma vez que, se a biossíntese da Hz estiver sendo bloqueada, haverá aumento de heme livre, e isto confirma que o efeito do fármaco é direto. Em um primeiro momento é possível observar que os níveis de heme são maiores no animal infectado do que no não infectado, e isso é justificado pelo fato de ocorrer digestão de hemoglobina (Hb) apenas no animal infectado. Os níveis de heme são reduzidos nos animais tratados com AuPAQ, e isso pode ser correlacionado com o aumento da presença de Hb após o tratamento, confirmando que há redução da digestão de Hb, levando a uma redução de heme livre no sangue total.

Por fim, a quantificação de Hz mostra a comparação da eficácia dos diferentes fármacos em inibir a formação desse cristal. Dentre as quantificações, essa é a mais precisa. Houve uma redução na formação dos cristais nos animais tratados com o AuPAQ (Figura 17C), refletindo em taxas de inibição de cerca 55% (Figura 17E),

inibição três vezes maior do que a observada no grupo tratado com a AQ, fármaco que tem ação comprovada na inibição da polimerização de heme tóxico.

6 DISCUSSÃO

Devido à prevalência de cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina e a outros antimaláricos, a busca por novos fármacos antiparasitários tem sido de alta prioridade para o controle da malária. Nas últimas duas décadas, vários agentes antimaláricos foram desenvolvidos, em especial os fármacos à base de 4-aminoquinolinas, e testados contra parasitos resistentes à cloroquina. Pesquisadores têm procurado maneiras de desenvolver abordagens mais inovadoras a fim de desenvolver drogas mais eficazes para intervir na transmissão e no progresso desta doença e, uma das novas abordagens promissoras, envolve o uso de complexos de íons de metais de transição para produzir novas drogas antimaláricas, levando a numerosos estudos sobre complexos fármaco-metal (HUBIN et al., 2014; MACEDO et al., 2016; MARCELINO et al., 2018). Neste trabalho, foi demonstrado detalhadamente o potencial antimalárico frente a múltiplos estágios da malária para a AQ e seus derivados associados, os inéditos complexos metálicos de ouro e rutênio. A AQ tem importância valiosa na terapêutica da malária, sendo utilizada como fármaco de primeira escolha em diversas regiões endêmicas para a doença, na maioria das vezes associada a outros antimaláricos (OLLIARO et al., 2002).

A atividade antiparasitária dos complexos de rutênio (RuAQ, RuPAQ e RubipyAQ) e ouro (AuPAQ) foi avaliada frente às formas assexuadas do *P. falciparum* da cepa W2 (CQ-resistente). Todos os compostos em teste foram eficazes em inibir a proliferação do parasito em eritrócitos humanos, com valores de CI_{50} que variaram de 3,2 a 8,3 nM. Ao se comparar as duas classes de complexos metálicos (ouro *versus* rutênio) observou-se uma tendência de aumento de magnitude da potência antiparasitária no complexo de ouro. A ação antiplasmodial de complexos metálicos, tanto de ouro quanto de rutênio, já tem sido estudada e, muitas vezes, citada na literatura (EKENGARD et al., 2015; KHANYE et al., 2010; NAVARRO et al., 2014; SÁNCHEZ-DELGADO et al., 1996), entretanto, pouco se sabia sobre o seu potencial frente aos múltiplos estágios da malária. Recentemente, Stringer e colaboradores (2019) demonstraram a atividade de complexos quinolínicos de rutênio derivados de PTA (1,3,5-triaza-7-fosfato adamantano) frente cepas do *P. falciparum* K1 e NF-54, resistentes e sensíveis à cloroquina, respectivamente. No estudo foi evidenciada atividade antiparasitária potente e seletiva dos complexos frente à cepa NF-54

(valores de CI_{50} inferiores a $1\mu M$), porém, perda de atividade frente cepa K1, com valores inferiores ao controle utilizado (cloroquina). Assim, a atividade potente dos complexos frente à cepa W2, demonstrada no nosso estudo, provavelmente acontece por agir a partir de mecanismos distintos àqueles que desencadeiam a resistência, já que os complexos foram, no mínimo, 30 vezes mais ativos que a cloroquina.

Podemos frizar que as substâncias testadas neste trabalho apresentaram valores baixos de toxicidade *in vitro* sobre células de linhagem HepG2 e J774, quando comparados a atividade sobre cultura de *P. falciparum*. Os complexos apresentaram alta seletividade para os parasitos, que, segundo diretrizes da OMS, para malária *falciparum*, um índice de seletividade adequado é superior a 100 (NWAKA et al., 2009). O AuPAQ demonstrou ser o mais seletivo dentre os compostos, sendo 1371 vezes mais seletivo para parasitos da cepa W2 do *P. falciparum* do que para macrófagos murinos (J774). A farmacologia de complexos de ouro e derivados já é bastante discutida na literatura, principalmente na quimioterapia do câncer, porém é possível encontrar abordagens em outras áreas, como no tratamento de artrite reumatóide e fármacos antimicrobianos. (BERNERS-PRICE et al., 2011; NARDON et al., 201; PRICKER et al., 1996; SSEMAGANDA et al., 2018).

