

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**ANTIMALÁRICOS A PARTIR DE MOLÉCULAS OBTIDAS POR SÍNTESE
COMO ANÁLOGOS DE CLOROQUINA E COMPOSTOS
NAFTOQUINOIDAIIS**

por

Nicolli Bellotti de Souza

Belo Horizonte

Fevereiro/2015

TESE DDIP-CPqRR N. B. SOUZA 2015

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**ANTIMALÁRICOS A PARTIR DE MOLÉCULAS OBTIDAS POR SÍNTESE
COMO ANÁLOGOS DE CLOROQUINA E COMPOSTOS
NAFTOQUINOIDAIIS**

por

Nicolli Bellotti de Souza

Tese apresentada com vistas à obtenção do título de Doutor em Ciências na área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientação:

Profa. Dra. Antoniana Ursine Krettl

Belo Horizonte

Fevereiro/2015

Catálogo-na-fonte

Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ

Biblioteca do CPqRR

Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

S819a Souza, Nicolli Bellotti de.

2015

Antimaláricos a partir de moléculas obtidas por síntese como análogos de cloroquina e compostos naftoquinoidais / Nicolli Bellotti de Souza. – Belo Horizonte, 2015.

xiv, 98 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 80 - 106

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

1. Malária Falciparum/quimioterapia 2. *Plasmodium falciparum*/parasitologia 3. Antimaláricos/uso terapêutico 4. Cloroquina/uso terapêutico I. Título. II. Krettli, Antoniana Ursine (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 2

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**ANTIMALÁRICOS A PARTIR DE MOLÉCULAS OBTIDAS POR SÍNTESE COMO
ANÁLOGOS DE CLOROQUINA E COMPOSTOS NAFTOQUINOIDAIIS**

por

Nicolli Bellotti de Souza

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Antoniana Ursine Krettli (Presidente)

Profa. Dra. Eliana M. M. da Rocha

Profa. Dra. Luzia H. de Carvalho

Prof. Dr. Alexandre de M. V. Machado

Profa. Dra. Milena Botelho P. Soares

Suplente: Profa. Dra. Laila Alves Nahum

Tese defendida e aprovada em 24/02/2015.

AGRADECIMENTOS

Às companhias iluminadas.

À Profa. Dra. Antoniana, pelos ensinamentos científicos e para a vida. Por ser uma incansável mestra. Por sua paciência infinita comigo. Por não desistir de mim.

À minha família, por ter tornado possível minha chegada até aqui e por nunca ter me deixado desistir. Ao meu namorado e eterno amigo, que mesmo participando no final desta etapa, foi fundamental para me ajudar a manter o equilíbrio. Por terem compreendido a minha ausência.

Aos meus amigos, juizforanos e belorizontinos, por me proporcionarem momentos de alegria, incentivo e leveza.

À Michelle, por sua amizade, tranquilidade, companhia e força.

Aos amigos do LAMAL, em especial Julia, por sua lealdade, apoio e auxílio incondicionais.

À Clarice, por ter intermediado esta oportunidade de imenso aprendizado. Por seu zelo comigo ao longo desta caminhada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, na pessoa do seu coordenador, o Dr. Edelberto Santos Dias.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou e seus funcionários, por proporcionarem a infraestrutura e materiais necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa (Processo nº 140586/2011-3).

Ao CNPq e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro (Projeto PRONEX 555675/2009-2)

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| LISTA DE FIGURAS | ix |
| LISTA DE TABELAS | x |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xi |
| RESUMO | xiii |
| ABSTRACT | xiv |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 1.1 A malária..... | 15 |
| 1.2 Ciclo biológico do parasito e controle da doença..... | 16 |
| 1.3 Fármacos antimaláricos | 21 |
| 1.4 Metabolismo do heme e mecanismo de ação de 4-aminoquinolinas..... | 24 |
| 1.5 Mecanismo de ação de naftoquinonas | 27 |
| 1.6 Resistência de <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> a antimaláricos | 29 |
| 1.7 Atividade citostática <i>versus</i> citocida dos antimaláricos | 33 |
| 1.8 Estratégias na busca de novos antimaláricos | 34 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 36 |
| 3 OBJETIVOS..... | 38 |
| 3.1 Objetivo geral | 38 |
| 3.2 Objetivos específicos | 38 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 39 |
| 4.1 Comitê de ética para o uso de animais de experimentação..... | 39 |
| 4.2 Moléculas avaliadas | 39 |
| 4.3 Cultivo de linhagens de hepatoma humano (HepG2) e de células renais de macaco verde (BGM) | 39 |
| 4.4 Ensaio de citotoxicidade..... | 40 |
| 4.5 Cultivo das fases eritrocitárias de <i>P. falciparum</i> e testes de atividade <i>in vitro</i> | 40 |
| 4.6 Testes de atividade esquizontocida sanguínea em camundongos..... | 43 |
| 5 Resultados..... | 45 |
| 5.1 Artigo 1: Análogos de Cloroquina..... | 45 |
| 5.2 Artigo 2: naftoquinonas derivadas da atovaquona e compostos naftoquinoidais | 57 |
| 5.3 Artigo 3 (em preparação): Atividade citocida e citostática de AnCQs..... | 64 |
| 6 DISCUSSÃO | 76 |

| | |
|--|-----|
| 7 PERSPECTIVAS | 78 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 80 |
| 9 ANEXOS..... | 107 |
| Anexo I - artigos publicados em colaboração..... | 107 |
| Anexo II - Textos em jornais/revistas..... | 108 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Países onde ocorre transmissão de malária | 15 |
| Figura 2: Esquema representativo do ciclo biológico dos plasmódios | 17 |
| Figura 3- Estrutura química da cloroquina..... | 21 |
| Figura 4: Representação esquemática dos alvos dos principais antimaláricos esquizotomicidas sanguíneos em parasitos <i>Plasmodium spp</i> | 24 |
| Figura 5: Representação esquemática do processo de formação de hemozoína em <i>P. falciparum</i> | 25 |
| Figura 6- Estrutura química da atovaquona..... | 27 |
| Figura 7: Representação do ciclo redox das quinonas e seus efeitos..... | 28 |
| Figura 8: Esquema cronológico do surgimento dos antimaláricos e da resistência de <i>P. falciparum</i> aos mesmos | 30 |
| Figura 9: Áreas onde ocorre resistência de <i>P. falciparum</i> aos antimaláricos e de falha da CQ em casos de malária vivax | 31 |
| Figura 10: Áreas do sudeste asiático onde ocorre resistência de <i>P. falciparum</i> a artemisinina e níveis de estratificação (“Tiers”) da sua contenção..... | 31 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Principais antimaláricos disponíveis e estágios do parasito onde atuam | 23 |
|---|----|

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|---|
| Ac | Anticorpo |
| ACT | <i>Artemisinin combined therapy</i> |
| Ag | Antígeno |
| AnCQ | Análogo de cloroquina |
| AnCQPt | Análogo de cloroquina complexado com platina |
| AP2-G | Regulador transcricional em apicomplexos |
| ART | Artemisinina |
| ATV | Atovaquona |
| ATV+PRG | Atovaquona+proguanil |
| BGM | Linhagem celular renal de macaco |
| BSA | <i>Bovine serum albumin</i> |
| CEUA | Comitê de Ética para Uso de Animais |
| CI ₅₀ | Concentração que inibe o crescimento do parasito em 50% |
| CL ₅₀ | Concentração letal para 50% dos parasitos |
| CPqRR | Centro de Pesquisas René Rachou |
| CQ | Cloroquina |
| CQ-R | Cloroquina-resistente |
| CQ-S | Cloroquina-sensível |
| DDT | Diclorodifeniltricloroetano |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FePPIX | Ferriprotoporfirina IX |
| FIOCRUZ | Fundação Oswaldo Cruz |
| GPARC | <i>Global Plan for Artemisinin Resistance Containment</i> |
| HepG2 A16 | Linhagem celular neoplásica hepática |
| HF | Halofantrina |
| HRP-II | <i>Histidine rich protein II</i> |
| HssLDH | Lactato desidrogenase de <i>Homo sapiens sapiens</i> |
| IC ₅₀ | Concentração que inibe o crescimento do parasito em 50% |

| | |
|-------------------|---|
| IR | Índice de resistência |
| IS | Índice de seletividade |
| MCL ₅₀ | Concentração que inibe o crescimento das células em 50% |
| MDR | <i>Multidrug Resistance</i> |
| MQ | Mefloquina |
| MTT | Sal tetrazólico 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difenitetrazol |
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo |
| NDH2 | NADH:ubiquinona redutase tipo II |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PBS-T | <i>Phosphate Buffered Saline-Tween 20</i> |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| <i>PfATG7</i> | <i>Plasmodium falciparum autophagy-related protein 7</i> |
| <i>PfATG8</i> | <i>Plasmodium falciparum autophagy-related protein 8</i> |
| <i>PfCRT</i> | <i>Chloroquine Resistance Transporter de Plasmodium falciparum</i> |
| <i>PfLDH</i> | Lactato desidrogenase de <i>Plasmodium falciparum</i> |
| <i>Pfmdr1</i> | <i>Multi-drug resistance 1 de Plasmodium falciparum</i> |
| <i>PfNDH2</i> | NADH:ubiquinona redutase tipo II de <i>Plasmodium falciparum</i> |
| PGEM | Programa Global de Erradicação da Malária |
| Pgh1 | <i>P-glycoprotein homologue 1</i> |
| pLDH | Lactato desidrogenase de <i>Plasmodium</i> |
| PRG | Proguanil |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio de cultura) |
| SBF | Soro bovino fetal |
| S-PIR | Sulfadoxina-pirimetamina |
| TMB | <i>3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine chromogen solution</i> |
| TRAP | <i>Trombospondin-Related Anonymous Protein</i> |
| TUNEL | <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i> |

RESUMO

A resistência de *Plasmodium falciparum* aos antimaláricos esquizotônicos sanguíneos disponíveis, como a atovaquona e derivados de artemisinina, e a de *P. vivax* à cloroquina (CQ), exige a busca por alternativas quimioterápicas, objetivo deste trabalho. Como estratégia geradora de novos protótipos antimaláricos, foram feitas modificações estruturais (i) na CQ, as quais resultaram em 10 análogos de cloroquina (AnCQ), sendo quatro complexados com platina (AnCQPt), com atividade previamente descrita na malária pelo *P. berghei*; (ii) na atovaquona, originando oito naftoquinonas; e (iii) no lapachol, resultando em 11 compostos naftoquinoidais. Essas classes de moléculas foram avaliadas *in vitro* quanto a sua citotoxicidade (MCL₅₀) e atividade antiplasmodial (IC₅₀) contra parasitos sensíveis (S) ou resistentes (R) à CQ. Os índices de seletividade (IS), expressos pela razão entre essas duas atividades biológicas, foram obtidos. Os AnCQ foram mais ativos contra *P. falciparum* CQ-R *in vitro* e mais ativos que os AnCQPt e mostraram IS superiores ao da CQ. Para elucidar seu modo de ação, os AnCQ foram avaliados *in silico* quanto à ancoragem molecular na lactato-desidrogenase de *P. falciparum* (PfLDH) ou humana (HssLDH). O AnCQ33 apresentou melhor conformação na PfLDH; AnCQ37 apresentou especificidade em relação à enzima humana. Os AnCQ com maiores IS (AnCQ 33 e 37) e a CQ foram ainda avaliados quanto sua capacidade de inibir a formação de β-hematina, sendo tão ou menos ativos que a CQ. Avaliados quanto ao potencial de causar a morte (atividade citocida) ou impedir o crescimento (atividade citostática) de *P. falciparum* CQ-S e CQ-R, esses análogos demonstraram potencial citocida similar, e potencial citostático maior contra parasitos CQ-R. Os AnCQ foram ativos contra parasitos CQ-S e CQ-R na malária pelo *P. berghei*. Duas naftoquinonas (**2** e **5**) apresentaram IS superiores ao da CQ e inibiram a parasitemia pelo *P. berghei* em camundongos, com destaque para a naftoquinona **2**. Em conclusão, os melhores candidatos à produção de um antimalárico esquizotônico sanguíneo foram AnCQ33 e 37 e a naftoquinona **2**.

ABSTRACT

The resistance of *P. falciparum* to the available blood-schizonticidal antimalarials, such as atovaquone (ATVQ) and artemisinin derivatives, and that of *P. vivax* to chloroquine (CQ), requires the search for new chemotherapeutic alternatives, aim of this work. As a strategy of generating new antimalarial prototypes, structural modifications were performed (i) on CQ which provided 10 chloroquine analogs (CQAn), four of which being platinum-complexed (CQAnPt), with activity previously described against *P. berghei*-malaria; (ii) on atovaquone, providing eight naphthoquinones; and (iii) on lapachol, providing 11 naphthoquinoidal compounds. These classes of molecules were evaluated *in vitro* for their cytotoxicity (MLD₅₀) and antiplasmodial activity (IC₅₀) against CQ-sensitive (S) or resistant (R) parasites. The selectivity indexes (SI), expressed by the ratio between these two biological activities, were obtained. The CQAn were more active against CQ-R *P. falciparum* *in vitro* and more active than the CQAnPt, and exhibited SI higher than that of CQ. To elucidate their mode of action, the CQAn were evaluated *in silico* for molecular docking to the lactate-dehydrogenase of *P. falciparum* (PfLDH) or humans (HssLDH). The CQAn33 exhibited the best conformation inside PfLDH; CQAn37 exhibited specificity in relation to the human enzyme. The CQAn having the highest SI were evaluated for their ability to inhibit β -haematin formation, being so or less active than CQ. Evaluated for their potential to kill (cytotoxic activity) or prevent growth (cytostatic activity) of *P. falciparum* CQ-R and CQ-S, these analogs demonstrated similar cytotoxic potential, and higher cytostatic potential against CQ-R parasites. The CQAn were active against CQ-R and CQ-S parasites in *P. berghei*-malaria. Two naphthoquinones (**2** and **5**) exhibited SI higher than that of CQ and inhibited *P. berghei*-parasitemia in mice, with highlight to naphthoquinone **2**. In conclusion, the best candidates for the production of a blood-schizonticidal antimalarial were CQAn33, 37 and the naphthoquinone **2**

1 INTRODUÇÃO

1.1 A malária

Endêmica nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, a malária foi responsável por 198 milhões de casos e 584.000 mortes em 2013, com maioria na África subsaariana e em crianças com menos de cinco anos (WHO, 2014a). O mapa abaixo ilustra os países onde ocorre a transmissão da doença (**Figura 1**).

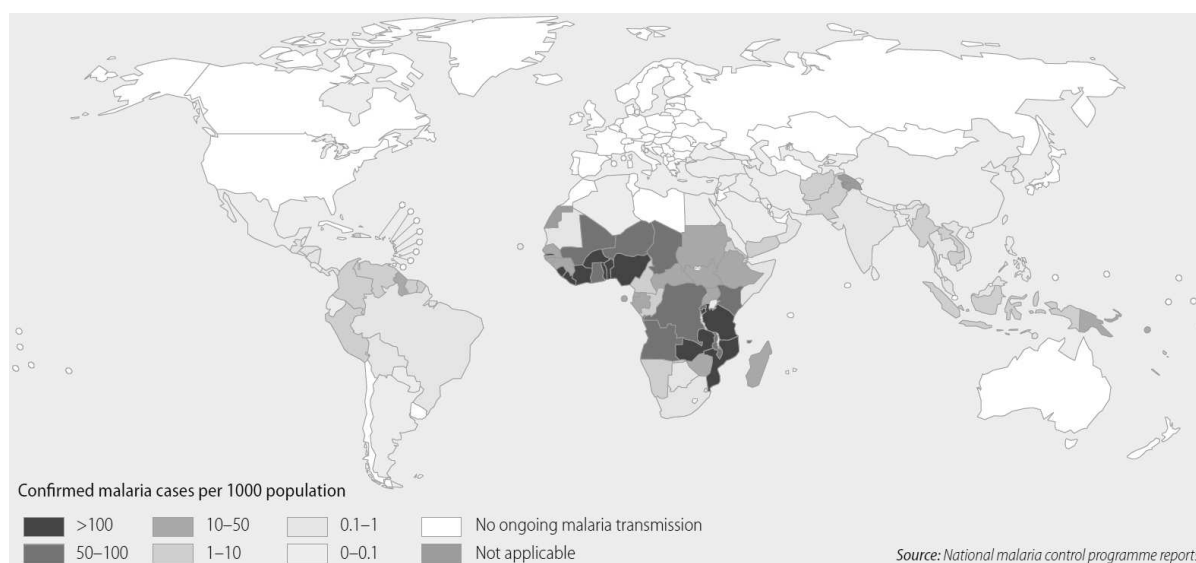


Figura 1- Países onde ocorre transmissão de malária. Extraído de WHO, 2014a.

No Brasil, 178.000 casos de malária foram registrados em 2013, praticamente restritos à Amazônia Legal (Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e Maranhão), sendo 80% causados por *P. vivax* (SVS/MS, 2014). A pouca familiaridade dos profissionais de saúde diante de casos de malária importada acarretou 12 mortes entre 2008 e 2012, no estado de Minas Gerais, segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde (Krettli et al, 2013).

Os parasitos causadores da malária pertencem ao gênero *Plasmodium* e são cinco as espécies que infectam o homem: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi* (WHO, 2012b). *P. falciparum* é responsável por 95% das infecções na África e pela forma mais grave da doença, enquanto *P. vivax* é mais amplamente distribuído pelos trópicos. Essa espécie representa um reservatório de infecção de difícil controle por possuir formas latentes no fígado, sendo responsável por alta morbidade e também por casos graves (Anstey et al, 2009; Lacerda et al; 2012). *P. malariae* é mais comum na África sub-saariana e no

sudeste do Pacífico, enquanto a maioria dos casos de malária causada por *P. ovale* se restringe à África (Mueller et al, 2007). *P. knowlesi*, anteriormente restrito a símios, é responsável por casos graves de malária no Sudeste Asiático (White, 2008).

A malária é transmitida por mosquitos anofelinos. Das aproximadamente 490 espécies, 70 são potenciais vetores da doença e 30 são de maior importância por serem mais susceptíveis e portanto eficientes na transmissão. Nas Américas, os mosquitos da espécie *Anopheles darlingi* são os transmissores mais importantes, enquanto na África predominam *An. funestus*, *An. arabiensis* e *An. gambiae* (WHO, 2013b) e no Sudoeste Asiático, *An. minimus*, *An. dirus*, *An. sundaicus*, *An. maculatus*, *An. subpictus* e *An. flavirostris* (Raghavendra et al, 2011).

1.2 Ciclo biológico do parasito e controle da doença

O ciclo biológico dos parasitos da malária compreende duas fases e dois hospedeiros: a fase sexuada, com reprodução dos parasitos por esporogonia no hospedeiro invertebrado; e a assexuada, com reprodução por esquizogonia no hospedeiro vertebrado.

A infecção se inicia quando fêmeas de mosquitos anofelinos inoculam esporozoítos (**Figura 2**), dos quais aproximadamente 50% permanecem na derme, após exaustão de sua motilidade, em infecções experimentais de camundongos; do restante, 70% alcançam a corrente sanguínea, enquanto 30% invadem linfonodos, onde podem ser degradados (Amino et al, 2006). Após atingirem a corrente sanguínea, os esporozoítos passam transversalmente por vários hepatócitos (Mota et al, 2002) para depois se instalarem em algumas dessas células, gerando milhares de merozoítos, os quais são liberados na forma de merozomas e invadirão os eritrócitos. A fase hepática é assintomática e tem a duração de aproximadamente 14 dias. *P. vivax* e *P. ovale* apresentam formas hepáticas latentes (Krotoski et al, 1980; Mayxay et al, 2004), os hipnozoítos, responsáveis pelas recaídas tardias da doença (Wells et al, 2010), com reativação do ciclo sanguíneo e reaparecimento dos sintomas.

Nos eritrócitos, os merozoítos se tornam trofozoítos jovens (“anéis”) após 1 h, trofozoítos maduros em 24-28 h e evoluem para esquizontes (46-48 h), dando origem a novos merozoítos (Wilson et al, 2013) a cada 48h. No caso de *P. malariae*, esse ciclo dura 72 h. Os merozoítos invadem outros eritrócitos, reiniciando a fase eritrocítica, responsável pelos sintomas da doença (Greenwood et al, 2008) tais como calafrios, febres periódicas, mal-estar, sudorese, náuseas, cefaleia e mialgia.

Os merozoítos em cada esquizonte tornam-se sexualmente comprometidos sob a influência da combinação de fatores genéticos do parasito e do microambiente do hospedeiro

(Smith et al, 2002): sua imunidade e hormônios, antimaláricos, coinfeção, controle autócrino do crescimento e ativação de vias de sinalização do parasito (Dyer & Day, 2000). O AP2-G, um regulador transcricional pertencente à família AP2 de proteínas de ligação ao DNA, foi recentemente indicado como um regulador da formação de gametócitos, ativando a transcrição de genes expressos nesse estágio do parasito (Kafsack et al, 2014).

Os gametócitos dos plasmódios, ingeridos pelo mosquito anofelino susceptível, evoluem iniciando o ciclo sexuado ou esporogônico (Baker, 2010). Logo após o repasto sanguíneo do mosquito, ocorre a exflagelação do gametócito masculino no lúmen do seu intestino médio, resultante, dentre outros fatores, de queda na temperatura em relação ao hospedeiro vertebrado ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) e pH, liberando cada um oito microgametas, e a diferenciação do gametócito feminino em macrogameta. A fusão dos gametas feminino e masculino origina o zigoto e posteriormente o oocineto, uma estrutura móvel que atravessa a matriz peritrófica e invade o epitélio intestinal do mosquito (Ghosh et al, 2000); no espaço extracelular é denominado oocisto, no interior do qual centenas de esporozoítos gerados são liberados na hemolinfa do mosquito (Meis et al, 1992). Finalmente, os esporozoítos atravessam as glândulas salivares através da interação da proteína TRAP (*Thrombospondin-Related Anonymous Protein*) do parasito com a célula hospedeira (Matuschewski et al, 2002), e são inoculados no hospedeiro humano pela picada do anofelino.

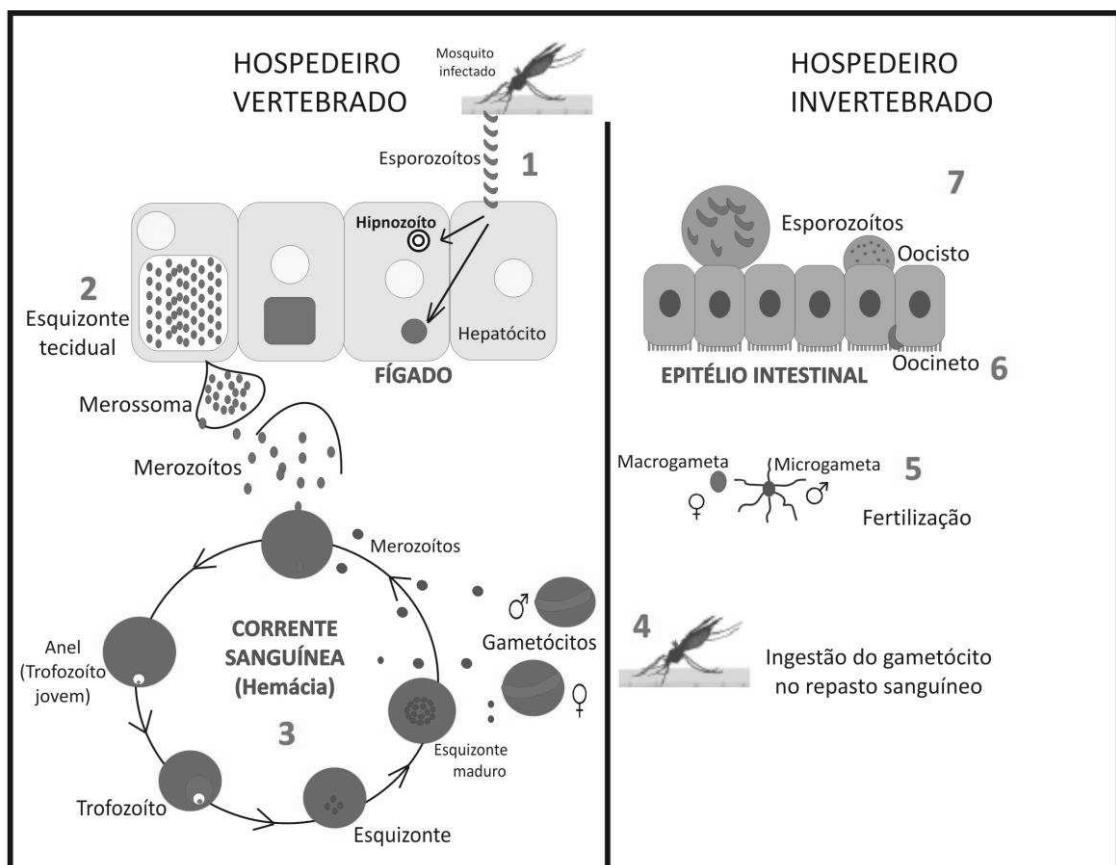


Figura 2- Esquema representativo do ciclo biológico dos plasmódios. De Souza NB, 2015.