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 de 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 mostraram que as substâncias utilizadas neste trabalho não apresentaram efeito hemolítico nas concentrações testadas *in vitro*, com exceção do AuPAQ que, na maior concentração testada ($50\mu M$), induziu lise de cerca de 12% dos eritrócitos.

Visto a potente e seletiva atividade antiparasitária dos compostos e seus índices de seletividade se mostrarem viáveis para continuidade dos estudos, foi avaliada a capacidade em inibir a formação de β -hematina, um análogo dos cristais de hemozoína formado pelo parasito como mecanismo de defesa (EGAN et al., 2001).

Dentre os resultados obtidos, observamos correlação entre a atividade antiparasitária frente ao *P. falciparum* e a capacidade de inibição da β -hematina. Em virtude disso, sugerimos que a atividade antiparasitária dos compostos se deve à sua capacidade de inibir a formação do pigmento malárico (hemozoína). Tendo sido o mais ativo nessa inibição, é possível que a atividade antiparasitária potente do RuPAQ seja devida à sua maior eficiência em inibir a formação da hemozoína, apesar de que outros mecanismos podem estar envolvidos.

A busca por fármacos que sejam ativos em diferentes estágios do ciclo do parasito é recorrente e, pela primeira vez, foi descrita nesse estudo a ação da AQ frente estágio hepático da doença, assim como dos seus derivados. Atualmente, o único fármaco com ação frente à fase hepática e eliminação de hipnozoítos do *P. vivax* é a primaquina (PQ). De fato, na literatura não há registro de ação da AQ sobre formas do estágio hepático da malária sendo este estudo a primeira demonstração de que a AQ e seus derivados possuem ação na prevenção e controle da malária hepática. O mecanismo de ação completo ainda não é conhecido, necessitando estudos mais aprofundados para definir e validar o mecanismo do antimalárico nesse estágio, podendo estar envolvido com um acúmulo na mitocôndria ou outro compartimento no parasito, já que a AQ pode interagir com a GSH, alterando a homeostasia (GINSBURG et al., 1998; GOLDBERG et al., 2017; WHO, 2015). A ação dos complexos no estágio hepático confirma de que provavelmente eles agem através de diferentes mecanismos, já que demonstraram ação frente estágio sanguíneo, provavelmente associado à inibição do pigmento malárico, o qual não é formado durante o desenvolvimento dos parasitos da fase hepática (EMRAN et al., 2018; MO et al., 2018; WAMPFLER et al., 2017). Os resultados obtidos pela primeira vez nesse estudo revelam dados extremamente importantes, denotando o potencial da ação da AQ frente relapsos característicos da doença.

Foi também evidenciada uma ação dos complexos de ouro e rutênio frente às formas sexuadas do parasito, ainda que de forma menos potente do que a ação frente estágio sanguíneo e hepático, porém mais potente do que a ação observada da AQ. Sabe-se que outros fármacos antimaláricos, tais como a PQ, CQ, MQ e os antibióticos, não possuem ação frente aos gametócitos (DELVES et al., 2012). Outrossim, é importante frisar que a ação antiparasitária frente aos gametócitos é de difícil intervenção terapêutica, pois são formas evolutivas não-proliferativas e de

metabolismo reduzido. A ação de complexos de rutênio associados à CQ, antimalárico sem efeito conhecido nos gametócitos, frente às formas sexuadas do parasito já foram demonstradas por Macedo e colaboradores (2016), no qual foi evidenciado que a presença dos ligantes metálicos potencializa essa ação. O mesmo foi observado no nosso trabalho, onde a AQ se mostrou menos ativa do que os conjugados de ouro e rutênio, evidenciando, mais uma vez, um perfil multi-estágio dos complexos.

A extrapolação dos resultados *in vitro* para os modelos *in vivo* é extremamente importante para validação efetiva do efeito antiparasitário de um fármaco. Aqui, foi utilizado um estudo detalhado de dose-resposta para a atividade antimalárica, que é o teste de supressão de quatro dias, originalmente projetado por Peters (PETERS et al., 1975). O modelo experimental *in vivo* da malária, usando o *P. berghei* é importante porque recapitula alguns parâmetros da doença humana, tais como a anemia grave, a hiperparasitemia e a mortalidade. Foi demonstrado que os complexos reduziram a parasitemia sanguínea e aumentaram a sobrevivência dos animais, mostrando que são eficazes *in vivo* contra o *P. berghei*, sendo o AuPAQ mais eficaz do que a AQ em promover a sobrevivência dos animais. O aumento de eficácia *in vivo* através da complexação de metais à antimaláricos já foi abordado na literatura, sendo a CQ a mais citada (NAVARRO et al., 1997; SÁNCHEZ-DELGADO et al., 2016). A ação de complexos de rutênio conjugados com a CQ no modelo de supressão de parasitemia também foi descrita por Macedo e colaboradores (2016), apesar de que a ação evidenciada no estudo não ter sido mais potente que a CQ. Com isso, é possível sugerir que a AQ e as modificações feitas em sua estrutura química são promissoras no desenvolvimento de novos fármacos.

Por fim, com todos os indícios da ação dos compostos no estágio sanguíneo, e sabendo que esse estágio é basicamente caracterizado pela digestão da Hb e posterior cristalização de heme livre, avaliamos pela primeira vez em um experimento *in vivo*, bioquimicamente e microscopicamente, a capacidade do composto AuPAQ em inibir a formação dos cristais de hemozoína. Os resultados obtidos foram extremamente promissores e consistentes já que fizemos uso de metodologias complementares, onde foi possível observar redução dos cristais em números totais e na quantificação bioquímica do sangue de animais infectados tratados com o AuPAQ. De fato, o complexo de ouro conjugado foi mais potente em inibir a formação

do cristal do que a AQ, evidenciando uma potencialização da ação do antimalárico (OLAFSON et al., 2017).

7 CONCLUSÃO

No presente trabalho foi possível observar que o desenvolvimento de complexos metálicos contendo quinolinas como ligantes pode resultar em agentes antiparasitários com amplo espectro de ação. No nosso estudo foi observado que a conjugação do rutênio e ouro à amodiaquina produziu complexos com propriedades antiparasitárias bem definidas e com perfil multi-estágio, atuando em diferentes etapas do ciclo do plasmódio, com ênfase na inédita eficácia sobre os esporozoítos. Pela primeira vez foi descrita a ação da AQ no estágio hepático da doença, podendo levar, futuramente, a uma reavaliação da utilidade farmacológica desse antimalárico na intervenção terapêutica da doença. Nos ensaios *in vivo* foi possível observar redução da parasitemia dos animais e consequente aumento de sobrevivência após tratamento com AuPAQ e RuPAQ, sendo o primeiro mais eficaz que a AQ nesses parâmetros, evidenciando aumento de atividade da AQ quando associado ao íon de ouro, que mostrou atuar através da inibição da formação dos cristais de hemozoína durante o estágio sanguíneo, experimentos esses que foram padronizados e efetuados pela primeira vez no nosso grupo de pesquisa. Os dados aqui apresentados são de relevância na compreensão da ação de fármacos em múltiplos estágios do ciclo de vida do plasmódio. Até o momento, foi demonstrada a ação em múltiplos estágios em modelos *in vitro*, portanto estudos mais aprofundados precisam ser realizados para determinação da eficácia *in vivo* nos demais estágios (esporozoítos e gametócitos), além de estudos visando compreender o mecanismo de ação dos complexos aqui testados.

REFERÊNCIAS

ABACASSAMO, F. *et al.* Efficacy of chloroquine, amodiaquine, sulphadoxine–pyrimethamine and combination therapy with artesunate in Mozambican children with non-complicated malaria. **Tropical Medicine & International Health**, v. 9, n. 2, p. 200-208, 2004.

ABUAKU, Benjamin K. *et al.* Efficacy of artesunate/amodiaquine in the treatment of uncomplicated malaria among children in Ghana. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 690-695, 2017.

ACHAN, J. *et al.* Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p. 144, 2011.

ARNOLD, J. *et al.* The antimalarial action of primaquine against the blood and tissue stages of falciparum malaria (Panama, PF-6 strain). **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 46, n. 3, p. 391-397, 1955.

BAHL, D. *et al.* Structure–activity relationships of mononuclear metal–thiosemicarbazone complexes endowed with potent antiplasmodial and antiamoebic activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 18, p. 6857-6864, 2010.

BALAKRISHNAN, I.; GILLESPIE, S. H. Vector-Borne Parasitic Diseases. **Principles and Practice of Travel Medicine**, p. 91-124, 2001.

BARRADELL, L. B.; FITTON, Andrew. Artesunate. **Drugs**, v. 50, n. 4, p. 714-741, 1995.

BASSAT, Quique. The use of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated Plasmodium vivax malaria. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 12, p. e1325, 2011.

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

BERNERS-PRICE, Susan J.; FILIPOVSKA, Aleksandra. Gold compounds as therapeutic agents for human diseases. **Metallomics**, v. 3, n. 9, p. 863-873, 2011.