Como proposto por 28 países, um programa global de erradicação da malária (PGEM), aprovado pela Assembléia da Saúde Mundial no México, foi iniciado em 1955. À Organização Mundial de Saúde (OMS) competia proporcionar aconselhamento técnico e coordenar recursos, sem atuar como autoridade direcionadora e coordenadora (WHO, 1973; Gramiccia & Beales, 1988; Wernsdorfer & McGregor, 1988). Tendo como base o tratamento curativo e o profilático dos pacientes com a cloroquina (CQ) e o controle dos mosquitos com aplicação intradomiciliar do inseticida diclorodifeniltricloroetano (DDT), a erradicação foi definida como o fim da transmissão da malária em uma campanha bem conduzida e cronologicamente limitada visando eliminar a transmissão (WHO, 1957). A campanha foi composta pelas seguintes fases: preparatória; fase de ataque, cuja principal característica foi a interrupção da transmissão; fase de consolidação, marcada por incidência parasitária inferior a 0,5%; e fase de manutenção.

Com a reversão em algumas áreas da fase de consolidação para fase de ataque, foi necessário reconsiderar a estratégia global, com o reconhecimento de que a erradicação não seria praticável em curto prazo, especialmente na região Amazônica; o mais apropriado seria priorizar o controle e o último objetivo seria a erradicação (WHO, 1973). A falta de empenho político, o surgimento de parasitos resistentes à CQ e de mosquitos resistentes ao DDT prejudicaram o PGEM e exigiram o desenvolvimento de novos antimaláricos (Nájera et al, 2011).

Medidas de controle da doença são utilizadas, sendo a principal seu diagnóstico preciso (WHO, 1993), bem como o controle do vetor e o tratamento imediato dos pacientes infectados.

O principal método de diagnóstico é o exame do sangue do paciente através de gota espessa ou esfregaço sanguíneo, corados pelo Giemsa e examinados através de microscopia ótica. A gota espessa concentra os parasitos em camadas de hemácias num fator de 20 a 30, facilitando a detecção de baixas parasitemias; o esfregaço é ideal para o diagnóstico específico pela facilidade de visualização das formas e contagem dos parasitos. A microscopia de fluorescência também foi utilizada para detecção dos parasitos marcados por fluorocromos nucleófilos, como o laranja de acridina e o benzotiocarboxipurina, de alta sensibilidade, detectando parasitemias inferiores a 0,002% (menos de 100 parasitos por μL de sangue), mas com a limitação de não oferecerem diagnóstico específico.

Outros métodos diagnósticos não baseados em microscopia incluem técnicas de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) baseadas em sequências específicas de ácidos nucleicos, as quais apresentam como vantagem a detecção de 5 parasitos ou menos por μL de sangue e a

identificação espécie-específica (Schellenberg, 2011). As desvantagens desta técnica são alto custo inerente aos equipamentos e reagentes, bem como a necessidade de pessoal preparado, além do longo tempo exigido, podendo ocorrer a morte do paciente no intervalo entre a coleta o resultado (Krettli et al, 2013), especialmente nos casos de primeiras infecções por *P. falciparum*, as quais se tornam graves. Há também os testes rápidos, baseados na captura de antígenos do sangue periférico do paciente revelados por meio de anticorpos monoclonais (Wongsrichanalai et al, 2007). Esse diagnóstico é fornecido por meio de imunocromatografia, que consiste na migração de componentes do sangue do paciente numa membrana de nitrocelulose. Os antígenos capturados nos testes rápidos imunocromatográficos são HRP-II [proteína rica em histidina II, produzida por estágios assexuados e gametócitos jovens de *P. falciparum* (Rock et al, 1987)], o pLDH [lactato-desidrogenase de plasmódio, enzima produzida em estágios sexuais e assexuais dos plasmódios (Makler et al, 1998)], sendo a distinção espécie-específica baseada em isômeros da enzima; e aldolase [enzima da via glicolítica utilizada para diagnóstico de malária não falciparum (Lee et al, 2006)]. Como consequência da ligação antígeno-anticorpo, o resultado é visível por meio de uma linha colorida na membrana de nitrocelulose, num período de 20 minutos (Maltha & Jacobs, 2011).

A segunda medida mais importante no controle da malária é o uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas piretróides visando reduzir a população do inseto transmissor e por consequência a morbidade e mortalidade pela doença (WHO, 2003). Um total de 88 países, incluindo 39 na África, distribuem gratuitamente mosquiteiros impregnados com o inseticida, medida eficaz utilizada por um longo período em áreas onde ocorre transmissão estável da doença, mas o número entregue ainda é inferior ao mínimo de mosquiteiros necessários para atingir a proteção de todas as pessoas em risco de contrair malária (WHO, 2013a). Além disso, apesar de apresentar alta eficácia e baixo custo, já é relatada resistência dos vetores a essa classe de inseticida (Martinez-Torres et al, 1998).

A aplicação de inseticidas residuais, tais como o DDT em residências, também consiste em medida de controle da doença, desde que respeitadas as recomendações da OMS (WHO, 2013b). Contudo, a resistência de mosquitos anofelinos desenvolvida por espécies importantes de vetores foi relatada em 64 países onde ocorre a transmissão da doença (WHO, 2012a).

Em circunstâncias especiais, as medidas de controle, que incluem mosquiteiros impregnados e aplicação de inseticidas residuais, são complementadas pelo controle de larvas dos anofelinos. São realizadas intervenções visando à modificação do seu habitat, bem como o controle biológico e o uso de larvicidas. Tais intervenções são úteis apenas em áreas

urbanas ou periurbanas, onde os criadouros são poucos, fixos e facilmente localizáveis (WHO, 2013b).

Outra medida usada no controle da malária é a profilaxia (ou quimioterapia preventiva), definida como tratamento com antimaláricos eficazes, administrados a populações que se encontram sob o risco de contrair malária (WHO, 2013a). As três terapias preventivas recomendadas pela OMS em áreas de média ou elevada transmissão específicas (WHO, 2013a): (i) todas as mulheres grávidas devem ser tratadas com a combinação de sulfadoxina e pirimetamina no primeiro trimestre da gravidez; (ii) todas as crianças devem receber uma dose da combinação de sulfadoxina e pirimetamina junto com as vacinas contra sarampo e a tríplice; (iii) crianças com idade entre 3 a 59 meses devem receber o tratamento preventivo durante o período sazonal de transmissão da doença. No caso de viajantes, especialmente mulheres grávidas e crianças, medidas que visam evitar a picada do mosquito anofelino, tais como dormir sob mosquiteiros impregnados com inseticidas, utilizar roupas compridas e repelentes, são recomendadas. Se os viajantes se destinam a países dentre os 97 endêmicos na África, Ásia e Américas, recomenda-se o uso profilático de cloroquina, doxiciclina, mefloquina ou da combinação de atovaquona e proguanil (WHO, 2012c) antes, durante ou após o retorno da viagem (WHO, 2014b). No Brasil, a profilaxia não é recomendada pelo Ministério da Saúde para evitar a seleção de parasitos resistentes.

Existem atualmente 27 vacinas contra *P. falciparum* em testes clínicos, as quais utilizam proteínas da superfície do esporozoíto ou do merozoíto, mas nenhuma se encontra comercialmente disponível (Moorthy et al, 2013), dificuldade resultante do polimorfismo de parasitos nas diferentes áreas endêmicas (Kumar et al, 2014). Das vacinas contra *P. falciparum*, a mais avançada nos testes clínicos é RTS,S/AS01 que utiliza como antígeno a proteína circumesporozoíto, importante proteína de superfície de esporozoítos e fundamental para sua infectividade (Ménard et al, 1997). Essa vacina foi desenvolvida pela GlaxoSmithKline Biologicals e PATH Malaria Vaccine Initiative e ofereceu 50% de proteção contra a infecção (Kester et al, 2009), reduzindo as taxas de malária grave em pelo menos 30% nos vacinados (RTS,S et al, 2012). Vacinas contra *P. vivax* desenvolvidas contra os estágios hepáticos também demonstraram proteção em testes pré-clínicos (Reyes-Sandoval et al, 2014).

Diante do baixo sucesso obtido pelas medidas de controle acima e outros problemas descritos acima, a quimioterapia específica representa uma estratégia fundamental (Muregi et al, 2009) e tem como objetivos: (i) reduzir morbidade e mortalidade por garantir cura rápida e completa da infecção, evitando que a doença progrida para o quadro grave e potencialmente

fatal, além de evitar a infecção crônica que leva a anemia; (ii) impedir a transmissão; e (iii) evitar o surgimento e disseminação dos parasitos resistentes aos antimaláricos (WHO, 2013a).

1.3 Fármacos antimaláricos

A quinina, extraída de cascas de árvores do gênero *Cinchona*, nativas da América do Sul, é o antimalárico mais antigo, utilizado há mais de quatro séculos, a partir da descoberta, pelos jesuítas no Peru, de que infusões da casca destas plantas usadas para tratar febres curavam a malária (Okombo et al, 2011). Caracterizada molecularmente em 1820, a quinina deu origem a diversos antimaláricos 4-aminoquinolínicos a partir do anel quinolínico, dentre eles a CQ (**Figura 3**).

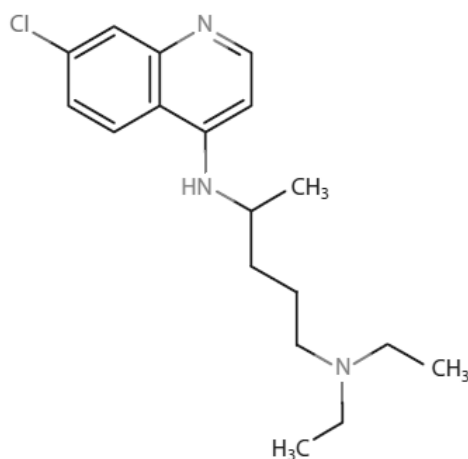


Figura 3- Estrutura química da cloroquina. Extraído de WHO, 2010a.

Em função da resistência de *P. falciparum* à CQ como consequência da utilização da monoterapia, foram sintetizados novos antimaláricos, tais como a amodiaquina, a mefloquina, inibidores de enzimas da síntese de folatos, e derivados da artemisinina, extraída da planta *Artemisia annua*. Dada a resistência de *P. falciparum* à maioria desses antimaláricos (Fidock et al, 2008), a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o uso da “Artemisinin combined therapy” (ACT), ou seja, a combinação de derivados da artemisinina com outro antimalárico: (i) arteméter+lumefantrina; (ii) artesunato+amodiaquina; (iii) artesunato+mefloquina; (iv) artesunato+sulfadoxina+pirimetamina; (v) diidroxiartemisinina+piperaquina (WHO, 2010b).

A quinina é utilizada por via oral em combinação com antibióticos para tratar malária falciparum não complicada (WHO, 2010a), além de uma das cinco ACTs recomendadas pela OMS. A malária grave, caracterizada por sintomas como anemia, hipoglicemia, convulsões,

febre acima de 41°C, redução da função renal, icterícia, distúrbios de consciência e parasitemias elevadas (SVS/MS, 2010), deve ser tratada com artesunato injetável seguido de um tratamento completo com uma ACT eficaz. Em vários países, a quinina ainda é utilizada para tratar malária grave, embora o tratamento com artesunato seja recomendado para adultos (WHO, 2010a). O tratamento com quinina injetável deve ser seguido por quinina via oral com antibiótico ou artesunato com clindamicina ou doxiciclina, ou um tratamento completo com, no paciente capaz de tolerar terapia oral (WHO, 2010a).

A malária vivax deve ser tratada com cloroquina em áreas onde este fármaco é eficaz, enquanto uma ACT apropriada (exceto artesunato+sulfadoxina+pirimetamina) deve ser usada em áreas onde a resistência à cloroquina foi relatada. Para evitar as recaídas tardias causadas por *P. vivax*, o tratamento deve ser feito ainda com primaquina por 14 dias. O uso da primaquina é limitado devido à hemólise como efeito adverso ocasionado pelos seus metabólitos, especialmente no caso de indivíduos deficientes na enzima glicose-6-fostato desidrogenase (Ashley et al, 2014b).

O alvo da maioria dos antimaláricos é a fase eritrocítica dos parasitos (Olliaro, 2001). Esses fármacos esquizonticidas sanguíneos compreendem quinolinas, aminoálcoois, sulfonamidas, biguanidas, diaminopirimidinas, lactonas sesquiterpênicas (artemisinina e seus derivados semissintéticos), naftoquinonas e antibióticos (WHO, 2010a). Alguns antimaláricos agem contra outros estágios dos parasitos, como esquematizado na **Tabela 1**. Alguns alvos desses esquizonticidas sanguíneos se encontram representados na **Figura 4**.

Tabela 1- Principais antimaláricos disponíveis e estágios do parasito onde atuam.

| ANTIMALÁRICO | CLASSE QUÍMICA | ESTÁGIOS-ALVO NO PARASITO | | | |
|--|---------------------------------------|---------------------------|-----|-------|-----|
| | | EE | HEP | ERITR | GAM |
| Cloroquina Amodiaquina | 4-aminoquinolina | | | x | |
| Ferroquina** | 4-aminoquinolina / ferroceno | | | x | |
| Piperaquina | Bisquinolina | | | x | |
| Primaquina | | x | x | x | x |
| Bulaquina* | 8-aminoquinolina | | | | x |
| Tafenoquina** | | | x | | |
| Quinina Lumefantrina Mefloquina | Aminoálcool | | | x | |
| Artesunato Arteméter Dihidroartemisinina | Endoperóxido semissintético | | | x | x |
| Sulfadoxina | Sulfonamida | | | x | x |
| Pirimetamina | Diaminopirimidina | x | | x | x |
| Atovaquona | Naftoquinona | x | | x | x |
| Proguanil Clorproguanil | Biguanidas | x | | x | x |
| Tetraciclina | Antibiótico | x | | x | |
| Azitromicina | Antibiótico macrocíclico | | | x | |
| Clindamicina | Antibiótico derivado das lincosamidas | x | | x | |
| Doxiciclina | Antibiótico derivado da tetraciclina | x | | x | |

Adaptado de WHO, 2010a; Aguiar et al, 2012.

EE=exoeritrocíticas, HEP=hepáticas, ERITR=eritrocíticas, GAM=gametócitos.

* licenciado apenas na Índia

**em testes clínicos.

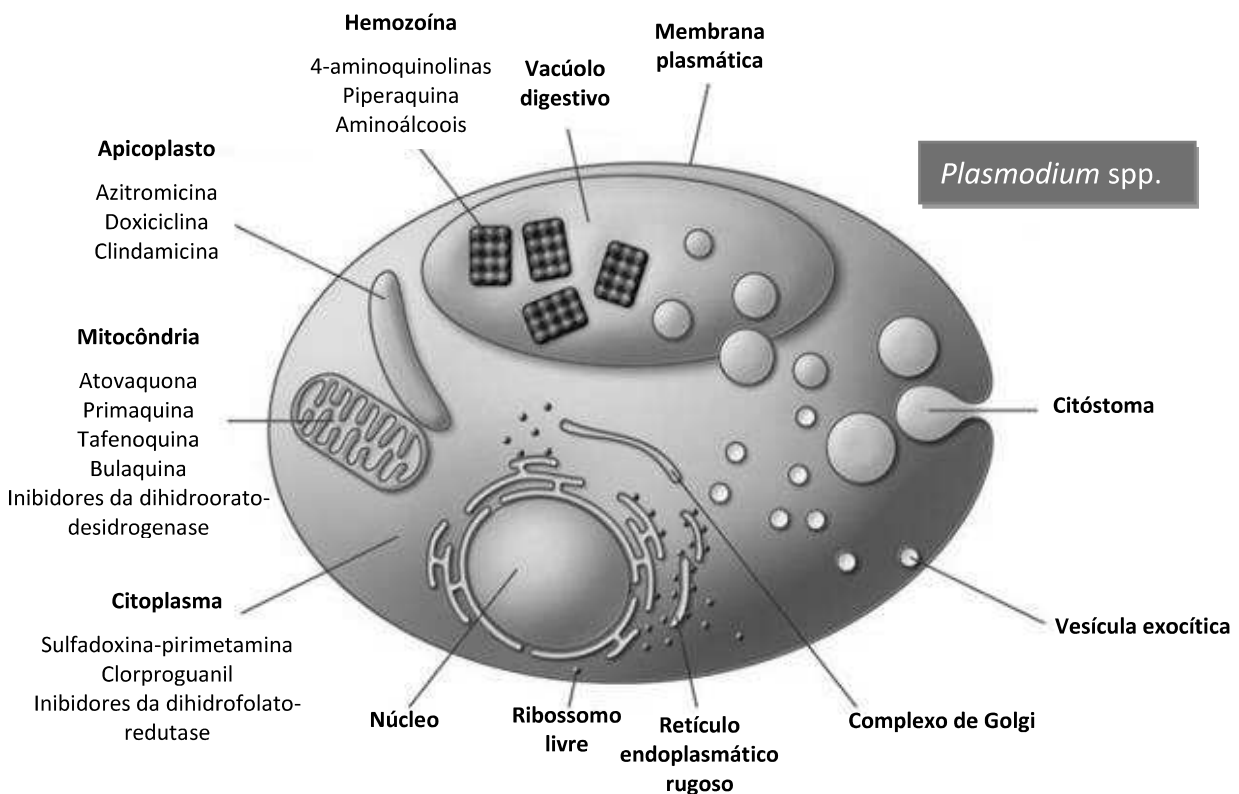


Figura 4: Representação esquemática dos alvos dos principais antimaláricos esquizotocidas sanguíneos em parasitos *Plasmodium* spp. Adaptado de Greenwood et al, 2008.

1.4 Metabolismo do heme e mecanismo de ação de 4-aminoquinolinas

Durante o estágio intraeritrocítico, os parasitos digerem a hemoglobina em seu vacúolo digestivo (Yayon et al, 1984). A hemoglobina é metabolizada em (i) metemoglobina por oxidação e hidrolisada em heme livre (Fe^{3+}), por sua vez oxidado gerando ferriprotoporfirina IX (FePPIX) e o ânion superóxido (Egan, 2008); e (ii) globina, hidrolisada em pequenos peptídeos (Eggleson et al, 1999) fornecendo aminoácidos para síntese protéica do parasito (Sherman & Tanigoshi, 1970) (**Figura 5**). O heme livre é altamente tóxico por gerar espécies reativas de oxigênio (Kumar & Bandyopadhyay, 2005) e induzir estresse oxidativo, levando à morte do parasito (Vincent, 1989; Schmitt et al, 1993). Por ser lipofílico, ele pode se intercalar facilmente à membrana e ocasionar danos à sua permeabilidade e organização lipídica, causando peroxidação (Ryter & Tyrrell, 2000; Stojiljkovic et al, 2001), com subsequente lise e morte do parasito (Schmitt et al, 1993). O parasito detoxifica a FePPIX

através de sua polimerização em cristais de hemozoína (Egan, 2008). A interferência nesse processo ocasiona a morte do parasito (Sherman, 1998).

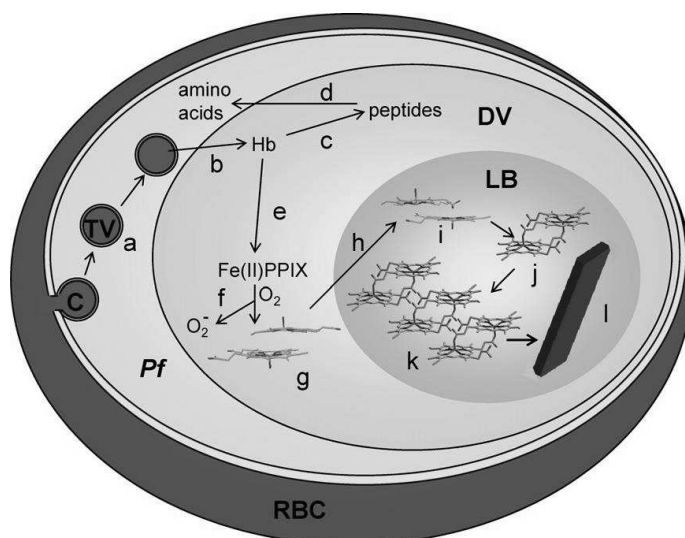


Figura 5- Representação esquemática do processo de formação de hemozoína em *P. falciparum*. O citoplasma da hemácia (RBC) é ingerido pelo parasito (Pf) via citóstoma (C), transportado (a) ao vacúolo digestivo (DV) por vesículas de transporte (TV). Após liberação no vacúolo digestivo (b), a hemoglobina (Hb) é digerida por enzimas em pequenos peptídeos (c) exportados do VD (d) e degradados em aminoácidos. O heme (Fe(II)PPIX) liberado da hemoglobina (e) é oxidado (f), possivelmente por oxigênio molecular, gerando Fe(III)PPIX e ânion superóxido. Em solução aquosa, Fe(III)PPIX dimeriza na forma π - π (g), é envolto (h) por um corpo lipídico (LB) e em cujo meio pouco dielétrico forma um dímero precursor de hemozoína (i) convertido em dímero de hemozoína (j) pelo deslocamento dos ligantes de água axiais de H_2O -Fe(III)PPIX juntamente com a formação de ligações Fe-propionato. Na ausência de ligação de hidrogênio competitiva com o solvente, esses dímeros podem se reunir no núcleo de hemozoína através de ligações de hidrogênio (k) formando o cristal de hemozoína (l). Adaptado de Egan, 2008.

A ação das 4-aminoquinolinas depende de sua ligação ao heme nas formas monomérica ou dimérica, inibindo a formação de hemozoína, resultando na morte do parasito (Egan & Ncokazi, 2005).

A CQ interage com o μ -oxo dímero do heme oxidado e impede a formação de hemozoína (Egan et al, 1997; Leed et al, 2002). Este complexo ocasiona estresse oxidativo (Loria et al, 1999) que pode levar à peroxidação de lipídeos, danos ao DNA, oxidação de

proteínas e finalmente à morte do parasito. As 4-aminoquinolinas agem reduzindo a formação de hemozoína, ao invés de bloquear de forma irreversível a sua formação (Egan & Ncokazi, 2005). Radicais altamente reativos também são gerados em decorrência de uma transferência de elétrons entre o complexo heme Fe[II]/Fe[III] e o anel quinolínico (Monti et al, 2002). A CQ, de forma competitiva, também impede a degradação citosólica da FePPIX mediada por glutatona (Famin et al, 1999), com sua conseqüente ligação a proteínas do parasito (Famin & Ginsburg, 2003) e morte do mesmo em função da FePPIX não polimerizada que se acumula na membrana das células infectadas (Zhang et al, 1998). Mais recentemente, Combrinck e colaboradores (2012) demonstraram uma evidência direta, através de fracionamento celular do parasito, que a CQ inibe a formação de hemozoína, e sugeriram que a morte do parasito seja conseqüência de efeitos oriundos da desestabilização das membranas das organelas causada pela FePPIX.