BIGGS, B. A.; BROWN, G. V. Malaria. **Principles and Practise of Clinical Parasitology**, p. 53-98, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR) SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Manual de diagnóstico laboratorial da malária**. 2005.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. 2010.

BROWN, I. N. Immunological aspects of malaria infection. **Advances in Immunology**. Academic Press, 1969. p. 267-349.

BURGESS, R. W.; BRAY, R. S. The effect of a single dose of primaquine on the gametocytes, gametogony and sporogony of *Laverania falciparum*. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 24, n. 4-5, p. 451, 1961.

BUSULA, A. O. *et al.* Mechanisms of Plasmodium-Enhanced Attraction of Mosquito Vectors. **Trends in Parasitology**, 2017.

CABRAL, M. A. Fármacos antiprotozoários. In: **Anotações em Farmacologia e Farmácia Clínica**. 1. ed. Nova Friburgo, 2010. p.1–5,

CASINI, A. *et al.* Emerging protein targets for anticancer metallodrugs: inhibition of thioredoxin reductase and cathepsin B by antitumor ruthenium (II)– arene compounds. **Journal of medicinal chemistry**, v. 51, n. 21, p. 6773-6781, 2008.

CASTRO, I.; DEL CARMEN RODRÍGUEZ, M. Análisis proteómico de Plasmodium, el agente causal de la malaria. **Salud Pública de México**, v. 51, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION *et al.* The history of malaria, an ancient disease. Atlanta, GA: **CDC**, 2010.

CEVENINI, L. *et al.* Multicolor bioluminescence boosts malaria research: quantitative dual-color assay and singlecell imaging in *Plasmodium falciparum* parasites. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 8814–8821, 2014.

CHINAPPI, M. *et al.* On the mechanism of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. **PloS One**, v. 5, n. 11, p. e14064, 2010.

CHUGH, M. *et al.* Protein complex directs hemoglobin-to-hemozoin formation in *Plasmodium falciparum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 14, p. 5392-5397, 2013.

CLAVEL, C. M. *et al.* Modulating the Anticancer Activity of Ruthenium (II)–Arene Complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 3356-3365, 2015.

COLLINS, W. E.; WERNSDORFER, W.; MCGREGOR, I. **Major animal models in malaria research: simian. Malaria: principles and practice of malariology**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1988.

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

COTTER, C. *et al.* The changing epidemiology of malaria elimination: new strategies for new challenges. **The Lancet**, v. 382, n. 9895, p. 900-911, 2013.

CURRÀ, C. *et al.* Release of Plasmodium sporozoites requires proteins with histone-fold dimerization domains. **Nature Communications**, v. 7, p. 13846, 2016.

D'ALESSANDRO, U.; TER KUILE, F. O. Amodiaquine, malaria, pregnancy: the old new drug. **The Lancet**, v. 368, n. 9544, p. 1306-1307, 2006.

DA SILVA, H. B. *et al.* In vivo approaches reveal a key role for DCs in CD4+ T cell activation and parasite clearance during the acute phase of experimental blood-stage malaria. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 2, p. e1004598, 2015.

DA SILVA MAIA, P. I.; DEFLON, V. M.; ABRAM, U. Gold (III) complexes in medicinal chemistry. **Future Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 13, p. 1515-1536, 2014.

DELVES, M. *et al.* The activities of current antimalarial drugs on the life cycle stages of Plasmodium: a comparative study with human and rodent parasites. **PLoS Medicine**, v. 9, n. 2, p. e1001169, 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.

DOOLAN, D. L.; DOBAÑO, C.; BAIRD, J. K. Acquired immunity to malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 13-36, 2009.

EGAN, T. J.; MAVUSO, W. W.; NCOKAZI, K. K. The mechanism of β -hematin formation in acetate solution. Parallels between hemozoin formation and biomineralization processes. **Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 204-213, 2001.

EGAN, T. J. Recent advances in understanding the mechanism of hemozoin (malaria pigment) formation. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, n. 5-6, p. 1288-1299, 2008.

EGGER, A. E. *et al.* Quantitative bioimaging by LA-ICP-MS: a methodological study on the distribution of Pt and Ru in viscera originating from cisplatin- and KP1339-treated mice. **Metallomics**, v. 6, n. 9, p. 1616-1625, 2014.

EKENGARD, E. *et al.* Antimalarial activity of ruthenium (II) and osmium (II) arene complexes with mono- and bidentate chloroquine analogue ligands. **Dalton Transactions**, v. 44, n. 44, p. 19314-19329, 2015.

EMRAN, T. B. *et al.* Baculovirus-Induced Fast-Acting Innate Immunity Kills Liver-Stage Plasmodium. **The Journal of Immunology**, v. 201, n. 8, p. 2441-2451, 2018.