A atividade antiplasmodial da CQ depende de suas características estruturais: cadeia lateral amina básica; presença do cloro na posição 7 do anel 4-aminoquinolínico para inibir a formação da β -hematina; e a cadeia lateral aminoalquil, as quais contribuem para o acúmulo do fármaco no vacúolo digestivo e intensificação da sua associação com a FePPIX (Egan et al, 2000). Um átomo de hidrogênio ligado a um carbono que realiza tripla ligação adquire um caráter ácido, elevando a acidez no vacúolo, condição que reduz a formação de β -hematina (Slater et al, 1991; Basilico et al, 1998), favorecendo um mecanismo de ação deste fármaco. Tais aspectos devem ser levados em conta no desenvolvimento racional de aminoquinolinas candidatas a novos antimaláricos.

A CQ também pode causar a inibição da enzima lactato-desidrogenase de *P. falciparum* (PfLDH), uma enzima importante na via glicolítica do parasito expressa em altos níveis durante seu estágio eritrocítico (Sherman, 1979). A CQ compete com o NADH, o cofator da enzima, atuando como inibidor competitivo e seletivo para a enzima plasmodial (Read et al, 1999). Além disso, a associação entre a hematina e a CQ inibe a PfLDH (Read et al, 1999), dados corroborados por estudos *in silico* de ancoragem e modelagem molecular envolvendo derivados quinolínicos (Cortopassi et al, 2011).

1.5 Mecanismo de ação de naftoquinonas

A atovaquona (**Figura 6**), uma naftoquinona utilizada como profilático (Shapiro et al, 1999) e em associação com proguanil (Malarone[®]) em áreas onde ocorre resistência de *P. falciparum* (WHO, 2012b), causa o colapso do potencial de membrana mitocondrial do parasito (Srivastava et al. 1997). Assim como outras naftoquinonas (Schuck et al. 2013), em concentrações 100 vezes menores que a necessária para inibir o complexo bc1 de mamíferos (Fry & Pudney, 1992), a atovaquona inibe o transporte de elétrons no nível do complexo citocromo bc1 de *P. falciparum*, o qual apresenta dois locais de ligação: um oxidativo (sítio Q₀) e outro redutor (sítio Q_i), sendo este estruturalmente distinto de outras espécies do parasito (Vaidya et al, 1993).

A cadeia transportadora de elétrons do parasito foi validada como alvo para terapia antimalárica pelo sucesso clínico da atovaquona, antimalárico que inibe o complexo bc1 e impede a bomba de prótons (Fry & Pudney, 1992). Isso resulta na perda do potencial de membrana (Srivastava et al, 1997) e disfunção da organela, comprometendo a fornecimento de intermediários para síntese de pirimidinas do parasito (Hammond et al, 1985; Painter et al, 2007).

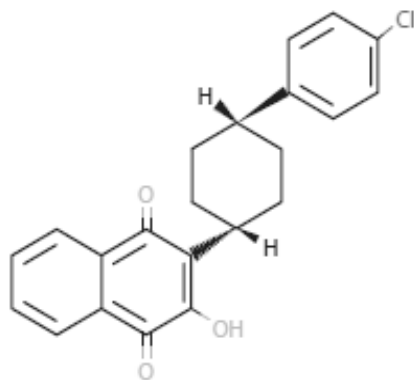


Figura 6- Estrutura química da atovaquona. Extraído de WHO, 2010a.

A capacidade das quinonas em receber elétrons se deve aos substituintes atrativos ou doadores de elétrons na molécula de quinona, modulando as propriedades redox responsáveis pelo estresse oxidativo resultante (dos Santos et al, 2004). O estresse oxidativo e/ou a alquilação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos causados pelas naftoquinonas (**Figura 7**), podem levar ao dano celular (Vilamil-Fernandez et al, 2004), apoptose (Susin et al, 1998) ou necrose (Brand et al. 2004).

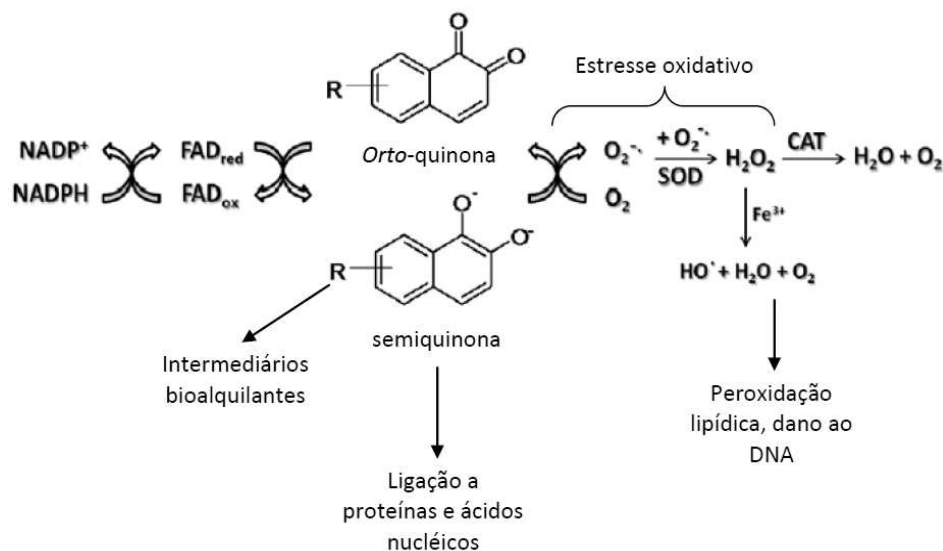


Figura 7 – Representação do ciclo redox das quinonas e seus efeitos. SOD=superóxido dismutase; CAT=catalase. Adaptado de de Castro et al. 2013.

Alguns aspectos estruturais são fundamentais para a atividade das quinonas: (i) o grupo hidroxil no carbono 3 e a cadeia lateral ciclohexil-clorofenil no carbono 2 (Hudson et al, 1990); (ii) a configuração *trans* da cadeia lateral (Fry & Pudney, 1992); (iii) o oxigênio na posição 1; e (iv) a função cetona na quinona, representando os grupos farmacofóricos mais importantes dessas substâncias (Pandey et al, 2001). Um estudo recente, Stickles e colaboradores (2015) demonstraram que a preferência por Q_i está relacionada com (i) a presença de substituintes retiradores de elétrons na posição 6, (ii) uma combinação de halogênios na posição 6 e a presença de grupos metóxi na posição 7, e (iii) cadeias laterais aril na posição 3; enquanto a preferência por Q_0 está relacionada com a presença de grupos na posição 7.

1.6 Resistência de *P. falciparum* e *P. vivax* a antimaláricos

De acordo com a OMS, a resistência a fármacos é definida como a habilidade de uma cepa do parasito sobreviver ou se multiplicar, apesar da administração e absorção de um fármaco dado em doses iguais ou superiores àquelas usualmente recomendadas, respeitando-se a tolerância do indivíduo (WHO, 1965). A **Figura 8** esquematiza cronologicamente a descoberta dos antimaláricos e o surgimento da resistência de *P. falciparum* aos mesmos.

A resistência de *P. falciparum* à CQ foi relatada inicialmente na América do Sul e no sudeste asiático na década de 1950, estando disseminada na maioria dos países endêmicos (Ridley, 2002). Ela parece estar relacionada, aparentemente, com a estrutura do composto utilizado como antimalárico (Stocks et al, 2002).

Casos de reduzida sensibilidade de *P. falciparum* à quinina foram também relatados em 1960 no Brasil e no Sudeste Asiático (Bjorkman & Phillips-Howard, 1990). A sensibilidade à quinina geralmente independe da sensibilidade à CQ ou mefloquina, sugerindo mecanismos de resistência distintos (Pradines et al, 2010; Bellanca et al, 2014; Hrycyna et al, 2014).

Casos de resistência de *P. falciparum* à atovaquona foram relatados 10 anos após sua introdução (Chiodini et al, 1995; Looareesuwan et al, 1996), quando este antimalárico era utilizado isoladamente (Srivastava et al, 1999). A resistência ao antimalárico na combinação com proguanil (Malarone®) foi relatada em 2002 (Fivelman et al, 2002; Färnert et al, 2003).

Os primeiros casos de falha terapêutica às ACTs em casos de malária falciparum foram relatados em 2008 (Noedl et al, 2008). Atualmente, parasitos resistentes à ACT se encontram no Sudeste Asiático (Miotto et al, 2013); na África foi relatado atraso no tempo para eliminação da parasitemia (Ashley et al, 2014a).

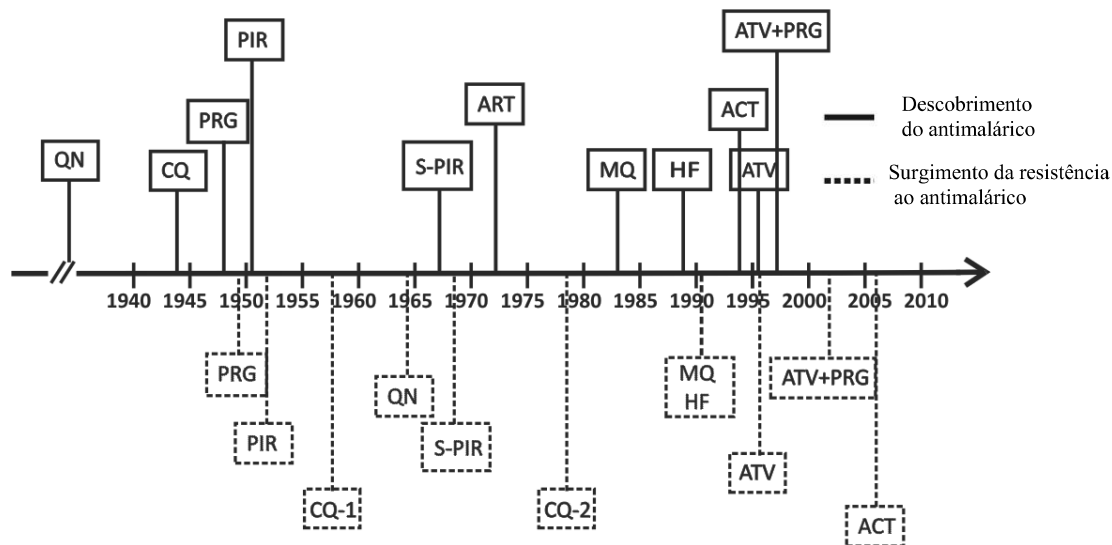


Figura 8- Esquema cronológico da descoberta dos antimaláricos e surgimento da resistência de *P. falciparum* aos mesmos. QN=quinina; CQ=cloroquina; PRG=proguanil; S-PIR=sulfadoxina-pirimetamina; ART=artemisinina; MQ=mefloquina; HF=halofantrina; ACT=Artemisinin Combined Therapy; ATV=atovaquona; ATV+PRG=atovaquona+proguanil. Adaptado de Pradines et al, 2010.

A resistência de *P. vivax* à CQ foi relatada pela primeira vez em Papua Nova Guiné em 1989 (Rieckmann et al, 1989). No Brasil, ela foi relatada primeiramente em 1999 em Manaus (Alecrim et al, 1999), Rondônia em 2000 (Villalobos-Salcedo et al, 2000) e Belém em 2003 (Machado et al, 2003); em 2011, foi relatada na África (Yohannes et al, 2011). Exceto nos países compreendidos na região Ásia-Pacífico, *P. vivax* ainda é sensível à CQ (Garcia-Bustos & Gamo, 2013).

Os casos de resistência e falhas terapêuticas estão ilustrados na **Figura 9**.

Em decorrência da multi-resistência de *P. falciparum* e da resistência de *P. vivax* à CQ, a OMS desenvolveu o “Global Plan for Artemisinin Resistance Containment (GPARC)” (WHO, 2011) que define três níveis (“Tiers”) para estratificar as atividades de contenção da resistência: Nível 1- áreas onde há evidência de resistência a artemisinina e medidas de contenção dos parasitos resistentes devem ser tomadas rapidamente; Nível 2- áreas de migração populacional onde o controle da malária deve ser intensificado; Nível 3- áreas endêmicas sem evidência de resistência de *P. falciparum* a artemisinina onde a prevenção e medidas de controle devem ser intensificadas (**Figura 10**).

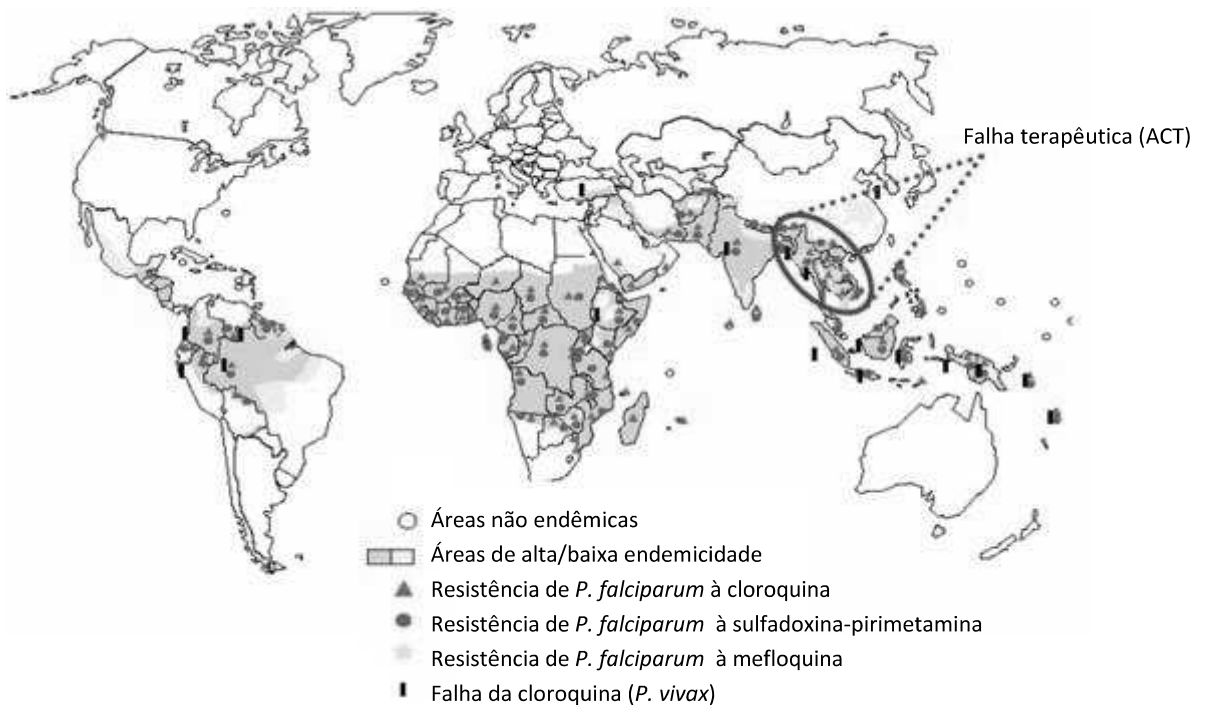


Figura 9- Áreas onde ocorre resistência de *P. falciparum* aos antimaláricos e de falha da CQ em casos de malária vivax (Adaptado de WHO, 2005).

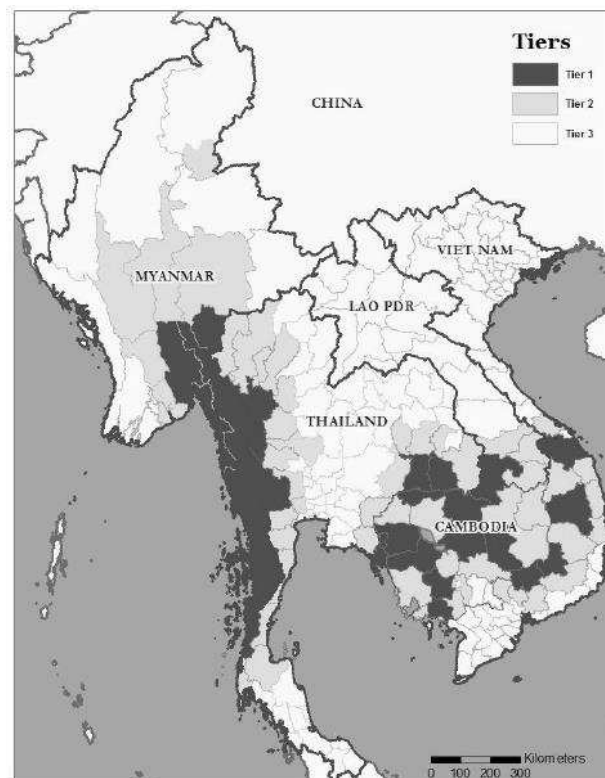


Figura 10- Áreas do sudeste asiático onde ocorre resistência de *P. falciparum* a artemisinina e níveis de estratificação (“Tiers”) da sua contenção. Extraído de “Update in artemisinin resistance. WHO, 2014”.

Algumas características distinguem parasitos resistentes à CQ dos sensíveis: nos primeiros ocorre reduzido acúmulo de CQ no vacúolo (Fitch, 1970) e quimiossensibilização, ou reversão da resistência, pelo verapamil (Martin et al, 1987). Esta substância modula a resistência a multifármacos (MDR) em células cancerosas, o que levou à identificação da proteína Pgh1, um análogo das glicoproteínas superexpressas nessas células. As proteínas Pgh1 funcionam como bombas que expõem fármacos citotóxicos na membrana do vacúolo digestivo de *P. falciparum* (Le Bras & Durand, 2003).

Os mecanismos de geração de cepas de *P. falciparum* resistentes à CQ envolvem a seleção de formas com mutações em genes que alteram o transporte e acúmulo da CQ no vacúolo digestivo do parasito em função de modificações fisiológicas neste espaço celular (Fidock et al, 2000; Cooper et al, 2002; Sidhu et al, 2002; Cooper et al, 2007; Roepe, 2011). Há vários mecanismos propostos para a resistência de *P. falciparum* à CQ: (i) absorção ou efluxo da CQ alterados na membrana citoplasmática do parasito, (ii) fluxo de H⁺ ou absorção da CQ alterados na membrana do vacúolo digestivo, e (iii) acesso reduzido da CQ à hematina (Fidock et al, 2000). As moléculas envolvidas nesses processos incluem P-glicoproteínas, um regulador de canais de cloro, um canal de Na⁺/H⁺, uma bomba de H⁺ no vacúolo digestivo e um fator que reduza o acesso da CQ à hematina ou uma molécula relacionada à detoxificação do heme (Martin et al, 1987; Martiney et al, 1995; Bray et al, 1998; Ginsburg et al, 1998; Wunsch et al, 1998).

O acúmulo de CQ no vacúolo digestivo do parasito apresenta especificidade relacionada à estrutura básica das 4-aminoquinolinas, o que sugere a participação de um transportador/permease (Sanchez et al, 1997) ou de um mecanismo que altere a ligação da CQ com a hematina no vacúolo digestivo (Bray et al, 1998). O gene *PfCRT*, localizado no cromossomo 7, codifica uma proteína transmembrana localizada na membrana no vacúolo digestivo de *P. falciparum* (Wellems & Plowe, 2001) e cujo conjunto de mutações é encontrado em todos os isolados naturais que se apresentam refratários à CQ (Djimé et al, 2001), bem como em isolados cultivados *in vitro* com fenótipo CQ-resistente (Durand et al, 2001).

O desenvolvimento de resistência à atovaquona envolve mutações no gene que codifica o citocromo b (Fivelman et al, 2002; Färnert et al, 2002) com alterações situadas nas sequências Q₀ e Q₁ desta proteína, alvo deste antimalárico (Vaidya & Mather, 2000). As mutações encontram-se numa região de 15 aminoácidos que circunda uma sequência

altamente conservada do citocromo b. As alterações nos aminoácidos afetam a hidrofobicidade e o volume da cadeia lateral de aminoácidos, variações que influenciam a afinidade de ligação da atovaquona com o complexo bc1 (Srivastava et al, 1999).

A resistência à artemisinina (ART) está associada a mutações no cromossomo 13, o qual codifica uma proteína kelch denominada K13, envolvida em interações proteína-proteína, com regiões de sequências repetidas de aminoácidos, cada uma formando uma lâmina de hélice (*propeller blade*) (Plowe, 2014). Estudos recentes demonstraram que polimorfismos na hélice de K13 podem ser utilizados como marcadores de resistência, visto que são encontrados em parasitos de eliminação lenta após tratamento com ART (Ariey et al, 2014). Além disso, essas mutações de fato conferem resistência à ART em isolados de *P. falciparum* (Straimer et al, 2015).

1.7 Atividade citostática versus citocida dos antimaláricos

A atividade citostática de um fármaco se refere à sua capacidade em reduzir a taxa de crescimento celular ou comprometer a divisão celular, ao ponto em que a proliferação da população microbiana seja reduzida. Essa atividade é representada pelo valor de IC₅₀, ou seja, concentração na qual o crescimento da população é inibido em 50%. A atividade citocida é designada pela capacidade de um fármaco em efetivamente matar a célula e é representada pelo valor de LD₅₀, a concentração que mata 50% da população.

Alguns fármacos são citostáticos e citocidas, como a CQ (Young & Rathod, 1993; Gligorijevic et al, 2008; Paguio et al, 2011). O valor do IC₅₀ deste antimalárico contra parasitos de cultivo é 1000 vezes inferior aos seus níveis no plasma de pacientes infectados (Hodel et al, 2009). Essa disparidade pode superestimar a atividade citocida da CQ e subestimar o potencial de sobrevivência do parasito na presena de concentrações mais altas deste fármaco (Gaviria et al, 2013).

A resistência à CQ tem sido caracterizada a partir de ensaios biológicos que refletem sua atividade citostática, uma caracterização incompleta sob o aspecto citocida (Paguio et al, 2011), cuja importância se dá no fato de que a sobrevivência do parasito determina a adaptação à seleção exercida pelo fármaco. Considerando pacientes infectados, é possível traçar o seguinte paralelo: quando infectados com parasitos sensíveis CQ, a parasitemia é reduzida em mais de 100 vezes após a administração desse fármaco. Essa terapia tem efeito citostático e citocida, impedindo o crescimento dos parasitos e também os eliminando. Em um paciente infectado com parasitos resistentes CQ, o mesmo não ocorre, visto que os parasitos

são resistentes aos efeitos citocidas deste antimalárico (Paguio et al, 2011), o que pode comprometer o controle da doença por favorecer a disseminação de parasitos resistentes. Essa distinção tem sido evidenciada em estudos envolvendo a CQ e outras quinolinas, visto que elas compõem a família química de antimaláricos mais amplamente utilizada (Kaur et al, 2010). Esses estudos demonstraram que os alvos e a resistência a essas duas vertentes de atividade farmacológica parecem ser distintos, visto que as atividades citocida e citostática de análogos de CQ, contra cepas sensíveis ou resistentes a ela, apresentaram correlações distintas com a inibição da formação de hemozoína causada pelos mesmos (Paguio et al, 2011, Gorka et al 2013a; Gorka et al, 2013b).

Dada a resistência disseminada dos parasitos aos antimaláricos comumente utilizados, especialmente CQ, novos antimaláricos com maior potencial citocida seriam ideais por efetivamente eliminarem os parasitos ao invés de apenas inibirem seu crescimento. Fica evidenciada, portanto, a necessidade de novos fármacos com base no somente no estudo dos efeitos dos mesmos sobre a inibição do crescimento do parasito (atividade citostática), como também sobre a indução de morte celular (atividade citocida), especialmente no caso de parasitos resistentes, hoje amplamente disseminados.