EZIEFULA, A. C. *et al.* Glucose-6-phosphate dehydrogenase status and risk of hemolysis in *Plasmodium falciparum*-infected African children receiving single-dose primaquine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4971-4973, 2014.

FAN, Yi-Lei *et al.* Antiplasmodial and antimalarial activities of quinolone derivatives: An overview. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2018.

FOLEY, M.; TILLEY, L. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 79, n. 1, p. 55-87, 1998.

FOURMY, K. *et al.* Gold (I) complexes bearing phosphole ligands: Synthesis and antimalarial activity. **Comptes Rendus Chimie**, v. 20, n. 4, p. 333-338, 2017.

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008.

FRIK, M. *et al.* In vitro and in vivo evaluation of water-soluble iminophosphorane ruthenium (II) compounds. A potential chemotherapeutic agent for triple negative breast cancer. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 23, p. 9995-10012, 2014.

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.

GLANS, L. *et al.* Ruthenium (II) arene complexes with chelating chloroquine analogue ligands: synthesis, characterization and in vitro antimalarial activity. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 9, p. 2764-2773, 2012.

GOLDBERG, D. E.; SIGALA, P. A. Plasmodium heme biosynthesis: To be or not to be essential? **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 9, p. e1006511, 2017.

GOMES, A. P. *et al.* Severe *Plasmodium falciparum* malaria. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 3, p. 358-369, 2011.

GRAVES, P. M.; GELBAND, H.; GARNER, P. Primaquine or other 8-aminoquinoline for reducing *P. falciparum* transmission. 2014.

HARBUT, Michael B. *et al.* Aurano-fin exerts broad-spectrum bactericidal activities by targeting thiol-redox homeostasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 14, p. 4453-4458, 2015.

HARRISON, A. C. *et al.* The mechanism of bioactivation and antigen formation of amodiaquine in the rat. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 7, p. 1421-1430, 1992.

HUBIN, T. J. *et al.* Synthesis and antimalarial activity of metal complexes of cross-bridged tetraazamacrocyclic ligands. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 13, p. 3239-3244, 2014.

INAM, A. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of 3-[4-(7-chloro-quinolin-4-yl)-piperazin-1-yl]-propionic acid hydrazones as antiprotozoal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 75, p. 67-76, 2014.

JANI, D. *et al.* HDP—a novel heme detoxification protein from the malaria parasite. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 4, p. e1000053, 2008.

JUNEJA, A. *et al.* Synthesis of 4'-(2-ferrocenyl)-2, 2': 6' 2"-terpyridine: characterization and antiprotozoal activity of Mn (II), Co (II), Ni (II), Cu (II) and Zn (II) complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 75, p. 203-210, 2014.

KHANYE, S. D. *et al.* Synthesis and in vitro evaluation of gold (I) thiosemicarbazone complexes for antimalarial activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 104, n. 10, p. 1079-1083, 2010.

KLEIN, E. Y. Antimalarial drug resistance: a review of the biology and strategies to delay emergence and spread. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, n. 4, p. 311-317, 2013.

KOMARNICKA, U. K. *et al.* Copper (I) complexes with phosphine derived from sparfloxacin. Part I—structures, spectroscopic properties and cytotoxicity. **Dalton Transactions**, v. 44, n. 28, p. 12688-12699, 2015.

KUMAR, S. *et al.* Drug targets for resistant malaria: Historic to future perspectives. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 104, p. 8-27, 2018.

LEVINA, A.; MITRA, A.; LAY, P. A. Recent developments in ruthenium anticancer drugs. **Metallomics**, v. 1, n. 6, p. 458-470, 2009.

LIN, J. T.; JULIANO, J. J.; WONGSRICHANALAI, C. Drug-resistant malaria: the era of ACT. **Current Infectious Disease Reports**, v. 12, n. 3, p. 165-173, 2010.

LIN, Jing-wen *et al.* Replication of Plasmodium in reticulocytes can occur without hemozoin formation, resulting in chloroquine resistance. **Journal of Experimental Medicine**, v. 212, n. 6, p. 893-903, 2015.

MACEDO, T. S. *et al.* Chloroquine-containing organoruthenium complexes are fast-acting multistage antimalarial agents. **Parasitology**, v. 143, n. 12, p. 1543-1556, 2016.

MAIER, A. G. *et al.* Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 341, 2009.

MAITLAND, K.; MARSH, K. Pathophysiology of severe malaria in children. **Acta Tropica**, v. 90, n. 2, p. 131-140, 2004.

MALINA, J. *et al.* Biophysical analysis of natural, double-helical DNA modified by anticancer heterocyclic complexes of ruthenium (III) in cell-free media. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 435-445, 2001.

MARCELINO, P. R. F. *et al.* Metal-Based Drugs for Treatment of Malaria. In: **Biomedical Applications of Metals**. Springer, Cham, 2018. p. 167-193.

MARKOWSKA, A. *et al.* Noble metals in oncology. **Contemporary Oncology**, v. 19, n. 4, p. 271, 2015.

MARKUS, M. B. Malaria: origin of the term “hypnozoite”. **Journal of the History of Biology**, v. 44, n. 4, p. 781-786, 2011.

MARTÍNEZ, A. *et al.* The antimalarial activity of Ru–chloroquine complexes against resistant *Plasmodium falciparum* is related to lipophilicity, basicity, and heme aggregation inhibition ability near water/n-octanol interfaces. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 14, n. 6, p. 863-871, 2009.

MEIBALAN, E.; MARTI, M. Biology of malaria transmission. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, v. 7, n. 3, p. a025452, 2017.

MINKAH, N. K.; SCHAFER, C.; KAPPE, S. HI. Humanized mouse models for the study of human malaria parasite biology, pathogenesis and immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 807, 2018.

MIOTO, L. D.; GALHARDI, L. C. F.; AMARANTE, M. K. Aspectos parasitológicos e imunológicos da malária. **Biosaúde**, v. 14, n. 1, p. 42-55, 2016.

MO, A. X.; MCGUGAN, G. Understanding the Liver-Stage Biology of Malaria Parasites: Insights to Enable and Accelerate the Development of a Highly Efficacious Vaccine. **The American Journal of Tropical Medicine and hygiene**, v. 99, n. 4, p. 827-832, 2018.

MOLL, K. *et al.* **Methods IN Malaria Research**. 2008.

MOREIRA, D. R. M. *et al.* Evaluation of naphthoquinones identified the acetylated isolapachol as a potent and selective antiplasmodium agent. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 30, n. 4, p. 615-621, 2015.

NARDON, C.; BOSCUCCI, G.; FREGONA, D. Beyond platinum: gold complexes as anticancer agents. **Anticancer Research**, v. 34, n. 1, p. 487-492, 2014

NAVARRO, M.; PÉREZ, H.; SÁNCHEZ-DELGADO, R. A. Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 3. Synthesis and antimalarial activity in vitro and in vivo of the new gold– chloroquine complex [Au (PPh₃)(CQ)] PF₆. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 12, p. 1937-1939, 1997.

NAVARRO, M. *et al.* Metal-chloroquine derivatives as possible anti-malarial drugs: evaluation of anti-malarial activity and mode of action. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 471, 2014.

NKUMAMA, I. N.; O'MEARA, W. P.; OSIER, F. H. A. Changes in malaria epidemiology in Africa and new challenges for elimination. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 2, p. 128-140, 2017.

NLINWE, O. Nfor *et al.* T-cell responses against Malaria: Effect of parasite antigen diversity and relevance for vaccine development. **Vaccine**, 2018.

NOGUEIRA, F.; ROSÁRIO, V. E. Methods for assessment of antimalarial activity in the different phases of the Plasmodium life cycle. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 3, p. 109-124, 2010.

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.

OLAFSON, K. N. *et al.* Antimalarials inhibit hematin crystallization by unique drug–surface site interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 29, p. 7531-7536, 2017.

OLLIARO, P.; TAYLOR, W. **Amodiaquine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria**. Geneva: World Health Organization, 2002.

OLLIARO, P. L.; MUSSANO, P. Amodiaquine for treating malaria. **The Cochrane Library**, 2003.

PARAPINI, S. *et al.* Standardization of the physicochemical parameters to assess in vitro the β -hematin inhibitory activity of antimalarial drugs. **Experimental Parasitology**, v. 96, n. 4, p. 249-256, 2000.

PETERS, W.; PORTUS, J. H.; ROBINSON, B. L. The chemotherapy of rodent malaria, XXII: The value of drug-resistant strains of *P. berghei* in screening for blood schizontocidal activity. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 69, n. 2, p. 155-171, 1975.

PIMENTA, P. F.P. *et al.* An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon Anopheles vectors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 23-47, 2015.

PISCIOTTA, J. M. *et al.* Quantitative characterization of hemozoin in *Plasmodium berghei* and *vivax*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 7, n. 1, p. 110-119, 2017.

PRICKER, S. P. Medical uses of gold compounds: past, present and future. **Gold Bulletin**, v. 29, n. 2, p. 53-60, 1996.

QUEIROZ, N. L. **Avaliação da resposta inflamatória cerebral em camundongos BALB/ce C57Bl/6 infectados por Plasmodium berghei cepa NK65**. 2007. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

ROSENTHAL, P. J. Overview of Parasitic Infections. **Comprehensive Medicinal Chemistry II**, v. 7, p. 749-763, 2007.

SÁNCHEZ-DELGADO, R. A. *et al.* Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 2. Synthesis and antimalarial activity in vitro and in vivo of new ruthenium- and rhodium- chloroquine complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 5, p. 1095-1099, 1996.