1.8 Estratégias na busca de novos antimaláricos

A síntese de novas moléculas com base em modificações químicas de antimaláricos existentes constitui uma estratégia promissora na busca de novos tratamentos, fornecendo potentes protótipos como ferroquina, um ferroceno análogo da cloroquina (Delhaes et al, 2002) e OZ439, ozonídeo derivado da artemisinina (Charman et al, 2011). Modificações estruturais na cadeia lateral na CQ originaram compostos com resistência cruzada diminuída (Stocks et al, 2002) e diversos níveis de lipofilia, os quais alteraram sua relação estrutura-atividade (Hocart et al, 2011; Casagrande et al, 2012; Solomon et al, 2007; Kouznetsov & Gómez-Barrio, 2009). Modificações estruturais em análogos da CQ, com cadeias laterais contendo alquildiaminas, produziram compostos intensamente ativos contra cepas de *P. falciparum* resistentes e sensíveis à CQ (De et al, 1996; Ridley et al, 1996; Solomon et al, 2007; Šolaja et al, 2008) e reduzida resistência cruzada (Stocks et al, 2002), exibindo diferentes relações estrutura-atividade (Solomon et al, 2005; Cunico et al, 2006; Madrid et al, 2004). Além disso, em derivados da amodiaquina, uma outra aminoquinolina, o número de carbonos entre os dois nitrogênios na cadeia lateral influenciou a atividade contra *P. falciparum* CQ-R (De et al, 1998).

Produtos naturais tem despertado o interesse da indústria farmacêutica em função da diversidade estrutural e das suas variadas atividades farmacológicas, aspectos que levaram ao desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de parasitoses (Tagboto et al, 2001; Ojima et al, 2008). Farmacóforos derivados de produtos naturais são excelentes candidatos a moléculas para bibliotecas biologicamente relevantes (Horton et al, 2003).

2 JUSTIFICATIVA

A malária é uma doença que provoca pobreza, impedindo o crescimento econômico em função das intensas morbidade e mortalidade consequentes, afetando a expectativa de vida nos países endêmicos. Além de reduzir drasticamente a renda *per capita*, a doença acarreta grandiosos dispêndios financeiros para o país acometido. Desta forma, os impactos sociais e econômicos acarretados pela malária posicionam seu controle como prioridade no planejamento da OMS (Roll Back Malaria Partnership, 2008), cujo sucesso é comprometido pela resistência de *P. falciparum* aos antimaláricos, inclusive aos derivados de artemisinina no Sudeste Asiático (Dondorp et al, 2009; Phyo et al 2012; Miotto et al, 2013). Ocorre ainda reduzida sensibilidade dos parasitos na África (Ashley et al, 2014a) e resistência de *P. vivax* à cloroquina (Price et al, 2009; Graf et al, 2012; Marques et al, 2014), sendo imperativa a busca por novos antimaláricos, já que nenhum novo fármaco foi disponibilizado comercialmente desde 1996 (Ekland & Fidock, 2008).

A CQ foi o antimalárico mais amplamente usado no controle da malária (WHO, 2010a) pelo seu baixo custo – a 21 centavos de dólar por um tratamento completo (WHO, 2010c), alta eficácia e baixa toxicidade. Seus análogos representam uma alternativa promissora para o controle da doença, sobretudo considerando a volta da sensibilidade de *P. falciparum* à CQ em algumas áreas da África (Frosch et al, 2014), região com maior número de mortes por malária.

Metais têm sido utilizados para intensificar a eficácia de quinolinas, fornecendo protótipos antimaláricos ativos contra parasitos de *P. falciparum* resistentes à CQ (Rajapakse et al, 2009; Glans et al, 2011; Glans et al, 2012) tais como alguns complexos de antimaláricos com platina, os quais demonstraram maior atividade antiplasmodial do que a CQ (Ajibade & Kolawole, 2008). O sucesso dessa estratégia é representado pela ferroquina, ferroceno análogo da CQ em fase II de testes clínicos, sintetizada com o intuito de contornar o problema da resistência de *P. falciparum* a partir da introdução de um metal coordenado em sua estrutura (Dive & Biot, 2008).

A existência de alvos antimaláricos validados, tais como a mitocôndria, com interferência na síntese de pirimidinas do parasito de forma específica (Vaidya et al, 1993), é interessante por fornecer alternativas quimioterápicas para a atovaquona. Este antimalárico apresenta baixa biodisponibilidade (Dressman & Reppas, 2000) e resistência já relatada (Vaidya & Mather 2000, Fivelman et al. 2002), problema contornável através de modificações estruturais no grupo alquil desta molécula (Fieser et al, 1948; Danoun et al, 1999; El Hage et

al, 2009; Hughes et al, 2011). Além disso, a combinação da atovaquona com proguanil, sob o nome comercial de Malarone[®], utilizada na profilaxia (McKeage & Scott, 2003) e tratamento da malária em áreas onde ocorre resistência de *P. falciparum* (WHO, 2012b), não é amplamente empregada devido ao seu alto custo (Nilsen et al, 2013). Faz-se portanto necessária a busca por novos substitutos, os quais podem ter produtos naturais como fonte.

O melhor exemplo de sucesso da utilização de produtos naturais como fonte de novos fármacos é o da quinina, isolada inicialmente de espécies de *Cinchona*, e base para síntese da cloroquina e mefloquina (Buss & Waigh, 1995). A artemisinina, também é extraída da planta *Artemisia annua*, compõe a base para produção dos seus derivados semissintéticos, última classe de antimaláricos a se tornar comercialmente disponível para a prática clínica. A própria atovaquona (Fry & Pudney, 1992) deriva do lapachol, extraído de plantas pertencentes ao gênero *Tabebuia* spp. As fenazinas, com atividade experimental antimicrobial (Van Rensburg et al, 1999), antiviral (Wang et al, 2000) e antimalárica (Makgatho et al, 2000; Andrade-Neto et al, 2004a) compõem outro grupo de moléculas produzidas a partir do lapachol.

Considerando a necessidade de novos antimaláricos e o potencial da síntese química em fornecer potentes protótipos após modificações estruturais, foram obtidos análogos da cloroquina (AnCQ) com variações na extensão da cadeia lateral e presença de um ou dois alcinos terminais, bem como complexos de platina (AnCQPt), ativos *in vivo* contra malária causada por *P. berghei* em camundongos (de Souza et al, 2011). Compostos naftoquinoidais incluindo naftoquinonas provenientes de modificações estruturais na cadeia lateral alquil atovaquona, bem como compostos naftoquinoidais, incluindo fenazinas, obtidos a partir do lapachol, também foram sintetizados. Esses compostos foram avaliados quanto à sua citotoxicidade, atividade anti-*P. falciparum in vitro* e na malária pelo *P. berghei* em camundongos.

Os AnCQ com maior atividade específica, representada por alto índice terapêutico ou de seletividade, foram avaliados quanto (i) ao modo de ação clássico proposto para as 4-aminoquinolinas: a inibição da formação de β -hematina *in vitro*; (ii) capacidade de promover efeitos citostático e citocida contra *P. falciparum in vitro*. A inibição da PfLDH também foi avaliado como um outro possível modo de ação, com base na demonstração de que análogos da CQ interagem de modo específico (Foley et al, 1994) com essa enzima (Menting et al, 1997) e na evidência cristalográfica da fraca inibição dela pela CQ apontando para a participação deste mecanismo na eficácia do fármaco (Read et al, 1999). Os AnCQ complexados com platina (AnCQPt) foram avaliados quanto à sua citotoxicidade e atividade anti-*P. falciparum in vitro*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial terapêutico antiplasmodial de análogos da cloroquina e naftoquinonas obtidas a partir de modificações estruturais na cloroquina e atovaquona, respectivamente, bem como de compostos naftoquinoidais incluindo fenazinas sintetizados a partir do lapachol.

3.2 Objetivos específicos

3.1.1- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* dos compostos contra linhagens celulares neoplásica ou normal;

3.1.2- Avaliar a atividade esquizonticida sanguínea contra *P.falciparum in vitro* dos compostos;

3.1.3- Avaliar a atividade esquizonticida sanguínea dos compostos na malária causada por *P.berghei* em camundongos;

3.1.4- Avaliar modos de ação dos AnCQ.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comitê de ética para o uso de animais de experimentação

Os protocolos para uso de animais de laboratório foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA LW-23/13), pela Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ.

Para os testes de esquizotomicidas sanguíneos contra a malária pelo *P. berghei*, foram utilizados camundongos suíços albinos fêmeas pesando 20 ± 2 g, provenientes do biotério de produção do Centro de Pesquisas René Rachou, mantidos em micro-isoladores (Alesco) com água e ração para roedores (Nuvilab[®] CR1 autoclavável) *ad libitum*.

4.2 Moléculas avaliadas

Os análogos de cloroquina (AnCQ) foram sintetizados no Núcleo de Pesquisas Químicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, pelo grupo do Dr. Adilson David da Silva, utilizando métodos já publicados (Carmo et al, 2011).

Os compostos naftoquinoidais foram sintetizados no Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais pelo grupo do Dr. Eufrânio da Silva Júnior utilizando métodos já publicados (da Silva Júnior et al, 2012).

Soluções-estoque dos compostos, solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 10 mg/mL, foram mantidas a -20°C . As concentrações finais de DMSO atingiram o máximo de 0,02% nos testes *in vitro* e 5% nos testes *in vivo*. A CQ foi diluída em RPMI.

4.3 Cultivo de linhagens de hepatoma humano (HepG2) e de células renais de macaco verde (BGM)

A linhagem celular HepG2 A16, derivada de um hepatoblastoma primário humano (Calvocalle et al, 1994), foi originalmente cedida pelo Dr. Virgílio E. do Rosário, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa. As células de rim de macaco verde, linhagem BGM, foram doadas pela Universidade Federal de Minas Gerais. As células foram cultivadas em meio RPMI, suplementado com 5% de Soro bovino fetal (SBF) e 40 mg/L de gentamicina (meio completo), em garrafas de cultura 75 cm² mantidas em estufa de CO₂ a 37°C. O meio foi substituído a cada 3 dias. Após confluência de 80%, a cultura era repicada ou utilizada nos ensaios de citotoxicidade.

4.4 Ensaios de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados de acordo com Madureira et al (2002). As células foram destacadas das garrafas utilizando 1 mL de tripsina 0,25%-EDTA (Sigma), incubadas a 37°C por 5 min, ressuspensas em 10 mL de meio completo, centrifugadas a 320 x g por 5 min e ressuspensas em meio completo. As células foram distribuídas em microplacas de 96 poços (4x10⁵ células/100 µL por poço), incubadas em estufa de CO₂ a 37°C por 24 h para adesão, sendo então adicionados 20 µL/poço de meio completo contendo diferentes concentrações dos compostos testados em triplicata. Após nova incubação de 24 h, foram adicionados 20 µL/poço de uma solução brometo 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma), um sal tetrazólico, diluído em RPMI (5 mg/mL) (Denizot e Lang, 1986); ou 200 µL de solução de vermelho neutro (100 mg/mL) (Borenfreund et al, 1987), após o descarte do sobrenadante dos poços. Após 3 h de incubação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado formado foi diluído em DMSO no volume de 100 µL/poço no caso do teste de MTT; ou 200 µL de uma solução de formaldeído (0,5% v/v) e CaCl₂ (1%) por 5 min, seguido de descarte do sobrenadante e adição de 200µL de uma solução álcool-ácido. As microplacas foram lidas em espectrofotômetro a 570 nm (células) e 630 nm (background, caso as moléculas apresentassem cor) para o teste de MTT e 540 nm para o teste de vermelho neutro. A concentração letal mínima que inibe em 50% o crescimento das células (MCL₅₀) na presença dos compostos-teste e de antimaláricos-controle foi determinada em comparação com células na ausência de compostos (representativas de 100% de crescimento), através de curvas concentração-resposta geradas pelo programa Origin® Versão 8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA)

4.5 Cultivo das fases eritrocitárias de *P. falciparum* e testes de atividade *in vitro*

Os parasitos do clone W2 (cloroquina-resistente) (Oduola et al, 1988) e cepa 3D7 (cloroquina-sensível), originalmente recebidos da New York University Medical School, foram cultivados em hemácias humanas (hematócrito a 5%) *in vitro* de acordo com Trager & Jensen (1976), com pequenas modificações (Carvalho et al, 1990; Andrade-Neto et al, 2004b). Os parasitos foram cultivados em placas de Petri usando meio de cultivo completo (RPMI 1640 suplementado com 25 mM de HEPES, 21 mM de bicarbonato de sódio, 300 µM de hipoxantina, 11 mM de glicose, 40µg/mL de gentamicina) e 10% (v/v) de soro humano. As placas foram mantidas a 37°C em dessecadores onde a combustão de uma vela fornecia a

concentração adequada de O₂. A parasitemia foi determinada diariamente por meio de esfregaços corados com Giemsa e observados sob microscópio óptico (1000x).

Os cultivos com predomínio de anéis, utilizados nos ensaios de quimioterapia, foram sincronizados conforme descrito por Lambros & Vanderberg (1979). Resumidamente, o meio de cultura foi retirado da placa de Petri e 10 mL de uma solução de sorbitol 5% e glicose 0,5% foram adicionados ao sedimento contendo o sangue parasitado. O conteúdo foi transferido para um tubo tipo Falcon de 15 mL, incubado a 37°C por 10 min e centrifugado por 5 min, 70 x g à temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspendido com meio RPMI completo, ajustando o hematócrito para 5%. Essa solução foi novamente transferida para uma placa de Petri, e deixada em repouso por aproximadamente 10 min para que as hemácias sedimentassem, quando foi realizado esfregaço para determinação da parasitemia. O hematócrito e a parasitemia foram ajustados com a adição de hemácias e meio RPMI completo em quantidades adequadas para o teste.

Esfregaços sanguíneos de cultivos de *P. falciparum*, secos ao ar e fixados com metanol, foram corados com solução de Giemsa na proporção de quatro gotas por mL de solução salina tamponada pH 6,8. Após 10 minutos, as lâminas foram lavadas em água corrente, secas ao ar e examinadas ao microscópio óptico com objetiva de imersão (1000x). A parasitemia foi determinada pela estimativa do número total de hemácias por campo microscópico sendo contados os parasitos em 50 a 100 campos; e expressa em porcentagem de hemácias parasitadas.

O teste imunoenzimático anti-HRP-II foi realizado conforme descrito em Noedl et al (2002). Resumidamente, os compostos foram previamente diluídos em placas de 96 poços (diluição seriada 1:2, volume final de 20 µL) e incubados com parasitos (hematócrito de 1,5% e parasitemia de 0,05%) sincronizados. Na primeira linha foram colocadas apenas hemácias infectadas (controle). Após incubação por 24 h a 37°C, o conteúdo dos seis poços do controle negativo (background) foi retirado e congelado e a placa-teste foi re-incubada por adicionais 48h a 37°C em atmosfera de 5% O₂/5% CO₂/90% N₂. A placa e o background foram congelados e descongelados duas vezes para promover a lise das hemácias. Uma nova placa (Maxysorp, Nunc, Denmark), pré-sensibilizada com o anticorpo monoclonal primário anti-HRP-II (MPFM-55A ICLLAB®, EUA) na concentração de 1,0 µg/mL, mantida overnight a 4°C, teve o conteúdo dos poços descartado e 200 µL/poço de solução de bloqueio (PBS-BSA 2%) foram adicionados. Após 2 h de incubação à temperatura ambiente, o conteúdo dos poços foi descartado e a placa lavada três vezes com PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T), sendo adicionados 100 µL/poço da cultura de *P. falciparum* hemolisada, assim como 100 µL/poço

do background hemolisado. A placa foi incubada 1 h à temperatura ambiente, em câmara úmida, lavada três vezes com PBS-T, seguido da adição de 100 µL/poço do anticorpo monoclonal secundário (MPFG55P ICLLAB®, EUA), diluído 5.000 vezes, e incubação em câmara úmida por 1 h a temperatura ambiente. A placa foi lavada três vezes com PBS-T, 100 µL/poço de TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) foram adicionados, seguido de incubação por 5 a 10 min a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com solução de ácido sulfúrico 1M (50 µL/poço) e a leitura das absorbâncias realizada imediatamente a 450 nm em um espectrofotômetro (Spectra Max 340PC384, Molecular Devices).

A concentração que inibe o crescimento dos parasitos em 50% (IC₅₀) *in vitro* foi determinada através de curvas concentração-resposta, utilizando o programa Origin® Versão 8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA). De dois a quatro experimentos independentes foram realizados, com os compostos-teste avaliados em triplicata. As moléculas foram consideradas ativas com IC₅₀ ≤ 2 µM. A razão entre a citotoxicidade (MCL₅₀) e atividade (IC₅₀) dos compostos-teste permitiu o cálculo do Índice de Seletividade (IS) contra *P. falciparum in vitro*. Valores de IS iguais ou menores que dez foram considerados indicativos de toxicidade (Bézivin et al, 2003).

Para a avaliação das atividades citocida e citostática anti-*P. falciparum* dos AnCQs, os experimentos foram realizados de acordo com Paguio et al (2011). Soluções-estoque foram preparadas diluindo os AnCQs em DMSO. Diluições seriadas foram realizadas em meio completo e alíquotas de 100 µL foram transferidas para placas de 96 poços com fundo em U. Após adição dos parasitos (2% de parasitemia e 2% de hematócrito, 100 µL), as placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% O₂/5% CO₂/90% N₂. Para o teste citocida, após 6 h de incubação, as placas foram lavadas três vezes (700 x g por 3 min) para remover o meio contendo os AnCQs. O sedimento foi ressuscitado em 200 µL de meio completo e a placa foi reincubada por pelo menos 48h. O teste citostático foi realizado em paralelo, no qual os parasitos foram mantidos em contato contínuo com os AnCQs em concentração pelo menos 20 vezes menor que as utilizadas no teste citocida. Esta placa também foi incubada por 48 h a 50 h.

Finalizado o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 700 x g por 5 min a temperatura ambiente para remoção do meio, lavadas com PBS 1X e incubadas por 30 min com solução de tampão de lise [2,4228 g de TRIS ultra puro (para solução de 20 mM), pH 7.5; 1,8612 g de EDTA 5 mM ultra puro (para solução de 5 mM); 80 µg de Saponina (0,008% p/v); 800 µL de Triton X-100 (0,08% v/v); água Tipo I] e SYBR Safe DNA stain (1:5000). A

fluorescência de hemácias não infectadas foi considerada como background. A fluorescência foi medida em fluorímetro (Synergy H4, Biotek) a 485/535 nm.

As atividades citocida ou CL_{50} (concentração que mata 50% dos parasitos) e citostática ou CI_{50} (concentração que inibe em 50% o crescimento dos parasitos) foram determinadas pela comparação entre o crescimento dos parasitos na ausência dos compostos-teste, considerado representativo de 100% de crescimento, com o crescimento na presença dos compostos-teste. Curvas dose-resposta foram geradas utilizando o programa Microcal Origin Software 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA), possibilitando a determinação dos valores de CL_{50} e CI_{50} para cada composto-teste. A cloroquina foi utilizada como controle em ambos os testes. Com esses valores, foi calculado também o índice de resistência (IR), razão do CL_{50} ou CI_{50} entre parasitos resistentes (clone W2) e sensíveis (cepa 3D7) à cloroquina.

4.6 Testes de atividade esquizonticida sanguínea em camundongos

Camundongos Suíços Webster fêmeas, pesando 20 ± 2 g, inoculados com hemácias infectadas com *P. berghei* cepa NK65, originalmente recebida da New York University Medical School, EUA, e mantida por passagens sucessivas, foram utilizados no teste supressivo (Peters et al, 1975) modificado (Carvalho et al, 1990). Cada camundongo foi inoculado com 1×10^6 hemácias parasitadas, via intraperitoneal, (0,2 mL por animal). Duas a 24 h após a inoculação, os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de 3 a 5 camundongos por gaiola. Em cada experimento foram usados dois grupos controles, um não tratado e outro tratado com cloroquina. O tratamento foi feito diariamente durante 3 ou 4 dias por via oral e a parasitemia foi avaliada em esfregaços sanguíneos coletados nos dias 5, 7 e/ou 9 após a inoculação dos animais, fixados com metanol e corados com Giemsa. A parasitemia foi contada ao microscópio óptico (objetiva de imersão) e sua redução foi calculada em relação ao grupo-controle não tratado.

Em alguns experimentos foi usada uma cepa CQ-R de *P. berghei* NK65 selecionada pela administração de CQ em doses crescentes até a dose máxima tolerada pelo camundongo de 150 mg/Kg (Krettli et al, 1969). Essa cepa foi mantida a -70°C , descongelada e mantida em camundongos sob pressão constante do fármaco (CQ 150 mg/Kg). Os camundongos apresentando parasitemia após tratamento com CQ a 150 mg/Kg foram usados para os experimentos. Novos camundongos receberam por via intraperitoneal inóculo de 10^7 hemácias parasitadas usando camundongos doadores de parasitos resistentes à dose de 150 mg/Kg de CQ. Grupos de 5 camundongos foram tratados por via oral com os AnCQ nas doses

de 25 ou 50mg/Kg durante 3 dias consecutivos. Dois grupos controle foram utilizados: um tratado apenas com o veículo (sem os compostos) e outro tratado com 150 mg/Kg de CQ. A inibição da parasitemia foi avaliada nos dias 5, 7 e/ou 9 após a inoculação dos animais. Compostos foram considerados ativos ao inibirem a parasitemia em mais de 40% em relação ao grupo controle não tratado com os compostos, o qual recebera apenas veículo.

5 RESULTADOS

Os resultados relativos aos AnCQs e aos compostos naftoquinoidais serão apresentados na forma de artigos publicados. Os resultados relativos à atividade citocida e cistostática de AnCQs serão apresentados na forma de artigo em preparação.

5.1 Artigo 1: Análogos de Cloroquina

de Souza et al. *Malaria Journal* 2014, **13**:469
<http://www.malariajournal.com/content/13/1/469>



RESEARCH

Open Access

Antiplasmodial activity of chloroquine analogs against chloroquine-resistant parasites, docking studies and mechanisms of drug action

Nicolli B de Souza¹, Arturene ML Carmo², Adilson D da Silva², Tanos CC França³ and Antoniana U Krettli^{1*}

Abstract

Background: Given the threat of resistance of human malaria parasites, including to artemisinin derivatives, new agents are needed. Chloroquine (CQ) has been the most widely used anti-malarial, and new analogs (CQAn) presenting alkynes and side chain variations with high antiplasmodial activity were evaluated.

Methods: Six diaminealkyne and diaminedialkyne CQAn were evaluated against CQ-resistant (CQ-R) (W2) and CQ-sensitive (CQ-S) (3D7) *Plasmodium falciparum* parasites in culture. Drug cytotoxicity to a human hepatoma cell line (HepG2) evaluated, allowed to calculate the drug selectivity index (SI), a ratio of drug toxicity to activity *in vitro*. The CQAn were re-evaluated against CQ-resistant and -sensitive *P. berghei* parasites in mice using the suppressive test. Docking studies with the CQAn and the human (Hs)LDH or plasmodial lactate dehydrogenase (PfLDH) enzymes, and, a β -haematin formation assay were performed using a lipid as a catalyst to promote crystallization *in vitro*.

Results: All tested CQAn were highly active against CQ-R *P. falciparum* parasites, exhibiting half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values below 1 μ M. CQAn33 and CQAn37 had the highest SIs. Docking studies revealed the best conformation of CQAn33 inside the binding pocket of PfLDH; specificity between the residues involved in H-bonds of the PfLDH with CQAn37. CQAn33 and CQAn37 were also shown to be weak inhibitors of PfLDH. CQAn33 and CQAn37 inhibited β -haematin formation with either a similar or a 2-fold higher IC₅₀ value, respectively, compared with CQ. CQAn37 was active in mice with *P. berghei*, reducing parasitaemia by 100%. CQAn33, -39 and -45 also inhibited CQ-resistant *P. berghei* parasites in mice, whereas high doses of CQ were inactive.