SCHLAGENHAUF, P. Mefloquine for malaria chemoprophylaxis 1992–1998: a review. **Journal of Travel Medicine**, v. 6, n. 2, p. 122-133, 1999.

SIRIMA, S. B.; GANSANÉ, A. Artesunate–amodiaquine for the treatment of uncomplicated malaria. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 16, n. 7, p. 1079-1085, 2007.

SLATER, A. F. G. Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 57, n. 2-3, p. 203-235, 1993.

SMITH, M. L.; STYCZYNSKI, M. P. Systems Biology-Based Investigation of Host–Plasmodium Interactions. **Trends in Parasitology**, 2018.

SSEMAGANDA, A. *et al.* Gold (i) phosphine compounds as parasite attenuating agents for malaria vaccine and drug development. **Metallomics**, v. 10, n. 3, p. 444-454, 2018.

STRINGER, T. *et al.* Evaluation of PTA-derived ruthenium (II) and iridium (III) quinoline complexes against chloroquine-sensitive and resistant strains of the *Plasmodium falciparum* malaria parasite. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 191, p. 164-173, 2019.

SUPAN, C. *et al.* Pharmacokinetics of ferroquine, a novel 4-aminoquinoline, in asymptomatic carriers of *Plasmodium falciparum* infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3165-3173, 2012.

TANGPUKDEE, N. *et al.* Malaria diagnosis: a brief review. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 47, n. 2, p. 93, 2009.

TAPANELLI, S. *et al.* Novel metalloantimalarials: Transmission blocking effects of water soluble Cu (I), Ag (I) and Au (I) phosphane complexes on the murine malaria parasite *Plasmodium berghei*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 166, p. 1-4, 2017.

TARANTO, A. G. *et al.* Estudos sobre o mecanismo de ação da artemisinina e dos endoperóxidos, a mais nova classe de agentes antimaláricos–Parte I. **Sitientibus**, v. 34, p. 47-58, 2006.

TEKWANI, B. L.; WALKER, L. A. Targeting the hemozoin synthesis pathway for new antimalarial drug discovery: technologies for in vitro β -hematin formation assay. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 8, n. 1, p. 63-79, 2005.

TINGLE, M. D. *et al.* The bioactivation of amodiaquine by human polymorphonuclear leucocytes in vitro: chemical mechanisms and the effects of fluorine substitution. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, n. 7, p. 1113-1119, 1995.

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

VAN HUIJSDUIJNEN, R. H.; WELLS, T. N. C. The antimalarial pipeline. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 42, p. 1-6, 2018.

WAMPFLER, R. *et al.* Effects of liver-stage clearance by primaquine on gametocyte carriage of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005753, 2017.

WANI, W. A. *et al.* Ferroquine and its derivatives: new generation of antimalarial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 534-551, 2015.

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.

WELLS, S.; DIAP, G.; KIECHEL, J.-R. The story of artesunate-mefloquine (ASMQ), innovative partnerships in drug development: case study. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 68, 2013.

WHITE, N. J. Antimalarial pharmacokinetics and treatment regimens. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 34, n. 1, p. 1-10, 1992.

WHITE, N. J. Qinghaosu (artemisinin): the price of success. **Science**, v. 320, n. 5874, p. 330-334, 2008.

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

WHO. World malaria report 2017. Geneva: **World Health Organization**, 2017.

WINSTANLEY, P. A. E. G. *et al.* The disposition of amodiaquine in man after oral administration. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 23, n. 1, p. 1-7, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the treatment of malaria. **World Health Organization**, 2015.

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

ZENG, L. *et al.* Ruthenium (II) complexes with 2-phenylimidazo [4, 5-f][1, 10] phenanthroline derivatives that strongly combat cisplatin-resistant tumor cells. **Scientific Reports**, v. 6, p. 19449, 2016.

ANEXOS

Artigo a ser submetido ao Dalton Transaction (ISSN 1477-9226)

Structural determinants and the underlying mechanism of action for carbonyl-coordinated ruthenium (II) complexes

Mariana Cruz B. Silva,^a Marília I. F. Barbosa,^{b‡} Celisnolia M. Leite,^c Cassio S. Meira,^a Antônio C. Doriguetto^b, Maria Fernanda R. Grassi,^a Milena B. P. Soares,^a Alzir A. Batista^{c*} and Diogo R. M. Moreira^{a,*}

^aFundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, CEP 40296-710, Salvador, BA, Brazil

^bInstituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, CEP 37130-000, Alfenas, MG, Brazil

^cDepartamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brazil

*Corresponding authors: FIOCRUZ, Instituto Gonçalo Moniz, CEP 40296-710, Salvador, BA, Brazil. (+55)71-31762292; email: diogo.moreira@bahia.fiocruz.br

‡Footnote: Mariana C. B. Silva and Marília I. F. Barbosa share first authorship.

ABSTRACT

We have shown that carbonyl-coordinated Ru (II) complexes potently inhibit cancer and parasite proliferation. Here, we sought to reveal the structural determinants and the mechanism of potency enhancement underlying carbonyl conjugation. We found that carbonyl-coordinated Ru-complexes are substantially more potent antiproliferative agents against human adult T-cell leukemia lines than other monodentate coordinated ligands, such as azido and isothiocyanate. Unlike redox-active CO-releasing molecules, carbonyl-coordinated Ru-complexes did not have antiproliferative activity abrogated under the presence of CO-scavenger hemoglobin, showing that CO release into cell milieu is not responsible for activity. In fact, the complexes are quite inert in solution and are not reduced by glutathione but they can reduce NAD. Using [RuClCO(phen)(dppb)] as a study model, where dppb is 1,4-bis(diphenylphosphino)butane and phen is 1,10-phenanthroline, we observed that its onset activity is a rapid but sustainable imbalance of cellular homeostasis by multivalent mechanisms, which includes elevation of cellular reactive oxygen species (ROS), which is concentration-dependent, transient (reversible by antioxidants) and mostly composed by superoxide anion radical. This monocarbonyl complex caused depletion of cellular glutathione and induced oxidized protein levels to increase, concomitantly causing a breakdown of the mitochondrial electron flux and caspase-3 activation, leading to a programmed apoptotic cell death. We further determined that the multivalent effects on cellular homeostasis induced by complexes are achieved due to the ruthenium-carbonyl

reactivity which is governed by phosphine ligand, while the effect towards cell death is greatly influenced by diimine ligands. We concluded that a strong antiproliferative activity against adult T-cell leukemia is achieved when carbonyl is coordinated to ruthenium, featuring multivalent effects on cellular homeostasis and subsequent cell death, a feature not recapitulated by other mono-coordinating ligands.

KEYWORDS: ruthenium carbonyl, phosphine, adult T-cell leukemia, superoxide, glutathione.

Artigo publicado no Angewandte Chemie International Edition (ISSN 1433-7851)

Hybridization of Artemisinin with C–H Activation-Derived Isoquinolines and Versatile Quinolines Combats Multidrug-Resistant Malaria

Authors

Aysun Çapcı,¹ Mélanie M. Lorion,² Hui Wang,² Nina Simon,³ Maria Leidenberger,³ Mariana C. Borges Silva,⁴ Diogo R. M. Moreira,⁴ Zhu Yongping,⁵ Meng Yuqing,⁵ Chen Jia Yun,⁵ Yew Mun Lee,⁶ Oliver Friedrich,³ Barbara Kappes,³ Jigang Wang,^{5,6*} Lutz Ackermann,^{2,7*} and Svetlana B. Tsogoeva^{1*}

Affiliations

¹Organic Chemistry Chair I and Interdisciplinary Center for Molecular Materials (ICMM), Friedrich-Alexander University of Erlangen-Nürnberg Nikolaus Fiebiger-Straße 10, 91054 Erlangen, Germany.

²Institut für Organische und Biomolekulare Chemie Georg-August-Universität Göttingen Tammannstraße 2, 37077 Göttingen, Germany.

³Institute of Medical Biotechnology, Friedrich-Alexander University of Erlangen-Nürnberg, Paul-Gordon-Straße 3, 91052 Erlangen, Germany.

⁴Fiocruz, Instituto Gonçalo Moniz, 40296-710 Salvador, BA, Brazil.

⁵Artemisinin Research Center, and Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700, China.

⁶Department of Pharmacology, National University of Singapore, 117600, Singapore.

⁷German Center for Cardiovascular Research (DZHK), Germany.

Abstract

A substantial challenge in medicinal chemistry is emergent drug resistance in malaria parasites against approved drugs chloroquine and artemisinin (ART). Although some advances have been made with regard to hybridization of ART into a new bioactive effector, rare examples of ART-hybrids addressing resistance issues are reported. Moreover, protein targets of ART- hybrids have not been identified yet and cause of hybrids' superior efficacy is still not known. Herein, we report the synthesis of novel ART-isoquinoline and ART-quinoline hybrids showing highly improved activities with respect to parent compounds against multidrug-resistant malaria strains and strongly suppressing parasitemia in experimental malaria in mice. These new compounds are easily accessible via step-economical C–H activation and CuCAA click reactions. Through chemical proteomics, putatively hybrid-binding protein targets of ART-quinolines were successfully identified including known artemisinin targets and established quinoline targets, important for development of *Plasmodium falciparum* blood stages. Our results suggest that hybrids are less susceptible to drug resistance, because their subunits target different proteins and act through different mechanisms.