Conclusions: The presence of an alkyne group and the size of the side chain affected anti-*P. falciparum* activity *in vitro*. Docking studies suggested a mechanism of action other than PfLDH inhibition. The β -haematin assay suggested the presence of an additional mechanism of action of CQAn33 and CQAn37. Tests with CQAn34, CQAn37, CQAn39 and CQAn45 confirmed previous results against *P. berghei* malaria in mice, and CQAn33, 39 and 45 were active against CQ-resistant parasites, but CQAn28 and CQAn34 were not. The result likely reflects structure-activity relationships related to the resistant phenotype.

Keywords: Malaria, Chloroquine analogs, Diaminealkyne, Diaminedialkyne, *P. falciparum*, Lactate-dehydrogenase enzyme, Docking

* Correspondence: akrettli@cpqrr.fiocruz.br

¹Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ Minas, Av. Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte 30190-002, MG, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 de Souza et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Malaria remains a major public health problem, resulting in 207 million cases and 627,000 deaths worldwide in 2012 [1]. There is no available vaccine, and the control of the disease relies on the use of bed nets, other individual protection against mosquito bites, and the successful drug treatment of infected patients [2]. Presently, chemotherapy has been hampered by the low sensitivity of the parasite to most available anti-malarial drugs [3], including artemisinin derivatives [4-6]. Resistance to chloroquine, in the case of *P. falciparum*, is linked to mutations in the *P. falciparum* chloroquine resistance transporter (*pfcr*) gene, which alters the transport and accumulation of the drug in the digestive vacuole (DV) of the parasite [7,8]. *Plasmodium vivax* resistance to CQ has been described [9,10] and seems related to the intense malaria morbidity in the Amazon region [11]. However, neither CQ-R nor mutation markers were detected among *P. vivax* in recent studies of 47 isolates from the West Amazon, all from patients with non-severe malaria [12].

Chemical modifications of CQ have been used as a powerful strategy to find new anti-*P. falciparum* agents effective against drug-resistant parasites [13,14]. Structural modifications of the alkyldiamine side chains have provided rather active compounds with decreased cross-resistance to CQ [15] and with different structure-activity relationships [16-18]. In the present work, six CQ analogs (CQAns) that reduced parasitaemia in *P. berghei*-infected mice [19], comprising diaminealkynes and diaminedialkynes, were evaluated *in vitro* against CQ-R (W2 clone) and CQ-S (3D7 strain) forms of *P. falciparum* parasites in cultures. These CQAns were then reevaluated in mice with CQ-sensitive or CQ-resistant *P. berghei* parasites. The compounds with the best selectivity index, based on drug cytotoxicity and activity *in vitro*, were evaluated for the inhibition of β -hematin formation. To clarify the possible mechanism of action of the CQAns evaluated herein, docking studies were also performed based on interactions between the CQAns and the plasmodial lactate dehydrogenase (*PfLDH*) enzyme, a known target of 4-aminoquinolines [20,21].

Methods

Synthesis of the molecules

Drug synthesis was performed as previously reported by Da Silva et al. [22]. In brief, 4-alkyldiamino-7-chloroquinolines were treated with 2 eq. of propargyl bromide and K_2CO_3 in EtOH at 0°C for 72 h to produce the compounds CQAn28, CQAn33, and CQAn34 at a 50% to 60% yield. The addition of 4 eq. of propargyl bromide under the same conditions led to the production of the compounds CQAn37, CQAn39, and CQAn45 at a 50% to 60% yield (Figure 1). All the compounds were characterized via one-dimensional nuclear magnetic resonance

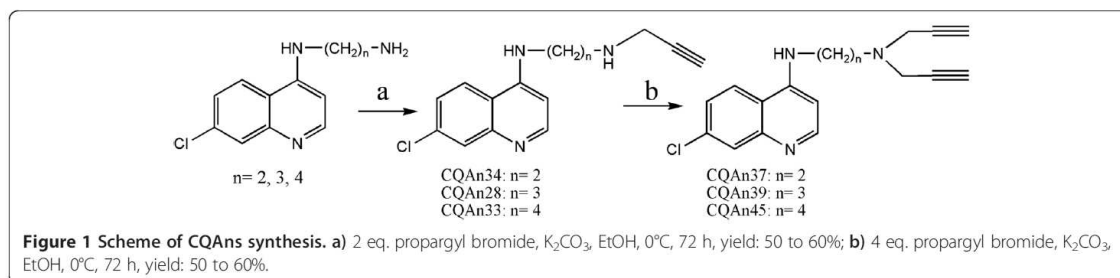
(1D-NMR), infrared (IR) spectroscopy, and melting point (MP) assays, and the results were in accordance with data in the literature [22].

Cytotoxicity tests *in vitro*

A human hepatoma cell line (HepG2), originally received from the University of Lisbon as a kind gift, was cultured as described [23]. The cells were maintained in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, ref 6504) supplemented with 40 mg/L gentamicin and 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS), and they were maintained in a 5% CO_2 atmosphere at 37°C. When confluent, the cell monolayer was trypsinized, washed with culture medium supplemented with 10% FCS, counted, diluted (5×10^3 cells/well), placed in flat-bottom 96-well plates (Corning, Santa Clara, CA, USA), and incubated for 18 h at 37°C to allow cell adhesion. The compounds were added to the plates at concentrations up to 1,700 μ M, followed by incubation for an additional 24 h, after which 20 μ L (5 μ g/mL) of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution was added per well to evaluate drug cytotoxicity. After 3 h, the supernatant was discarded, 100 μ L of dimethyl sulphoxide (DMSO) was added per well, and the optical density was measured (SpectraMax340PC384, Molecular Devices) at 570 nm (test) and 630 nm (background). Cell viability was expressed as the percentage of the absorbance compared to the absorbance of the untreated cells and subtracted from the appropriate background measurement. The lethal drug dose for 50% of the cells (MLD_{50}) was determined as described [24] and was used to calculate the SI of the active compounds, a ratio of the *in vitro* cell toxicity and activity against *P. falciparum* (MLD_{50}/IC_{50}).

Continuous cultures of *P. falciparum*

CQ-R *P. falciparum* parasites (W2 clone) [25] and CQ-S (3D7 strain), originally received from New York University Medical School, were maintained in continuous culture at 37°C in human erythrocytes (A^+) using complete medium (RPMI 1640 supplemented with 10% blood group A^+ human serum) changed daily [26]. Before tests with the molecules were performed, ring stage parasites were synchronized using sorbitol [27] and the parasitaemia and haematocrit were adjusted; 180 μ L/well was added to 96-well microtiter plates (Corning, Santa Clara, CA, USA) containing the diluted compounds tested in triplicate. Drug activity was evaluated in relation to control cultures with no drugs [28] and was measured using the anti-histidine-rich protein II (HRPII) test as described [29]. CQ was used in each test as a control, and two to four experiments were performed for each parasite strain.



In vitro tests of drug activity

The anti-HRP-II test was performed using *P. falciparum* cultures adjusted for 0.05% parasitaemia and 1.5% haematocrit. The cultures were added to plates containing the diluted drugs, followed by incubation for 24 h under standard culture conditions [26]. The contents of six wells with no drugs were harvested in each test plate, pooled in microtubes, and frozen for later use to measure the background parasite growth as described [29]. After a 48 h incubation, the plates were frozen and thawed twice, and 100 μL of lysed cells from each well was added to a plate that had been pre-coated overnight at $4^\circ C$ with a primary anti-HRP-II monoclonal antibody (MPFM-55A ICCLAB[®], USA) for an immunoassay. Phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween and 4% bovine serum albumin was used for plate blocking (3 h at room temperature) to avoid nonspecific antibody binding. After 1 h at room temperature, the plate was washed, and 100 μL /well of a secondary antibody solution (MPFG-55P ICCLAB[®], USA) was added, followed by incubation with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) chromogen (KPL, Gaithersburg, MD, USA) in the dark. The reaction was stopped using 1 M sulfuric acid, and the absorbance was read (450 nm) in a spectrophotometer (SpectraMax340PC³⁸⁴, Molecular Devices). The anti-*P. falciparum* drug activity was evaluated by comparing the parasite growth in the drug-free control cultures, considered 100% growth, with that in the drug test cultures. Using curve-fitting software (Microcal Origin Software 5.0, Inc.), a sigmoidal dose-response curve was generated, enabling the determination of drug IC_{50} values. CQAn presenting $IC_{50} \leq 1 \mu M$ were considered active; between 1–5 μM as partially active; and above 5 μM as inactive.

Protocol for animal use in the anti-malarial tests

The protocol for animal use was approved by the Ethics Committee for Animal Use (CEUA LW-23/13) of the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz). Only Swiss adult female mice (20 ± 2 g weight) were used; they were raised at the animal facilities at FIOCRUZ-Minas.

Anti-malarial tests against *P. berghei* in mice

The suppressive test was performed as described [30] using the *P. berghei* NK65 blood parasites, with some modifications [31]. Briefly, the blood parasites were maintained through weekly blood passages in mice. For the experiments, groups of 20–30 mice were inoculated with 1×10^5 infected erythrocytes. Approximately three hours later, they were randomly distributed into groups of five to six mice per cage, which were treated daily by gavage for four consecutive days. All the compounds were freshly diluted in 3% DMSO (Sigma-Aldrich) in RPMI medium and were administered orally at doses of 25 mg/kg or 50 mg/kg. The control mice received the drug vehicle. On days 5 and 7 after parasite inoculation, blood was taken from the tail of each mouse and used to prepare thin smears, which were methanol-fixed, Giemsa-stained and examined microscopically to determine parasitaemia. The inhibition of parasite growth was evaluated in relation to parasitaemia in the untreated mice, which were considered to have 100% parasite growth.

A *P. berghei* NK65 CQ-resistant strain maintained at $-70^\circ C$, selected by increasing doses of CQ, maintained in mice under constant drug pressure (CQ 150 mg/kg) [32] and stored at $-70^\circ C$ was also defrosted and used to inoculate mice. When parasitaemic, the drug-resistant parasites were subjected to serial blood passages maintained under CQ treatment with increasingly higher doses, up to 150 mg/kg, then used for the experiments. The mice were inoculated with 10^7 parasitized RBCs using blood parasites from a donor with parasites resistant to 150 mg/kg of CQ. Groups of five mice each were separated 24 h after the parasite inoculation, then treated orally with the test CQAn at doses of 25 or 50 mg/kg for three consecutive days. Two control groups were used in each experiment; one received CQ at 150 mg/kg and the other was infected but treated with vehicle only (no drugs). The inhibition of parasitaemia was evaluated as described for the mice inoculated with the CQ-sensitive parasites. A compound was considered active when it inhibited parasitaemia more than 40% in relation to the infected but vehicle-treated (no drugs) group.

Inhibition of β -haematin formation assay

The assay was performed using a lipid as a catalyst to promote crystallization [33]. Briefly, drug stock solutions were prepared in DMSO and were used at a final concentration of up to 30 mM. A haem stock (10 mM) was made in DMSO and was diluted to 50 μ M with 100 mM sodium acetate (pH 4.8). A 10 mM 1-monooleoyl-rac-glycerol (MOG) stock was made in ethanol and was sonicated before being added to a 50 μ M haem stock to make 25 μ M MOG–50 μ M haem in 100 mM sodium acetate (pH 4.8). The 25 μ M MOG–50 μ M haem solution was sonicated and added to the assay plate at 100 μ L/well. The plates were incubated at 37°C for 2 h to allow crystallization, followed by the addition of 100 μ l of 200 mM sodium bicarbonate (pH 9.1) to solubilize any remaining monomeric haem. After incubation for 30 min at room temperature, the amount of solubilized monomeric haem was determined by measuring the absorbance at 405 nm. Finally, 20 μ l of 1 M sodium hydroxide was added to the plates to dissolve any crystals that had been formed, and the absorbance was read at 405 nm to determine the total amount of haem present in each well. The inhibition of haem crystallization was determined as a function of the amount of monomeric haem that was not crystallized divided by the total amount of haem present in the assay mixture. The results are expressed as IC_{50} values based on the percentage inhibition of β -haematin formation by the CQAn.

Docking studies

The structures of the inhibitors studied were constructed and optimized with the program Spartan 08 [34] using the Merck Molecular Force Field (MMFF) method [35]. In addition, the partial charges were calculated by single-point energy calculations using the RM1 method [36]. The crystallographic structures of *Pf*LDH and *Hss*LDH were downloaded from the Protein Data Bank [37] under the codes 1LDG (resolution 1.74 Å and R factor = 0.197) and 1IOZ (resolution 2.10 Å and R factor = 0.179), respectively.

The program Molegro Virtual Docker® (MVD) [38] was used for the docking studies, and the methodology used was validated by re-docking. To observe possible interactions of the ligands with the solvent present in the crystal, 35 water molecules from a cavity approximately 10 Å in size were considered for the calculations with *Pf*LDH, whereas 54 molecules were considered for the calculations with *Hss*LDH. The docking region was restricted to a radius of 15 Å from the centre of the cavity inside each enzyme. The best ligand conformations inside the enzymes were chosen based on 100 runs for each ligand, and considering the superposition to the structure of NADH molecules present in the crystallographic structures combined with the best values for interaction energy,

and for the H-bonds with water molecules and the residues of the active sites.

The volumes of the cavities of the NADH-binding sites inside *Pf*LDH and *Hss*LDH were determined using MVD® [38].

Results

Anti-*P. falciparum* activity and selectivity indexes of CQAnS

All the CQAnS were active *in vitro* against CQ-R *P. falciparum* parasites, exhibiting half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values below 1 μ M; the most active molecule was CQAn33 (IC_{50} = 0.02 \pm 0.001 μ M). Tested against the CQ-S parasites in parallel, CQAn34 and CQAn37 were active; CQAn33, CQAn39 and CQAn45 were partially active; and CQAn28 was inactive (Table 1).

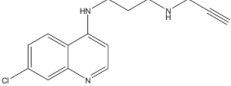
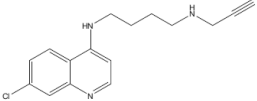
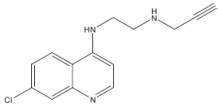
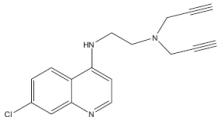
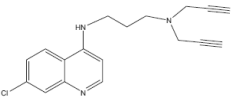
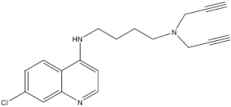
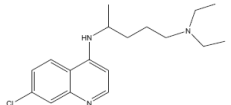
Most of the CQAnS were less toxic than CQ (MLD_{50} = 410.4 \pm 26.6 μ M), with MLD_{50} values ranging from 943 to 1699 μ M. The ratios of cytotoxicity to activity (selectivity index, SI) of compounds CQAn37, CQAn33, CQAn39, and CQAn34 were 24275, 7645, 5011, and 4101, respectively, considering the CQ-R parasites. For CQAn28 and CQAn45, the SI values were 2125 and 119, respectively; and for CQ, the SI was 1080. Using CQ-S *P. falciparum* parasites, none of the CQAnS showed an SI higher than CQ (SI = 5679). The highest SI values were exhibited by CQAn34 (SI = 3144) and CQAn37 (SI = 2981); all the other CQAnS had SI values below 1500 (Table 2).

Anti-*P. berghei* malaria activity of the CQAnS

All the compounds (CQAn28, CQAn33, CQAn34, CQAn37, CQAn39, and CQAn45) that were tested in mice with *P. berghei* caused between 73% and 100% inhibition of parasitaemia after treatment with a 25 mg/kg oral dose, compared with the untreated control group on day 5. On day 7, the parasitaemia inhibition reached 93% (Table 3). CQ, used as a control, inhibited parasitaemia by 100% and 97% on days 5 and 7, respectively. The 50 mg/kg dose of CQAn33, CQAn37 and CQ caused 100% inhibition of *P. berghei* parasitaemia on days 5 and 7 after infection. Two of the five mice receiving CQAn37 and all the mice receiving CQ survived the infection at least 30 days after the end of treatment; CQ cured the mice.

The CQAnS were evaluated against a CQ-resistant *P. berghei* strain (maintained by constant drug pressure at a dose of 150 mg/kg daily until the last passage before the test). The dose of 50 mg/kg was active for all the CQAnS on day 5. CQAn45 caused the highest parasitaemia reduction (63%), followed by CQAn39, CQAn33 and CQAn37, which reduced parasitaemia by 62%, 53% and 47%, respectively. CQAn28 and CQAn34 were inactive at 25 mg/kg. As expected, CQ at the highest tolerated dose of 150 mg/kg was inactive against the CQ-resistant *P. berghei* parasites in mice (Table 3).

Table 1 Activity of CQ and CQAn against *P. falciparum* (IC₅₀) CQ-R (W2) or CQ-S (3D7) parasites

| Molecule | Chemical structure | Anti- <i>P. falciparum</i> activity (IC ₅₀ in μM)* | |
|-------------|---|---|---------------|
| | | W2 (CQ-R) | 3D7 (CQ-S) |
| CQAn28 |  | 0.71 ± 0.03 | 14.87 ± 3.58 |
| CQAn33 |  | 0.02 ± 0.001 | 1.17 ± 0.10 |
| CQAn34 |  | 0.23 ± 0.15 | 0.3 ± 0.01 |
| CQAn37 |  | 0.07 ± 0.03 | 0.57 ± 0.24 |
| CQAn39 |  | 0.64 ± 0.29 | 2.39 ± 0.11 |
| CQAn45 |  | 0.77 ± 0.21 | 1.17 ± 0.00 |
| Chloroquine |  | 0.38 ± 0.03 | 0.081 ± 0.019 |

*Average ± SD of the IC₅₀ is based in two to four experiments performed with each parasite strain using anti-HRP-II method.

Inhibition of β-haematin formation by CQAn

The inhibition of β-haematin formation was evaluated for CQAn33 and CQAn37, the most active CQAns against *P. falciparum* *in vitro*. The results showed that CQAn33 inhibited β-haematin formation with an IC₅₀ value similar to that of CQ, whereas CQAn37 inhibited β-haematin formation at a concentration 2-fold higher than that of CQ (Table 4).

Docking studies and the mechanism of activity of the CQAns

The root-mean-square deviation (RMSD) values obtained through re-docking of the NADH structure inside each crystal were lower than 2.00 Å in the case of *Pf*LDH and *Hss*LDH (Tables 5 and 6). The cavities of the NADH-binding sites inside *Pf*LDH and the human lactate dehydrogenase enzyme (*Hss*LDH) were determined to have

Table 2 Cytotoxicity of CQ and CQAn and SI on *P. falciparum* parasites and therapeutic activity or selectivity index (SI), a ratio between toxicity and activity

| Molecule | Cytotoxicity* <i>MLD</i> ₅₀ (μM) HepG2 cells | SI (<i>MLD</i> ₅₀ / <i>IC</i> ₅₀) | |
|-------------|--|---|------------|
| | | W2 (CQ-R) | 3D7 (CQ-S) |
| CQAn28 | 1508.56 ± 344.50 | 2125 | 101 |
| CQAn33 | 152.89 ± 12.86 | 7645 | 131 |
| CQAn34 | 943.29 ± 73.15 | 4101 | 3144 |
| CQAn37 | 1699.24 ± 10.07 | 24275 | 2981 |
| CQAn39 | ≥3207.08 | 5011 | 1342 |
| CQAn45 | 1015.84 ± 42.97 | 1319 | 868 |
| Chloroquine | 410.4±26.6 | 1080 | 5,679 |

*Average ± SD of two to four experiments measured through MTT-colorimetric assay.

volumes of 117,248 and 7,936 Å³, respectively. Both cavities were generated around the NADH structure present inside the crystallographic structures. The results suggest that the new CQAnS studied have affinities for the NADH-binding sites of *Pf*LDH and *Hss*LDH. These compounds were able to dock and to establish highly stable H-bonds with amino acids and water molecules in the sites, as reflected by the highly negative total intermolecular energy (IE) values (Tables 5 and 6). The IE values were less negative inside *Hss*LDH than inside *Pf*LDH.

Inside *Pf*LDH, all the compounds (except CQAn45) H-bonded to Asp53 and/or Thr97 plus water molecules and displayed good (negative) H-bond energy values. The intermolecular energies were ranked as follows: CQ > CQAn39 > CQAn37 > CQAn33 > CQAn28 > CQAn45 > CQAn34, with lower values than NADH. The highest

Table 3 Anti-malarial activity of chloroquine (CQ) and its analogs (CQAn) against *P. berghei* evaluated as percentage reduction of parasitaemia on days after inoculation with either a CQ sensitive or resistant strain of the parasite*

| CQAn | CQ-Sensitive 25 mg/Kg | | CQ-Resistant 50 mg/Kg | |
|------|-----------------------|-----------------|-----------------------|----------------|
| | Day 5 | Day 7 | Day 5 | Day 7 |
| 28 | 94 ^a | 24 ^a | 0 ^b | 0 |
| 33 | 73 ^a | 57 ^a | 53 | 52 |
| 34 | 99 | 81 | 0 ^b | 0 |
| 37 | 100 | 93 | 47 | 33 |
| 39 | 95 | 92 | 62 | 30 |
| 45 | 88 | 50 | 63 | 51 |
| CQ | 100 | 97 | 0 ^c | 0 ^c |

*Reduction calculated in relation to control non-treated mice (100% of parasite growth).

^aAdapted from de Souza et al. [19]; all the compounds were used at 50mg/Kg, except as indicated, in the dose of 25 mg/Kg because there was not enough material for a higher dose^b. In the case of CQ used as control in the test with the resistant parasites, the dose used was 150 mg/Kg, which was totally inactive, as expected^c.

Table 4 Inhibitory concentrations of β-haematin formation by chloroquine (CQ) and two analogs (CQAn)*

| CQAn | Exp | | | Mean ± SD |
|------|-----|------|-----|-----------|
| | 1 | 2 | 3 | |
| 33 | 4.7 | 3.0 | 5.6 | 4.3 ± 1.3 |
| 37 | 2.7 | 10.2 | 7.5 | 8.9 ± 3.8 |
| CQ | 0.6 | 2.0 | 5.0 | 3.5 ± 2.2 |

*Results expressed as *IC*₅₀ in mM.

H-bond energy was observed for CQAn33 and the lowest for CQAn45.

Most of the active-site residues of *Pf*LDH involved in H-bonds differed from those of *Hss*LDH. Thus, the residues of *Pf*LDH involved in H-bonds with CQAn33 and CQAn37 were Thr97, Val138 and H₂O; and Asp53 and H₂O, respectively. The residues of *Hss*LDH for the same molecules were Lys147, Ala146 and Asn116; and Gly15, Asn116, Ala146 and Lys147, respectively.

To better understand the experimentally observed selectivity, the electrostatic potentials of the NADH-binding sites inside *Pf*LDH and *Hss*LDH were determined. The results showed differences in the binding pockets: inside the *Pf*LDH pocket, the electrostatic potential was totally positive, whereas inside *Hss*LDH, it was mostly negative, as illustrated by CQAn33 docked inside both enzymes (Figures 2 and 3).

Discussion

Although CQ-R is widespread, CQAnS may help to overcome the drug resistance, especially considering that it is believed to be stage specific [39] and/or related to the compound structure [15]. Indeed, various CQAnS have shown potent antiparasitodal activity against CQ-R *P. falciparum* blood parasites [40-42]. Among the six CQAnS tested against *P. falciparum* in the present work, all exhibited high activity against CQ-R parasites. CQAn28, 33, 37 and 39 were more potent against the CQ-R W2 clone than against the 3D7 CQ-S parasites.

Variation in side chains seems to be a promising strategy concerning the anti-malarial activity of CQAnS, and small changes in the spacer length can dramatically affect the activity exhibited against CQ-S and CQ-R parasites [43]. Moreover, the presence of a terminal alkyne seems important: CQAn33, which has a terminal alkyne, showed an *IC*₅₀ more than 10-fold higher than that of CQ, which has no terminal alkyne.

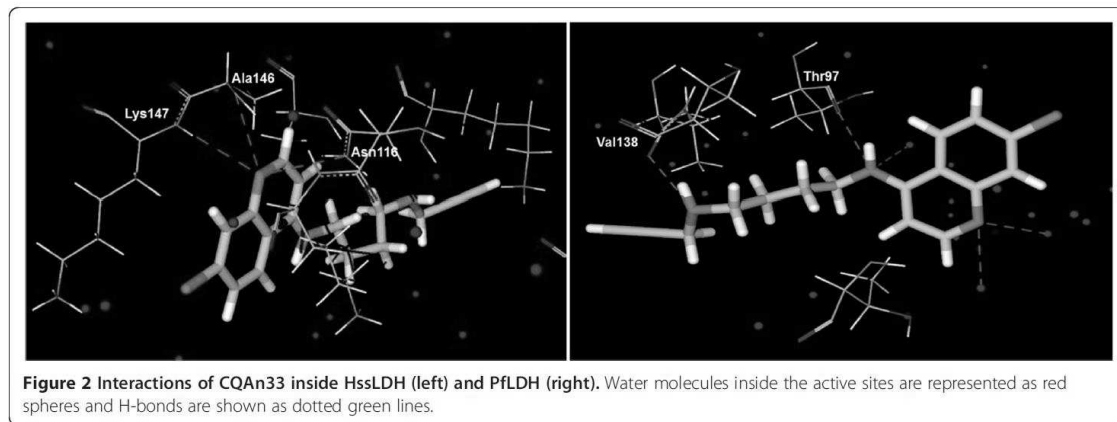
The activity of 4-aminoquinolines involves their binding to haematin in the monomeric and dimeric forms, inhibiting haemozoin formation and resulting in parasite death [44]. The activity of CQ against *P. falciparum* also involves interactions with the parasite enzyme *Pf*LDH [20], as shown by *in silico* studies with docking and molecular dynamics in the present work. The complex formed

Table 5 Docking results of NADH, CQ and CQAn inside PFDH

| Ligand | Intermolecular energy (kcal mol ⁻¹) | H-bond energy (kcal mol ⁻¹) | Residues and water molecules involved in H-bonds | Distance (Å) | H-bond energy (kcal mol ⁻¹) |
|------------------|--|--|---|--------------|--|
| NADH RMSD 1.437 | -180.166 | -11.878 | Met30(2) | 3.293 | -0.331 |
| | | | | 2.972 | -1.534 |
| | | | Gly99 | 3.329 | -1.355 |
| | | | Asp53 | 3.259 | -1.707 |
| | | | Ile31 | 2.267 | 0.288 |
| | | | Gly29 | 2.876 | -0.758 |
| | | | Gly32 | 3.301 | -1.495 |
| | | | Phe100 | 3.213 | -1.933 |
| | | | Ser245 | 3.585 | -0.077 |
| | | | | 3.536 | -0.060 |
| | | | Leu163(2) | 3.522 | -0.392 |
| | | | His195 | 3.595 | -0.025 |
| | | | Val138 | 2.737 | -2.500 |
| | | | H ₂ O (2) | 3.466 | -0.671 |
| | | | H ₂ O | 3.172 | -2.142 |
| | | | H ₂ O | 1.004 | 11.271 |
| | | | H ₂ O | 2.946 | -2.500 |
| H ₂ O | 1.992 | 2.675 | | | |
| H ₂ O | 3.111 | -2.445 | | | |
| H ₂ O | 3.086 | -2.500 | | | |
| H ₂ O | 2.911 | -2.500 | | | |
| CQ | -148.459 (-133.455) | -3.232 | Ile31 | 3.344 | -1.278 |
| | | | Met30 | 3.013 | -0.962 |
| | | | Asn140 | 2.866 | -0.992 |
| CQAn28 | -131.266 (-123.897) | -4.086 | H ₂ O | 3.210 | -1.951 |
| | | | Asp53 | 3.283 | -1.586 |
| CQAn33 | -135.340 (-123.651) | -4.602 | Gly99 | 3.014 | -2.500 |
| | | | Val138 | 2.593 | -2.105 |
| | | | Thr97 | 2.843 | -2.498 |
| | | | H ₂ O | 3.093 | -2.500 |
| CQAn34 | -123.505 (-115.999) | -3.088 | H ₂ O | 2.758 | -2.500 |
| | | | H ₂ O | 3.336 | -1.321 |
| | | | Asp53 | 2.762 | -1.575 |
| CQAn37 | -141.264 (-131.154) | -2.500 | Thr97 | 3.127 | -1.513 |
| | | | H ₂ O | 2.967 | -2.500 |
| CQAn39 | -145.727 (-123.226) | -2.500 | Asp53 | 2.938 | -2.500 |
| | | | H ₂ O | 3.210 | -1.951 |
| CQAn45 | -131.123 (-110.764) | -1.544 | Asp53 | 2.869 | -2.500 |
| | | | H ₂ O | 3.263 | -1.685 |
| | | | Gly99 | 2.999 | -1.544 |

Table 6 Docking results of NADH, CQ and CQAn inside HssLDH

| Ligand | Intermolecular energy (kcal mol ⁻¹) | H-bond energy (kcal mol ⁻¹) | Residues and water molecules involved in H-bonds | Distance (Å) | H-bond energy (kcal mol ⁻¹) |
|----------------------|--|--|---|--------------|--|
| NADH RMSD 0.956 | -191.613 (-190.630) | -20.561 | Asp119 (2) | 3.085 | -2.500 |
| | | | | 2.817 | -1.588 |
| | | | Ser145 | 3.131 | -2.343 |
| | | | Ala146 | 2.627 | -0.675 |
| | | | Lys147 | 2.635 | -2.500 |
| | | | Lys117 | 3.482 | -0.592 |
| | | | Gly15 | 2.566 | -2.215 |
| | | | Val14 | 2.851 | -0.277 |
| | | | | 2.940 | -2.500 |
| | | | Lys16 (2) | 2.470 | -0.726 |
| | | | | 2.975 | -0.360 |
| | | | Gly13 | 2.975 | -0.360 |
| | | | Ala18 | 3.288 | -1.561 |
| | | | Ser17(2) | 2.794 | -1.529 |
| | | | | 3.315 | -1.193 |
| | | | H ₂ O | 2.725 | -2.500 |
| | | | | 3.132 | -2.342 |
| H ₂ O (2) | 2.578 | -2.313 | | | |
| H ₂ O (3) | 3.359 | -1.203 | | | |
| | 2.982 | -2.500 | | | |
| | 3.213 | -1.934 | | | |
| CQ | -127.669 (-104.576) | -2.983 | Ala146 | 3.390 | -0.833 |
| | | | Asn116 | 2.785 | -2.149 |
| | | | H ₂ O | 3.438 | -0.812 |
| CQAn28 | -123.535 (-114.612) | -3.669 | Ala146 | 3.218 | -1.394 |
| | | | Asp116 | 2.922 | -2.275 |
| | | | H ₂ O | 3.193 | -2.033 |
| CQAn33 | -125.365 (-112.274) | -3.298 | Lys147 | 3.551 | -0.143 |
| | | | Ala146 | 3.139 | -1.599 |
| | | | Asn116 | 3.206 | -1.556 |
| CQAn34 | -113.935 (-104.054) | -3.842 | Asn116 | 2.974 | -2.074 |
| | | | Ala146 | 3.126 | -1.768 |
| | | | H ₂ O | 3.204 | -1.979 |
| CQAn37 | -121.066 (-110.364) | -3.588 | Gly15 | 3.398 | -0.163 |
| | | | Asn116 | 3.166 | -1.425 |
| | | | Ala146 | 3.051 | -1.904 |
| | | | Lys147 | 3.573 | -0.010 |
| CQAn39 | -129.262 (-107.522) | -2.498 | Asn116 | 2.799 | -2.068 |
| | | | Ala146 | 3.493 | -0.430 |
| CQAn45 | -128.632 (-94.840) | -1.411 | Asn116 | 3.401 | -0.843 |
| | | | Ala146 | 3.420 | -0.569 |
| | | | H ₂ O | 3.074 | -2.500 |



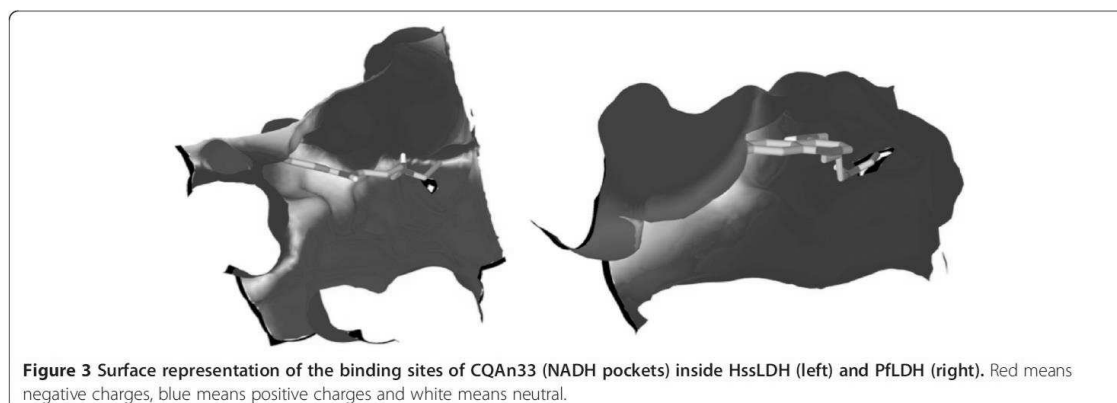
between the dimeric haematin and the quinolinic drugs inhibited *Pf*LDH, as shown with other quinoline derivatives [21].

In previous studies, RMSD values below 2.00 Å were obtained for the plasmodial and human enzymes in re-docking studies, which validates this methodology [45-47]. The intermolecular energy values for the CQAn33 were higher than for CQ and NADH, showing that the molecules studied here are weak inhibitors of *Pf*LDH and suggesting that they have a different mechanism of action.

CQAn33 and CQAn37, the molecules with the highest SI *in vitro*, were also evaluated for their ability to inhibit β-haematin formation. The results showed that CQAn33 inhibited β-haematin formation with an IC₅₀ similar to that of CQ, whereas CQAn37 exhibited an IC₅₀ more than 2-fold higher than CQ, which is in accordance with this molecule being less active than CQAn33 against *P. falciparum*. The results obtained for anti-*P. falciparum* activity through the HRPII test showed a rather higher activity of these CQAn33 in relation to CQ, suggesting another mechanism of action than that related to haemozoin

formation, such as apoptosis, autophagy or the inhibition of P-glycoprotein-mediated transport. Metacaspase-like proteins, which are related to caspases [48], have previously been shown to be inducers of apoptosis in *P. falciparum* parasites exposed to CQ, with more intense DNA fragmentation in CQ-R parasites than in CQ-S [49]. Autophagy-related proteins have been identified in *P. falciparum* [50,51]. Indeed, after CQ pressure, *P. falciparum* parasites exhibited cytoplasmic vacuolization [52], a sign of autophagic cell death [53] rather than of apoptosis. A recent study showed that CQ significantly inhibited P-glycoprotein-mediated transport [54], which is involved in drug evasion in *P. falciparum* [55].

The highest and lowest H-bond energies were observed for CQAn33 and CQAn45, respectively, a result that corroborates the *in vitro* data showing that CQAn33 was the most active molecule and CQAn45 the least active against *P. falciparum*. Another difference is the residues of the plasmodial and human enzymes involved in the H-bonds, specific for CQAn33 and CQAn37; this result is consistent with them having the highest SIs.



The differences in the binding pockets of the studied compounds' tails inside *Pf*LDH and *Hss*LDH could be explained by a large concentration of negative charges due to the presence of the alkyne groups. This finding suggests a better stabilization inside the more positive pocket of *Pf*LDH, which is caused by the size of the cavity and increases drug specificity. Indeed, the smaller cavity of *Pf*LDH allows for better accommodation of the ligands than inside *Hss*LDH.

The most active CQAn *in vitro* also inhibited *P. berghei* parasitaemia in mice, as shown in the present work and in our previous studies with the same compounds [19]. An increase in mouse survival resulting from treatment with CQAn37 may well be a consequence of the alkyl side chain altering the structure-activity relationship in the terminal nitrogen [15], which may favor drug lipophilicity. All the CQAnS inhibited CQ-R *P. berghei* parasitaemia in mice, translating the *in vitro* data, with the exception of CQAn28 and 34, which is likely a result of metabolism [13] or of the structure-activity relationships inherent to the resistance phenotype, e.g., those related to *pfprt* [7,56], also *in vivo* [57].

The data reported herein highlight the use of CQAnS in malaria-endemic areas where drug resistance has been reverted, i.e., sensitivity to CQ has reappeared [58]. CQ is the most widely used anti-malarial drug worldwide [2] due to its low cost, high efficacy and lack of toxicity. In addition, the cost of a treatment course is rather low at US\$0.21 per patient [59]. The CQAnS evaluated in this study are generated in two steps using readily available, inexpensive starting materials and can be produced in good yields [22] at a cost expected to be as low as that of CQ. Thus, the CQAnS studied in the present work may be produced at large scale to proceed in drug development for anti-malarials, since they are promising alternatives for malaria control.

Conclusions

Among the six CQAnS tested *in vitro*, three were more active than CQ, inhibiting 50% of *P. falciparum* growth at low doses: CQAn33 (IC₅₀ 0.02 ± 0.001 μM), CQAn34 (IC₅₀ 0.23 ± 0.15 μM), and CQAn37 (IC₅₀ 0.07 ± 0.03 μM). All were more active against the CQ-R (W2) parasites than against the CQ-S (3D7) parasites, which suggests the absence of cross-CQ-R. In addition, the therapeutic indexes (or SI) of all CQAnS, with the exception of CQAn45, were higher than that of CQ. Docking studies with CQAn33 and CQAn37 corroborated the outstanding anti-*P. falciparum* activity observed herein and showed that CQAn33 had the highest H-bond energy with the plasmodial enzyme, indicating specificity for *Pf*LDH. Additionally, they showed that the CQAnS are weak inhibitors of *Pf*LDH, suggesting a different mechanism of action. The inhibition of β-haematin formation by CQAn33 and CQAn37 also

suggested mechanisms of action other than those related to haemozoin formation. The *in vivo* results with CQAn34, CQAn37, CQAn39, and CQAn45 confirm previous data showing their high anti-malarial activity. Furthermore, the CQAnS also inhibited the parasitaemia caused by CQ-R *P. berghei* but CQ did not, translating *in vitro* to *in vivo* data. However, CQAn28 and CQAn34 did not inhibit CQ-R *P. berghei* parasitaemia, what may be a result of metabolism issues or structure-activity relationships related to the resistant phenotype. Altogether, the present results highlight the CQAnS studied here as promising anti-malarial agents due to their SI and *in vivo* activity against malaria in mice.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

NBS performed the biological tests, ADS was the chemist responsible for planning and synthesizing the CQAn, TCCF performed the docking studies, AUK was the project leader that conceived the study and was responsible for the pharmacological tests. All of the authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank the financial support from the Brazilian funding agencies MCT/CNPq/CT-Saúde/MS/SCTIE/DECIT (Edital PRONEX-55675/2009-2 and Edital Doenças Negligenciadas-404455/2012-3); to FAPEMIG (PRONEX-Project 16712); FIOCRUZ for providing facilities and mice, and to CNPq for the fellowships to the authors (AUK; NBS).

Author details

¹Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ Minas, Av. Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte 30190-002, MG, Brazil. ²Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer s/n, Juiz de Fora 36036-900, MG, Brazil. ³Laboratório de Modelagem Molecular Aplicada à Defesa Química e Biológica, Instituto Militar de Engenharia, Praça General Tibúrcio 80, Rio de Janeiro 22290-270, RJ, Brazil.

Received: 3 July 2014 Accepted: 4 November 2014

Published: 2 December 2014

References

1. WHO: *World Malaria Report 2013*. Geneva: World Health Organization; 2014. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/report/eng/.
2. WHO: *Guidelines for Treatment of Human Malaria*. 2nd edition. Geneva: World Health Organization; 2010.
3. WHO: *Global Report on Antimalarial Drug Efficacy and Drug Resistance 2000–2010*. Geneva: World Health Organization; 2010.
4. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, Lwin KM, Ariey F, Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NP, Lindergardh N, Socheat D, White NJ: **Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria**. *N Engl J Med* 2009, **361**:455–457.
5. Phyo AP, Nkhoma S, Stepniewska K, Ashley EA, Nair S, McGready R, ler Moo C, Al-Saai S, Dondorp AM, Lwin KM, Singhasivanon P, Day NP, White NJ, Anderson TJ, Nosten F: **Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study**. *Lancet* 2012, **379**:1960–1966.
6. Miotto O, Almagro-Garcia J, Manske M, Macinnis B, Campino S, Rockett KA, Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Anderson JM, Duong S, Nguon C, Chhor CM, Saunders D, Se Y, Lon C, Fukuda MM, Amenga-Etego L, Hodgson AV, Asoala V, Imwong M, Takala-Harrison S, Nosten F, Su XZ, Ringwald P, Ariey F, Dolecek C, Hien TT, Boni MF, et al: **Multiple populations of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Cambodia**. *Nat Genet* 2013, **45**:648–655.

7. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, Ursos LM, Sidhu AB, Naudé B, Deitsch KW, Su XZ, Wootton JC, Roepe PD, Wellem TE: Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* 2000, **6**:861–871.
8. Roepe PD: PfCRT-mediated drug transport in malarial parasites. *Biochemistry* 2011, **50**:163–171.
9. Price RN, Douglas NM, Anstey NM: New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. *Curr Opin Infect Dis* 2009, **22**:430–435.
10. Graf PC, Durand S, Alvarez Antonio C, Montalvan C, Galves Montoya M, Green MD, Santolalla ML, Salas C, Lucas C, Bacon DJ, Fryauff DJ: Failure of supervised chloroquine and primaquine regimen for the treatment of *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. *Malar Res Treat* 2012, **2012**:936067.
11. Gama BE, Lacerda MVG, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz MDF: Chemoresistance of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasites in Brazil: consequences on disease morbidity and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011, **106**:159–166.
12. Aguiar AC, Pereira DB, Amaral NS, De Marco L, Krettli AU: *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* ex vivo susceptibility to anti-malarials and gene characterization in Rondônia, West Amazon, Brazil. *Malar J* 2014, **13**:73.
13. Hocart SJ, Liu H, Deng H, De D, Krogstad FM: 4-aminoquinolines active against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*: basis of antiparasite activity and quantitative structure-activity relationship analyses. *Antimicrob Agents Chemother* 2011, **55**:2233–2244.
14. Casagrande M, Barteselli A, Basilio N, Parapini S, Taramelli D, Sparatore A: Synthesis and antiparasmodial activity of new heteroaryl derivatives of 7-chloro-4-aminoquinoline. *Bioorg Med Chem* 2012, **20**:5965–5979.
15. Stocks PA, Raynes KJ, Bray PG, Park BK, O'Neill PM, Ward SA: Novel short chain chloroquine analogues retain activity against chloroquine resistant K1 *Plasmodium falciparum*. *J Med Chem* 2002, **45**:4975–4983.
16. Solomon VR, Puri SK, Srivastava K, Katti SB: Design and synthesis of new antimalarial agents from 4-aminoquinoline. *Bioorg Med Chem* 2005, **33**:2165.
17. Cunico W, Cechinal CA, Bonacorso HG, Martins MAP, Zanatta N, de Souza MN, Freitas IO, Soares RPP, Krettli AU: Antimalarial activity of 4-(5-trifluoromethyl-1H-pyrazol-1-yl)-chloroquine analogues. *Bioorg Med Chem Lett* 2006, **16**:649–653.
18. Madrid PB, Wilson NT, DeRisi JL, Guy RK: Parallel synthesis and antimalarial screening of a 4-aminoquinoline library. *J Comb Chem* 2004, **6**:437–442.
19. de Souza NB, Carmo AM, Lagatta DC, Alves MJ, Fontes AP, Coimbra ES, da Silva AD, Abramo C: 4-aminoquinoline analogues and its platinum (II) complexes as antimalarial agents. *Biomed Pharmacother* 2011, **65**:313–316.
20. Read JA, Wilkinson KW, Tranter R, Sessions RB, Brady RL: Chloroquine binds in the cofactor binding site of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase. *J Biol Chem* 1999, **274**:10213–10218.
21. Cortopassi WA, Oliveira AA, Guimarães AP, Rennó MN, Krettli AU, França TC: Docking studies on the binding of quinoline derivatives and hemozoin to *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase. *J Biomol Struct Dyn* 2011, **29**:207–218.
22. Carmo AM, Silva FM, Machado PA, Fontes AP, Pavan FR, Leite CQ, Leite SR, Coimbra ES, Da Silva AD: Synthesis of 4-aminoquinoline analogues and their platinum(II) complexes as new antileishmanial and antitubercular agents. *Biomed Pharmacother* 2011, **65**:204–209.
23. Denizot F, Lang R: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986, **89**:271–277.
24. do Céu de Madureira M, Paula Martins A, Gomes M, Paiva J, Proença da Cunha A, do Rosário V: Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S Tomé and Príncipe islands. *J Ethnopharmacol* 2002, **81**:23–29.
25. Oduola AM, Milhous WK, Weatherly NF, Bowdre JH, Desjardins RE: *Plasmodium falciparum*: induction of resistance to mefloquine in cloned strains by continuous drug exposure *in vitro*. *Exp Parasitol* 1988, **67**:354–360.
26. Trager W, Jensen JB: Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976, **193**:673–675.
27. Lambros C, Vanderberg JP: Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* 1979, **65**:418–420.
28. Rieckmann KH, Campbell GH, Sax LJ, Mrema JE: Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An *in vitro* microtechnique. *Lancet* 1978, **i**:22–23.
29. Noedl H, Wongsrichanalai C, Miller RS, Myint KS, Looareesuwan S, Sukthana Y, Wongchotigul V, Kollaritsch H, Wiedemann G, Wernsdorfer WH: *Plasmodium falciparum*: effect of anti-malarial drugs on the production and secretion characteristics of histidine-rich protein II. *Exp Parasitol* 2002, **102**:157–163.
30. Peters W, Portus JH, Robinson BL: The four-day suppressive *in vivo* antimalarial test. *Ann Trop Med Parasitol* 1975, **69**:155–171.
31. Andrade-Neto VF, Goulart MFO, Silva-Filho JF, Matusalém JS, Pinto MCFR, Pinto AV, Zalis MG, Carvalho LH, Krettli AU: Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* *in vitro* and *Plasmodium berghei* *in vivo*. *Bioorg Med Chem Lett* 2004, **14**:1145–1149.
32. Krettli AU, Pereira JP, Brenner Z: Comparative study of experimental infections in mice inoculated with normal and chloroquine-resistant strains of *Plasmodium berghei*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1969, **11**:94–100.
33. Pisciotta JM, Coppens I, Tripathi AK, Scholl PF, Shuman J, Bajad S, Shulava V, Sullivan DJ Jr: The role of neutral lipid nanospheres in *Plasmodium falciparum* haem crystallization. *Biochem J* 2007, **402**:197–204.
34. Hehre WJ: *A Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations*. Irvine: Wavefunction, Inc; 2003.
35. Halgren TA: Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J Comput Chem* 1996, **17**:490–519.
36. Rocha GB, Freire RO, Simas AM, Stewart JJ: RM1: a reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I. *J Comput Chem* 2006, **27**:1101–1111.
37. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE: The protein data bank. *Nucl Acids Res* 2000, **28**:235–242.
38. Thomsen R, Christensen MH: MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *J Med Chem* 2006, **49**:3315–3321.
39. Gligorijevic B, Purdy K, Elliott DA, Cooper RA, Roepe PD: Stage independent chloroquine resistance and chloroquine toxicity revealed via spinning disk confocal microscopy. *Mol Biochem Parasitol* 2008, **159**:7–23.
40. Solomon VR, Haq W, Srivastava K, Puri SK, Katti SB: Synthesis and antimalarial activity of side chain modified 4-aminoquinoline derivatives. *J Med Chem* 2007, **50**:394–398.
41. Solaja BA, Opsenica D, Smith KS, Milhous WK, Terzić N, Opsenica I, Burnett JC, Nuss J, Gussio R, Bavari S: Novel 4-aminoquinolines active against chloroquine-resistant and sensitive *P. falciparum* strains that also inhibit botulinum serotype A. *J Med Chem* 2008, **51**:4388–4391.
42. Wenzel NI, Chavain N, Wang Y, Friebohn W, Maes L, Pradines B, Lanzer M, Yardley V, Brun R, Herold-Mende C, Biot C, Tóth K, Davioud-Charvet E: Antimalarial versus cytotoxic properties of dual drugs derived from 4-aminoquinolines and Mannich bases: interaction with DNA. *J Med Chem* 2010, **53**:3214–3226.
43. Iwaniuk DP, Whetmore ED, Rosa N, Ekoue-Kovi K, Alumasa J, de Dios AC, Roepe PD, Wolf C: Synthesis and antimalarial activity of new chloroquine analogues carrying a multifunctional linear side chain. *Bioorg Med Chem* 2009, **17**:6560–6566.
44. Egan TJ, Nkokazi KK: Quinoline antimalarials decrease the rate of β -hemozoin formation. *J Inorg Biochem* 2005, **99**:1532–1539.
45. Kontoyianni M, McClellan LM, Sokol GS: Evaluation of docking performance: comparative data on docking algorithms. *J Med Chem* 2004, **47**:558–565.
46. Leach AR, Shoichet BK, Peishof CE: Prediction of protein-ligand interactions. Docking and scoring: Successes and gaps. *J Med Chem* 2006, **49**:5851–5855.
47. Warren GL, Andrews CW, Capelli AM, Clarke B, LaLonde J, Lambert MH, Lindvall M, Nevins N, Semus SF, Senger S, Tedesco G, Wall ID, Woolven JM, Peishoff CE, Head MS: A critical assessment of docking programs and scoring functions. *J Med Chem* 2006, **49**:5912–5931.
48. Uren AG, O'Rourke K, Aravind LA, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV, Dixit VM: Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* 2000, **6**:961–967.
49. Meslin B, Barnadas C, Boni V, Latour C, De Monbrison F, Kaiser K, Picot S: Features of apoptosis in *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage through a putative role of PfMCA1 metacaspase-like protein. *J Infect Dis* 2007, **195**:1852–1859.

50. Kitamura K, Kishi-Itakura C, Tsuboi T, Sato S, Kita K, Ohta N, Mizushima N: Autophagy-related Atg8 localizes to the apicoplast of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS One* 2012, **7**:e42977.
51. Walker DM, Mahfooz N, Kemme KA, Patel VC, Spangler M, Drew ME: *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage parasites require the putative autophagy protein PfAtg7 for normal growth. *PLoS One* 2013, **8**:e67047.
52. Totino PR, Daniel-Ribeiro CT, Corte-Real S, de Fátima F-d-C M: *Plasmodium falciparum*: erythrocytic stages die by autophagic-like cell death under drug pressure. *Exp Parasitol* 2008, **118**:478–486.
53. Bursch W: The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ* 2001, **8**:569–581.
54. Rijpma SR, van den Heuvel JJ, van der Velden M, Sauerwein RW, Russel FG, Koenderink JB: Atovaquone and quinine anti-malarials inhibit ATP binding cassette transporter activity. *Malar J* 2014, **13**:359.
55. Nogueira F, Lopes D, Alves AC, do Rosário VE: *Plasmodium falciparum* multidrug resistance protein (MRP) gene expression under chloroquine and mefloquine challenge. *J Cell An Biol* 2008, **2**:010–020.
56. Zishiri VK, Joshi MC, Hunter R, Chibale K, Smith PJ, Summers RL, Martin RE, Egan TJ: Quinoline antimalarials containing a dibemethin group are active against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* and inhibit chloroquine transport via the *P. falciparum* chloroquine-resistance transporter (PfCRT). *J Med Chem* 2011, **54**:6956–6968.
57. Ghobakhloo N, Nateghpour M, Rezaee S, Hajjarian H, Mohebbali M, Abedkhozjasteh H: Variation of the chloroquine resistance transporter (Crt) gene in chloroquine-resistant and chloroquine-sensitive *Plasmodium berghei*. *Iran J Parasitol* 2008, **3**:39–44.
58. Frosch AE, Laufer MK, Mathanga DP, Takala-Harrison S, Skarbinski J, Claassen CW, Dzinjalimala FK, Plowe CV: Return of widespread chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* to Malawi. *J Infect Dis* 2014, **210**:1110–1114.
59. WHO: AFR E: Cost Effectiveness Results for Malaria. 2010. Available at http://www.who.int/choice/results/mal_afre/en/.

doi:10.1186/1475-2875-13-469

Cite this article as: de Souza et al.: Antiplasmodial activity of chloroquine analogs against chloroquine-resistant parasites, docking studies and mechanisms of drug action. *Malaria Journal* 2014 **13**:469.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



5.2 Artigo 2: naftoquinonas derivadas da atovaquona e compostos naftoquinoidais

546 Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 109(5): 546-552, August 2014

Blood schizonticidal activities of phenazines and naphthoquinoidal compounds against *Plasmodium falciparum* in vitro and in mice malaria studies

Nicolli Bellotti de Souza¹, Isabel M de Andrade¹, Paula F Carneiro², Guilherme AM Jardim³, Isadora MM de Melo³, Eufrânio N da Silva Júnior^{3/+}, Antoniana Ursine Krettli^{1/+}

¹Laboratório de Malária, Centro de Pesquisas René-Rachou-Fiocruz, Belo Horizonte, MG, Brasil ²Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil ³Laboratório de Química Sintética e Heterocíclica, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

Due to the recent advances of atovaquone, a naphthoquinone, through clinical trials as treatment for malarial infection, 19 quinone derivatives with previously reported structures were also evaluated for blood schizonticide activity against the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. These compounds include 2-hydroxy-3-methylamino naphthoquinones (2-9), lapachol (10), nor-lapachol (11), iso-lapachol (12), phthiocol (13) and phenazines (12-20). Their cytotoxicities were also evaluated against human hepatoma and normal monkey kidney cell lines. Compounds 2 and 5 showed the highest activity against *P. falciparum* chloroquine-resistant blood-stage parasites (clone W2), indicated by their low inhibitory concentration for 50% (IC_{50}) of parasite growth. The therapeutic potential of the active compounds was evaluated according to the selectivity index, which is a ratio of the cytotoxicity minimum lethal dose which eliminates 50% of cells and the in vitro IC_{50} . Naphthoquinones 2 and 5, with activities similar to the reference antimalarial chloroquine, were also active against malaria in mice and suppressed parasitaemia by more than 60% in contrast to compound 11 which was inactive. Based on their in vitro and in vivo activities, compounds 2 and 5 are considered promising molecules for antimalarial treatment and warrant further study.

Key words: antimalarials - quinones - phenazines - lapachol - *Plasmodium falciparum* - *Plasmodium berghei*

To date, malaria remains a global health problem that affects 225 million people, mostly in tropical and subtropical regions of Africa and Southeast Asia (WHO 2011). A malaria vaccine is currently unavailable and chemotherapy remains the primary intervention for disease control; however, the resistance of *Plasmodium falciparum* to most antimalarial agents is increasing and in some regions of the world, the parasite is becoming resistant to artemisinin derivatives (Dondorp et al. 2009). In addition, the agent *Plasmodium vivax* has become resistant to chloroquine (Price et al. 2009, Graf et al. 2012, Marques et al. 2014), further raising difficulties of controlling malaria. More effective compounds and new treatment strategies are therefore needed, particularly drugs with high therapeutic indexes, novel and/or defined mechanisms of action, easy synthesis and activity against all stages of malarial parasitic infection.

Quinone-based compounds with antimalarial activity, such as hydrolapachol (Hooker 1936) and lapachol, which are both isolated from plants (Fieser & Fieser 1948), have been studied in depth over recent decades. Interest in the

antimalarial properties of hydroxy-naphthoquinones has increased since the development of atovaquone (Fry & Pudney 1992, Srivastava et al. 1997), a commercially available drug for malaria chemoprophylaxis (Shapiro et al. 1999) that is used to treat *P. falciparum* malaria (McKeage & Scott 2003) in areas with chloroquine resistance (Aguilar et al. 2012, WHO 2012). These compounds also possess antibacterial and antitumor activities due to their effects on oxidative stress (Lourenço et al. 2011, Cavalcanti et al. 2013).

Phenazines are produced through the heterocyclisation of naphthoquinoidal structures and also possess antimicrobial (van Rensburg et al. 2000), antiviral (Wang et al. 2000) and antimalarial (Makgatho et al. 2000, Andrade-Neto et al. 2004b) activities.

Some quinoidal molecules have demonstrated an improved biological response in relation to their parent compounds due to their increased lipophilicity (de Castro et al. 2013); however, the low bioavailability of atovaquone (Dressman & Reppas 2000) indicates the need for chemical modifications, especially in the alkyl group, to produce new analogues (Schuck et al. 2013). Furthermore, increasing resistance to atovaquone has been reported (Vaidya & Mather 2000, Fivelman et al. 2002).

In this study, we modified the alkyl side chain of atovaquone to create naphthoquinone derivatives containing tertiary amine substitutions (Fig. 1), which were also previously shown to have antimicrobial (Carneiro et al. 2011) and antitumoural (da Silva Júnior et al. 2011) properties. These derivatives were synthesised using the classic Mannich reaction from lawsone and

doi: 10.1590/0074-0276130603

Financial support: CAPES, CNPq/FAPEMIG, MCT/CNPq/CT-Saúde/MS/SCTIE/DECIT (480719/2012-8, 480719/2012-8), Project Universal MCTI/CNPq (14/2012) (480719/2012-8), UFMG (to ENSJ) + Corresponding authors: akrettli@cpqrr.fiocruz.br, eufranio@ufmg.br

Received 30 December 2013

Accepted 5 May 2014

online | memorias.ioc.fiocruz.br

evaluated against *P. falciparum* blood parasites *in vitro*. Compounds were next classified by their selective activity, with the exclusion of toxic compounds. In addition, some phenazines were similarly obtained and evaluated. The compounds with the highest activity and a low toxicity profile *in vitro* were next evaluated against malaria infection in mice. This study thus reinforces the importance of this class of compounds as treatment for parasitic diseases including *P. falciparum*.

MATERIALS AND METHODS

Chemistry - 2-hydroxy-3-methylamino naphthoquinoidal compounds 2-9 were prepared from lawsone by the classic Mannich reaction, using the appropriate amines and formaldehyde in an alcohol-based solution (Fig. 1) as previously described (Leffler & Hathaway 1948, Lagrota et al. 1988, dos Santos et al. 2000, Lima et al. 2002). The obtained derivatives were then characterised as previously described (Lagrota et al. 1988, dos Santos et al. 2000, Lima et al. 2002) (Fig. 2).

Lapachol (10) was extracted from the heartwood of *Tabebuia* sp. (*Tecoma*) and purified by a series of recrystallisation steps (Pinto et al. 1980). Nor-lapachol (11) was obtained using the Hooker oxidation method (Fieser & Fieser 1948). Iso-lapachol (12) and 2-hydroxy-3-methyl-1,4-naphthoquinone (13) were both synthesised using previously described techniques (Hooker 1936). Phenazine 14 was prepared from lapachol (10) through a two-step process (da Silva Júnior et al. 2009). Compound 15 was obtained from reduced nor-lapachol. Lapachol (10) was catalytically reduced and used to obtain compound 16 using the same reaction (da Silva Júnior et al. 2011) and compound 17 was obtained through a similar process. The phenazine compounds 18-20 were prepared from C-allyl lawsone as previously described (da Silva Júnior et al. 2011) (Fig. 3).

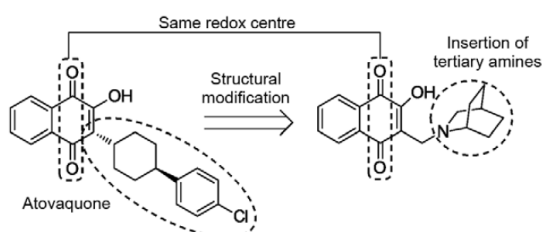


Fig. 1: strategy toward bioactive quinone derivatives.

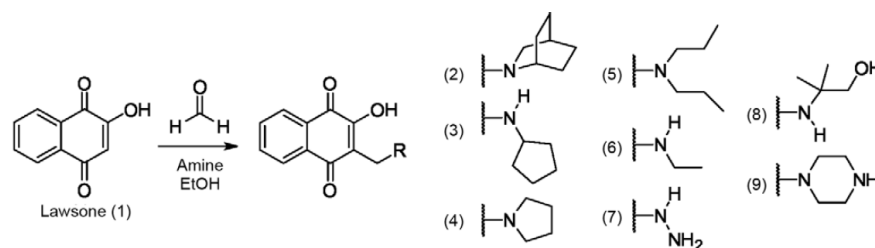


Fig 2: naphthoquinones 2-9 obtained by Mannich reaction.

Cytotoxicity tests with human hepatocellular liver carcinoma cell line (HepG2) - HepG2 (ATT, USA), kindly donated by Universidade Nova de Lisboa, Portugal, and normal monkey kidney cells (BGM) cells, donated by the University of Minas Gerais, were cultured in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich, USA, ref 6504), containing 40 mg/L gentamicin (Schering-Plough, USA) and 10% heat-inactivated foetal calf serum in 5% CO₂ at 37°C (Gibco, USA). After reaching confluence, the cell monolayer was then trypsinised, washed with culture medium, aliquoted into a flat-bottomed 96-well plate (Corning, USA, ref 3595) at 5×10^3 cells/well and incubated for 18 h at 37°C to allow cell adhesion. The test and control compounds were added at various concentrations (188-4,324 μM) and the cell monolayer was incubated for another 24 h. Cytotoxicity was next evaluated as described (Coutinho et al. 2013) with the [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide] (MTT) assay by adding 20 μL of 5 mg/mL MTT (Molecular Probes, USA) per well (Denizot & Lang 1986). After 3 h of incubation, the supernatant was discarded, 100 μL of dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich) were added per well and the optical density was measured (SpectraMax 340PC384, Molecular Devices, USA) at 570 nm for the test conditions and 630 nm for the background wells. Cell viability was expressed as a percentage of the absorbance of the untreated control cells subtracted from the appropriate background measurement. The minimum lethal dose of 50% cells (MLD₅₀) was determined as previously described (de Madureira et al. 2002) and further used to calculate the selectivity index (SI) of the active compounds, defined as the ratio of the MLD₅₀ to the IC₅₀ (Bézivin et al. 2003).

Continuous culture of *P. falciparum* and *in vitro* tests of drug activity - Blood-stage parasites from the chloroquine-resistant and mefloquine-sensitive *P. falciparum* W2 clone kept as described (Andrade-Neto et al. 2004a) were maintained at 37°C in human erythrocytes (A⁺) in complete medium (RPMI-1640, supplemented with 10% blood group A⁺ human serum) that was changed daily as previously described (Trager & Jensen 1976). The effects of the compounds were determined relative to control parasites kept in culture medium only (Rieckmann et al. 1978). Ring-stage sorbitol-synchronised parasites (Lambros & Vanderberg 1979) were used after adjusting the parasitaemia and haematocrit values as specified in each test at a volume of 180 μL/well in 96-well microtitre plates (Corning, ref. 3595) contain-

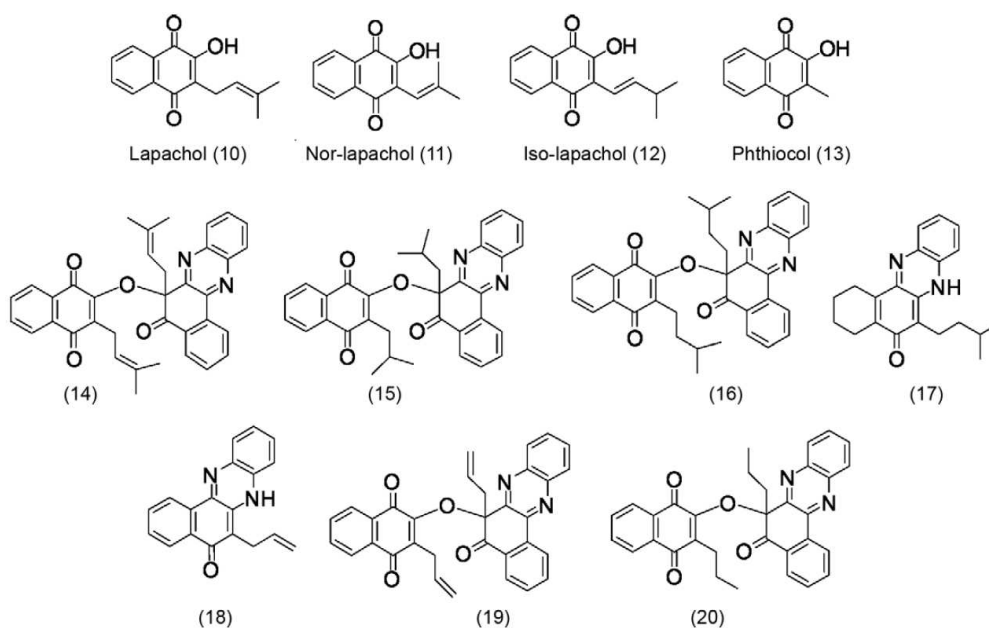


Fig. 3: lapachol (10), nor-lapachol (11), iso-lapachol (12), phthiocol (13) and phenazine compounds 14-20.

ing the diluted compounds in triplicate. The drug activity was measured using the anti-histidine-rich protein II (HRPII) test (Noedl et al. 2002). Chloroquine was used as the antimalarial control in each test.

For the HRPII test, the parasites were adjusted to 0.05% parasitaemia and 1.5% haematocrit, placed in plates containing the drugs and incubated for 24 h under standard culture conditions. The contents of six wells (containing no test drugs) were harvested and frozen in microtubes for later use as background measurement. After 48 h of incubation, the plates were frozen at -70°C and thawed twice. Next, 100 μL of the lysed cells from each well were added to a plate that had been pre-coated overnight at 4°C with the primary anti-HRPII antibody (MPFM-55A, ICLLAB[®], USA) for immunoassay. Phosphate-buffered saline at pH 7.2 supplemented with Tween 20 (Sigma-Aldrich) (0.05%) and bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) (4%) was used to block the plates to (avoid non-specific antibody binding) for 3 h at room temperature (RT). After 1 h at RT, the plates were washed and 100 μL /well secondary antibody solution (MPFG-55P ICLLAB[®]) were added, followed by incubation with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine chromogen cat. #50-76-00 (KPL, USA) in the dark. The reaction was stopped by adding 1 M sulphuric acid and the absorbance was read (450 nm) using a spectrophotometer (SpectraMax 340PC384, Molecular Devices). Anti-*P. falciparum* drug activity was measured by comparing the drug concentrations that inhibited parasite growth to drug-free control cultures, which were representative of 100% cell growth.

Growth data from the serial drug dilutions to sigmoidal dose-response curves was analysed by curve-fitting

software (Microcal Origin Software v.5.0, OriginLab Co, USA) and used to measure inhibitory concentration for 50% (IC_{50}) of parasite growth. Only compounds exhibiting IC_{50} values lower than 5 μM were considered active; those with IC_{50} values between 5-30 μM were considered partially active and those with IC_{50} values higher than 30 μM were considered inactive compounds.

Antimalarial tests against Plasmodium berghei in mice - The antimalarial suppressive test was performed as previously described (Peters et al. 1975) with slight modifications (Andrade-Neto et al. 2004b). Briefly, *P. berghei* (NK65) chloroquine-sensitive blood-stage parasites were stored at -70°C and passaged weekly in outbred Swiss mice. Adult female mice weighing 20 ± 2 g were inoculated with 1×10^5 infected erythrocytes, randomly distributed into groups of three mice per group after 24 h infection and then drug treated daily by gavage for three consecutive days. All compounds were freshly diluted in 3% DMSO in RPMI medium and used at doses of 100 mg/kg; chloroquine was used at 20 mg/kg and control mice received the drug vehicle. At days 5 and 9 after parasite inoculation, blood was taken from the tails of the mice and used to prepare smears, which were then fixed with methanol, Giemsa-stained and examined microscopically to determine parasitaemia as previously described (Andrade-Neto et al. 2004b). The inhibition of parasite growth by drug treatment was evaluated in relation to the untreated mice, which were representative of 100% parasite growth. Compounds that reduced parasitaemia by more than 40% were considered active, whereas those that reduced parasitaemia by 30-40% or less than 30% were classified as partially active and inactive, respectively.

Ethics - The protocols for animal use in the laboratory were previously approved by the Ethical Committee for Animal Use (L-0046/08), Oswaldo Cruz Foundation, Brazil.

RESULTS

Eight 2-hydroxy-3-methylamino naphthoquinones, seven phenazines and lapachol, nor-lapachol, iso-lapachol and phticol were evaluated for their in vitro activity against *P. falciparum* blood-stage parasites. All compounds were assayed using the anti-HRP II test. The standard antimalarial chloroquine was tested as a control agent in parallel and the data are summarised in Table I.

Among the compounds tested, naphthoquinones 2 and 5 were active, exhibiting IC_{50} values $< 5 \mu M$ (1.3 and 1.9 μM , respectively). Compounds 3, 4, 5, 7, nor-lapachol (11) and iso-lapachol (12) were considered partially active, as well as the phenazines 16-18 with IC_{50} within the range of 5 and 30 μM . The other compounds were considered inactive, exhibiting IC_{50} values $> 30 \mu M$.

Regarding cytotoxicity against both HepG2 and BGM cells, all molecules exhibited no toxicity based on high MLD_{50} values observed. Only compound 8 was toxic to both cell lines.

Considering the therapeutic potential of the molecules examined, which was defined as the SI based on the cytotoxicity against HepG2 cells and antiplasmodial activity in vitro, compounds 2 and 5 exhibited the highest SI values of 2,564 and 1,074, respectively, which were similar to or higher than that of chloroquine (SI = 1,535). Seven other molecules exhibited promising SIs ranging from 100-350; these compounds were iso-lapachol (12), three naphthoquinones derived from lawsone (3, 4, 6) and two phenazines (17 and 18). Nor-lapachol (11), the naphthoquinone compound 7, the phenazines prepared from lapachol (14, 16) and phenazine (19) derived from C-allyl lawsone were less active (SI < 100). Other compounds displayed a low SI (10, 13, 15 and 20) and were thus less promising; one compound (8) exhibited an SI value of 10 and was considered toxic. A near two-fold increase in cytotoxicity between HepG2 and BGM cells was observed for compounds 12, 15, 19 and 20.

To determine the in vivo activity of the selected compounds, 2, 5 and 11 were next evaluated against malaria infection caused by *P. berghei*. Both compounds were found to be active by reducing parasitaemia by up to 63%, whereas nor-lapachol (compound 11) was inactive in vivo (Table II). Analysis of the experimental compounds was

TABLE I

Activity of quinones and phenazines against *Plasmodium falciparum* inhibitory concentration for 50% (IC_{50}) measured through the anti-histidine-rich protein II (HRPII) method, cytotoxicity [minimum lethal dose of 50% cells (MLD_{50})] against two different cell lines a human hepatoma (HepG2) and a normal monkey kidney (BGM) and selectivity indexes (SI) a ratio MDL_{50}/IC_{50}

| Compounds | IC_{50} | HepG2 | | BGM | |
|-------------|------------------|---------------------|-------|---------------------|-------|
| | | MLD_{50} | SI | MLD_{50} | SI |
| 2 | 1.3 \pm 0.4 | $\geq 3,363.1$ | 2,564 | $\geq 3,363.1$ | 2,564 |
| 3 | 16.8 \pm 3.4 | $\geq 3,685.8$ | 220 | $\geq 3,685.8$ | 220 |
| 4 | 14.1 \pm 7.0 | $\geq 3,886.7$ | 276 | $\geq 3,886.7$ | 276 |
| 5 | 1.9 \pm 0.7 | 2,075.1 \pm 316.5 | 1,074 | 2,468.4 \pm 239.7 | 1,299 |
| 6 | 30.6 \pm 5.7 | $\geq 4,324.4$ | 141 | $\geq 4,324.4$ | 141 |
| 7 | 11.2 \pm 2.3 | 331.1 \pm 105.3 | 29 | 256.6 | 23 |
| 8 | 59.9 \pm 7.7 | 188.0 \pm 34.7 | 3 | 321.5 \pm 28.3 | 5.4 |
| 9 | 110.4 \pm 12.2 | 2,497.6 \pm 546.9 | 23 | $\geq 3,672.4$ | 33 |
| 10 | 93 \pm 20.5 | 1,491.7 \pm 321.4 | 16 | 1,785.1 \pm 888.3 | 19 |
| 11 | 26.9 \pm 0.9 | 1,698.6 \pm 94.8 | 63 | 1,608.8 \pm 221.8 | 60 |
| 12 | 12.7 \pm 2.0 | $\geq 4,127.6$ | 324 | 1,388.9 \pm 592.5 | 109 |
| 13 | ≥ 265.7 | 5,308.2 \pm 8.3 | 20 | $\geq 5,314.1$ | 20 |
| 14 | 47.5 \pm 1.1 | $\geq 1,803$ | 38 | $\geq 1,803$ | 38 |
| 15 | ≥ 94.2 | 1,041.0 \pm 58.5 | 11 | $\geq 1,884.6$ | 20 |
| 16 | 20.6 \pm 2.6 | 951.6 \pm 115.6 | 46 | 632.8 \pm 11.4 | 31 |
| 17 | 9.0 \pm 0.1 | $\geq 3,120.8$ | 348 | - | - |
| 18 | 13.4 \pm 2.2 | $\geq 3,492.5$ | 260 | $\geq 3,492.5$ | 260 |
| 19 | 60.5 \pm 9.2 | $\geq 2,005.9$ | 33 | 752 \pm 169.9 | 12 |
| 20 | ≥ 99.5 | $\geq 1,989.8$ | 20 | 1,047.6 \pm 43.6 | 10 |
| Chloroquine | 0.3 \pm 0.02 | 460.4 \pm 97.3 | 1,535 | 462.3 \pm 2.7 | 1,541 |

TABLE II
Antimalarial activity of nor-lapachol (11) and of the naphthoquinones 2 and 5 active in vitro, tested in mice with *Plasmodium berghei*-malaria and orally treated with 100 mg/kg drug dose for three consecutive days

| Compounds ^a | Inhibition of parasitaemia at days after parasite inoculation (%) | | |
|------------------------|---|-------|----------|
| | Fifth | Ninth | Activity |
| 2 | 63 | 41 | Yes |
| 5 | 63 | 48 | Yes |
| 11 | 21 | 21 | No |
| Chloroquine | 100 | 100 | Cure |

a: the experiment was performed in parallel with chloroquine, which cleared parasitaemia and allowed all mice to survive after treatment with a 20 mg/kg dose.

performed once and in parallel to chloroquine, which served as a control antimalarial agent, clearing parasitaemia even at low doses (20 mg/kg) and maintaining survival of the mice. The other treated animals succumbed to malaria infection with no delay in mortality caused by drug treatment with the new compounds.

DISCUSSION

The synthetic strategy for the preparation of the 2-hydroxy-3-methylamino naphthoquinoidal derivatives (2-9) was used to obtain substances with aliphatic (5-8) and cyclic (2-4 and 9) substituents (Lima et al. 2002, da Silva Júnior et al. 2012). This approach mimics the non-polar portion of atovaquone. The quinoidal compounds were prepared in only one step using accessible reactants. The structures of these naphthoquinonoid compounds have been previously published, although our study is the first to report their potent activity against *P. falciparum* parasites. The synthetic methods described in this study were completed with commercial reactants and at high yields for quinoidal structures based on atovaquone. These compounds were prepared through a single step synthesis in contrast to the production of atovaquone, which is generally obtained in four steps. The phenazine compounds were easily prepared from lapachol derivatives and their activities have been described as antitumoural (da Silva Júnior et al. 2011) and antimicrobial (Carneiro et al. 2011).

Our results showed that compounds 2 and 5 were active against *P. falciparum* in vitro, exhibiting high SIs and promising therapeutic activity, similar to that of chloroquine. We considered the SI an ideal parameter to evaluate new antimalarials, as this index reflects both drug toxicity and activity, thereby excluding toxic compounds from further study. Using the SI as a screening parameter has also been reported in recent literature (No et al. 2012).

Establishing a structure-activity relationship for the compounds herein described was beyond the scope of

this initial study. Investigations into the antimalarial activity of these compounds after structural modification are currently underway in our laboratories and will be reported in future work after establishing a structure-activity relationship.

Compounds 2 and 5, which were highly active in vitro against *P. falciparum*, were also active against malaria in mice by inhibiting parasitaemia; however, they could not prevent mortality from malaria. All compounds were tested at high doses because previous studies have indicated that lapachol has low activity in vitro (Carvalho et al. 1988) compared with the new compounds described. All displayed a low in vivo activity compared do chloroquine. It is possible that these compounds possess low oral bioavailability, similar to most naphthoquinones (Ioset 2008). In addition, slow uptake and/or rapid elimination of their active metabolites have also been previously described (Zani et al. 1997).

In previous work, other phenazines derived from β -lapachone partially active against *P. falciparum* in vitro were only active against malaria in mice when administered subcutaneously, but not orally (Andrade-Neto et al. 2004b). Compounds 2 and 5 had a high therapeutic activity in vitro were tested only through oral administration in malaria-infected mice. These compounds were active despite limiting our study to oral administration.

The mechanism of quinone activity involves the generation of reactive oxygen species due to molecular structures that confer redox properties through reduction by one or two electrons. Oxidative stress and/or the alkylation of lipids, proteins and nucleic acids by naphthoquinones may lead to cell damage (Vilamil-Fernandez et al. 2004), which accounts for their antimalarial (dos Santos et al. 2004) and antileukemic (Cavalcanti et al. 2013) activities. The ability to collapse mitochondrial membrane potential has also been described for atovaquone (Srivastava et al. 1997) and other naphthoquinones active against *P. falciparum* (Schuck et al. 2013), a process that eventually leads to apoptosis or necrosis (Brand et al. 2004). Whether the mechanism of action of these molecules is related to such processes remains to be determined.

The cytotoxicity profiles were similar for all molecules using BGM or HepG2 cell lines. The two-fold differences observed for compounds 12, 15, 19 and 20 may be related to the distinct cellular processes exhibited by these two cells lines, which may have altered their sensitivity to the compounds.

In conclusion, among the 19 compounds evaluated for anti-*P. falciparum* activity, the naphthoquinones derived from lawsone (compounds 2 and 5) showed the highest activities with IC₅₀ values < 5 μ M. They also showed the highest therapeutic effects which were similar to or higher than that of chloroquine. In addition, the cytotoxicities of the majority of the tested compounds were low. Importantly, compounds 2 and 5 were shown to be active in vivo against malaria, causing a greater than 50% reduction of parasitaemia in mice infected with *P. berghei*. These compounds therefore show promise in the search for new antimalarial agents, with activities similar to that of atovaquone.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Profs Antonio V Pinto (*in memoriam*) and Maria do Carmo FR Pinto, for stimulating discussions and consistently excellent advice.

REFERENCES

- Aguiar ACC, da Rocha EMM, de Souza NB, França TCC, Krettli AU 2012. New approaches in antimalarial drug discovery and development: A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 831-845.
- Andrade-Neto VF, Brandão MGL, Oliveira FQ, Casali VWD, Njaine B, Zalis MG, Oliveira LA, Krettli AU 2004a. Antimalarial activity of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) ethanolic extracts from wild plants collected in various localities or plants cultivated in humus soil. *Phytother Res* 18: 634-639.
- Andrade-Neto VF, Goulart MFO, Silva-Filho JF, Matusalém JS, Pinto MCFR, Pinto AV, Zalis MG, Carvalho LH, Krettli AU 2004b. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. *Bioorg Med Chem Lett* 14: 1145-1149.
- Bézivin C, Tomasi S, Dévéhat FI, Boustie J 2003. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine* 10: 499-503.
- Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Parker N 2004. Mitochondrial superoxide: production, biological effects and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med* 37: 755-767.
- Carneiro PF, Pinto MC, Coelho TS, Cavalcanti BC, Pessoa C, de Simone CA, Nunes IK, de Oliveira NM, de Almeida RG, Pinto AV, de Moura KC, da Silva PA, da Silva Júnior EN 2011. Quinonoid and phenazine compounds: synthesis and evaluation against H₃₇Rv, rifampicin and isoniazid-resistance strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Med Chem* 46: 4521-4529.
- Carvalho LH, Rocha EM, Raslan DS, Oliveira AB, Krettli AU 1988. In vitro activity of natural and synthetic naphthoquinones against erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Braz J Med Biol Res* 21: 485-487.
- Cavalcanti BC, Barros FW, Cabral IO, Ferreira JR, Magalhães HI, Júnior HV, da Silva Júnior EN, de Abreu FC, Costa CO, Goulart MO, Moraes MO, Pessoa C 2011. Preclinical genotoxicology of nor- β -lapachone in human cultured lymphocytes and Chinese hamster lung fibroblasts. *Chem Res Toxicol* 24: 1560-1574.
- Cavalcanti BC, Cabral IO, Rodrigues FAR, Barros FWA, Rocha DD, Magalhães HIF, Moura DJ, Saffi J, Henriques JAP, Carvalho TSC, Moraes MO, Pessoa C, de Melo IMM, da Silva Júnior EN 2013. Potent antileukemic action of naphthoquinoid compounds: evidence for an intrinsic death mechanism based on oxidative stress and inhibition of DNA repair. *J Braz Chem Soc* 24: 145-163.
- Coutinho JP, Aguiar ACC, dos Santos PA, Lima JC, Rocha MGL, Zani CL, Alves TMA, Santana AEG, Pereira MM, Krettli AU 2013. *Aspidosperma* (Apocynaceae) plant cytotoxicity and activity towards malaria parasites. Part I: *Aspidosperma nitidum* (Benth) used as a remedy to treat fever and malaria in the Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 974-982.
- da Silva Júnior EN, Cavalcanti BC, Guimarães TT, Pinto MCFR, Cabral IO, Pessoa C, Costa-Lotuf LV, Moraes MO, Andrade CKZ, Santos MR, Simone CA, Goulart MOF, Pinto AV 2011. Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines. *Eur J Med Chem* 46: 399-410.
- da Silva Júnior EN, Melo IMM, Diogo EBT, Costa VA, de Souza Filho JD, Valença WO, Camara CA, Oliveira RN, Araújo AS, Emery FS, Santos MR, Simone CA, Menna-Barreto RFS, Castro SL 2012. On the search for potential anti-*Trypanosoma cruzi* drugs: synthesis and biological evaluation of 2-hydroxy-3-methylamino and 1,2,3-triazolic naphthoquinoid compounds obtained by click chemistry reactions. *Eur J Med Chem* 52: 304-312.
- da Silva Júnior EN, Pinto MCFR, de Moura KCG, de Simone CA, Nascimento CJ, Andrade CKZ, Pinto AV 2009. Hooker's lapachol peroxide revisited. *Tetrahedron Lett* 50: 1575-1577.
- de Castro SL, Emery FS, da Silva Júnior EN 2013. Synthesis of quinonoid molecules: strategies towards bioactive compounds with an emphasis on lapachones. *Eur Med Chem* 69: 678-700.
- de Madureira MC, Martins AP, Gomes M, Paiva J, Cunha AP, Rosário V 2002. Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tomé and Príncipe islands. *J Ethnopharmacol* 81: 23-29.
- Denizot F, Lang R 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89: 271-277.
- Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, Lwin KM, Ariey F, Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NP, Lindegardh N, Socheat D, White NJ 2009. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 361: 455-467.
- dos Santos AF, Ferraz PAL, Pinto AV, Pinto MCFR, Goulart MOF, Sant'Ana AEG 2000. Molluscicidal activity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones and derivatives. *Int J Parasitol* 30: 1199-1202.
- dos Santos EVM, Carneiro JWM, Ferreira VF 2004. Quantitative structure-activity relationship in aziridinyl-1,4-naphthoquinone antimalarials: study of theoretical correlations by the PM3 method. *Bioorg Med Chem* 12: 87-93.
- Dressman JB, Reppas C 2000. In vitro-in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. *Eur J Pharm Sci* 11 (Suppl): S73-S80.
- Fieser LF, Fieser M 1948. Naphthoquinone antimalarials. XII. The Hooker oxidation reaction. *J Am Chem Soc* 70: 3215-3222.
- Fivelman QL, Butcher GA, Adagu IS, Warhurst DC, Pasvol G 2002. Malarone treatment failure and in vitro confirmation of resistance of *Plasmodium falciparum* isolate from Lagos, Nigeria. *Malar J* 1: 1.
- Fry M, Pudney M 1992. Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80). *Biochem Pharmacol* 43: 1545-1553.
- Graf PCF, Durand S, Antonio CA, Montalvan C, Montoya MG, Green MD, Santolalla ML, Salas C, Lucas C, Bacon DJ, Fryauff DJ 2012. Failure of supervised chloroquine and primaquine regimen for the treatment of *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. *Malar Res Treat* 2012: 1-5.
- Hooker SC 1936. The constitution of lapachol and its derivatives. The structure of Paterno's iso-lapachol. *J Am Chem Soc* 59: 1190-1195.
- Ioset JR 2008. Natural products for neglected diseases: a review. *Curr Org Chem* 12: 643-666.
- Lagrotta MHC, Wigg MD, do Santos MGM, Pinto AV, Pinto MCFR 1988. Atividade antivirótica de naftoquinonas: II. Derivados 1,4-naftoquinônicos frente a enterovírus. *Rev Microbiol* 19: 338-342.
- Lambros C, Vanderberg JP 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* 65: 418-420.
- Leffler MT, Hathaway RJ 1948. Naphthoquinone antimalarials: 2-hydroxy-3-substituted-aminoethyl derivatives by the Mannich reaction. *J Am Chem Soc* 70: 3222-3223.
- Lima NMF, Correia CS, Ferraz PAL, Pinto AV, Pinto MCFR, Santana AEG, Goulart MOF 2002. Molluscicidal hydroxynaphthoquinones and derivatives. Correlation between their redox

- potentials and activity against *Biomphalaria glabrata*. *J Braz Chem Soc* 13: 822-829.
- Lourenço AL, Abreu PA, Leal B, da Silva Jr EN, Pinto AV, Pinto MCFR, Souza AMT, Novais JS, Paiva MB, Cabral LM, Rodrigues CR, Ferreira VF, Castro HC 2011. Identification of nor- β -lapachone derivatives as potential antibacterial compounds against *Enterococcus faecalis* clinical strain. *Curr Microbiol* 62: 684-689.
- Makgatho ME, Anderson R, O'Sullivan JF, Egan TJ, Freese JA, Cornelius N, van Rensburg CEJ 2000. Tetramethylpiperidine-substituted phenazines as novel anti-plasmodial agents. *Drug Dev Res* 50: 195-202.
- Marques MM, Costa MR, Santana Filho FS, Vieira JL, Nascimento MT, Brasil LW, Nogueira F, Silveira H, Reyes-Lecca RC, Monteiro WM, Lacerda MV, Alecrim MG 2014. *Plasmodium vivax* chloroquine resistance and anemia in the western Brazilian Amazon. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 342-347.
- McKeage K, Scott L 2003. Atovaquone/proguanil: a review of its use for the prophylaxis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Drugs* 63: 597-623.
- No JH, Dossin FM, Zhang Y, Liu YL, Zhu W, Feng X, Yoo JA, Lee E, Wang K, Hui R, Freitas-Junior LH, Oldfield E 2012. Lipophilic analogs of zoledronate and risedronate inhibit *Plasmodium* geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPPS) and exhibit potent antimalarial activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 4058-4063.
- Noedl H, Wongsrichanalai C, Miller R, Myint K, Looareesuwan S, Sukthana Y, Wongchotigul V, Kollaritsch H, Wiedermann G, Wernsdorfer W 2002. *Plasmodium falciparum*: effect of antimalarial drugs on the production and secretion characteristics of histidine-rich protein II. *Exp Parasitol* 102: 157-163.
- Peters W, Portus JH, Robinson BL 1975. The four-day suppressive in vivo antimalarial test. *Ann Trop Med Parasitol* 69: 155-171.
- Pinto MCFR, Pinto AV, Oliveira CGT 1980. Síntese de naftoquinonas naturais a partir do lapachol. *An Acad Bras Cienc* 52: 481-482.
- Price RN, Douglas NM, Anstey NM 2009. New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. *Curr Opin Infect Dis* 22: 430-435.
- Rieckmann K, Campbell G, Sax L, Mrema J 1978. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An in vitro microtechnique. *Lancet* I: 22-23.
- Schuck DC, Ferreira SB, Cruz LN, da Rocha DR, Moraes M, Nakabashi M, Rosenthal PJ, Ferreira VF, Garcia CR 2013. Biological evaluation of hydroxynaphthoquinones as anti-malarials. *Malar J* 12: 234-239.
- Shapiro TA, Ranasinha CD, Kumar N, Barditch-Crovo P 1999. Prophylactic activity of atovaquone against *Plasmodium falciparum* in humans. *Am J Trop Med Hyg* 60: 831-836.
- Srivastava IK, Hagai R, Akhil BV 1997. Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. *J Biol Chem* 272: 3961-3966.
- Trager W, Jensen JB 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193: 673-675.
- Vaidya AB, Mather MW 2000. Atovaquone resistance in malaria parasites. *Drug Resist Updat* 3: 283-287.
- van Rensburg CE, Joone GK, Sirgel FA, Matlola NM, O'Sullivan JF 2000. In vitro investigation of the antimicrobial activities of novel tetramethylpiperidine-substituted phenazines against *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemotherapy* 46: 43-48.
- Vilamil-Fernandez S, Stoppani AOM, Dubin M 2004. Redox cycling of β -lapachone and structural analogues in microsomal and cytosol liver preparations. *Methods Enzymol* 378: 67-87.
- Wang W, Prévile P, Morin N, Mounir S, Cai W, Siddiqui MA 2000. Hepatitis C viral IRES inhibition by phenazine and phenazine-like molecules. *Bioorg Med Chem Lett* 10: 1151-1154.
- WHO - World Health Organization 2011. World Malaria Report. Available from: who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/.
- WHO - World Health Organization 2012. World Malaria Report. Available from: who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/en/.
- Zani CL, Chiari E, Krettli AU, Murta SM, Cunningham ML, Fairlamb AH, Romanha AJ 1997. Anti-plasmodial and anti-trypanosomal activity of synthetic naphtho[2,3-b]thiopen-4,9-quinones. *Bioorg Med Chem* 12: 2185-2192.

5.3 Artigo 3 (em preparação): Atividade citocida e citostática de AnCQs

CYTOCIDAL AND CYTOSTATIC ACTIVITIES OF CHLOROQUINE ANALOGS AGAINST *P. falciparum* BLOOD PARASITES *in vitro*

Nicolli Bellotti de Souza¹, Arturene M. L. Carmo², Adilson David da Silva², Antoniana U. Krettli^{1*}

¹Laboratório de Malária, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ-MG, Belo Horizonte, Minas Gerais

²Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora

*Corresponding author

Antoniana Ursine Krettli

akrettli@cpqrr.fiocruz.br

+55-31-3349-7770; FAX +55-31-3295-3115.

ABSTRACT

An approach in the search of drugs aiming at better antimalarials focus on the evaluation of their antiplasmodial cytocidal potential (which refers to effectively kill parasites) rather than the cytostatic (to prevent their growth) only, as raised by Paul Roepe's group (Paguio et al. 2011, Mol Biochem Parasitol, 178(1-2):1-6; Gorka et al. 2013, Antimicrob Agents Chemother 57(1):356-364; Gorka et al. 2013, Antimicrob Agents Chemother 57(1):365-374). Aiming to clarify such modes of action, two chloroquine (CQ) analogs (CQAn33 and 37), previously shown to be potent antiplasmodial agents *in vitro* and *in vivo* (de Souza et al. 2014, MalJ 13:469), had their cytocidal and cytostatic activities evaluated against CQ-resistant (CQ-R) or -sensitive (CQ-S) *P. falciparum* parasites. The CQAn33 was shown to be as cytocidal and cytostatic as CQ against CQ-R parasites; CQAn37 was more active against CQ-S parasites. The cytocidal activities of both CQAn were similar against CQ-R and CQ-S parasites, while the cytostatic were lower against CQ-R parasites. In addition, CQAn33 resistance index (RI, defined as the ratio of cytocidal or cytostatic activities between CQ-R and CQ-S parasites) was the lowest. These results highlight the differences concerning cytocidal and cytostatic potencies of antimalarial candidates. They also suggest different mechanisms of action for the CQAn, probably a consequence of their chemical structure, and/or different targets of their cytocidal and cytostatic activities. Considering the current malaria scenario, outlined by increasing resistance of *P. falciparum* to antimalarials, as well as by return of its susceptibility to chloroquine, along with *P. vivax* resistance to CQ, our results also point CQAn33 as a surrogate for CQ against CQ-R parasites and CQAn37 against CQ-S parasites.

Key-words: cytocidal, cytostatic, chloroquine analogs, *Plasmodium falciparum*.

INTRODUCTION

Malaria was responsible for an estimated 584,000 deaths in 2013, most of which occurred in sub-Saharan Africa and in children under five (WHO, 2014). Treatment with the appropriate antimalarial medicines is one important measure to control the disease, unfortunately hampered by *Plasmodium falciparum* drug resistance, including to artemisinin derivatives in drug combinations, namely the Artemisinin-Combined Therapy (ACT), in Southeast Asia (Phyo et al, 2012; Miotto et al, 2013), in addition to parasite low sensitivity recently described in Africa (Ashley et al, 2014). Resistance of *P. vivax* to CQ is also described (Imwong et al, 2008; Graf et al, 2012; Marques et al, 2014)

Resistance to antimalarials has been depicted through assays that reflect their cytostatic potency i.e. that prevents parasite growth, and represented by IC₅₀. However, the potential to effectively kill the parasite, i.e., cytotoxic potency, has been overlooked. This shift has been highlighted considering such drug effects on resistance management and disease control (Paguio et al, 2011; Gorka et al 2013a; Gorka et al, 2013b). New antiplasmodial agents with enhanced cytotoxic potency, rather than cytostatic, must therefore be available, given the spread of resistance to chloroquine, the most widely employed antimalarial in the past due to its high efficacy and low cytotoxicity.

Prompted by the outstanding antiplasmodial activity of two chloroquine analogs (CQAn33 and 37), which exhibited higher selectivity indexes than CQ *in vitro* and were active *in vivo* (de Souza et al, 2011; de Souza et al, 2014), the present work was undertaken to evaluate their cytotoxic and cytostatic activities against CQ-sensitive and CQ-resistant *P. falciparum* parasites, using previously described protocols (Paguio et al, 2011). The Resistance Indexes (RI), which reflect the chances of parasites developing resistance to these CQAns, were also calculated.

MATERIAL AND METHODS

Synthesis of CQAn33 and CQAn37

Drug synthesis was performed as previously reported by Da Silva A.D. group (Carmo et al, 2011). In brief, 4-alkyldiamino-7-chloroquinolines were treated with 2 eq. of propargyl bromide and K₂CO₃ in EtOH at 0°C for 72 h to produce CQAn33 at a 50% to 60% yield. The addition of 4 eq. of propargyl bromide under the same conditions provided CQAn37 at a 50%

to 60% yield (**Figure 1**). All the compounds were characterized via one-dimensional nuclear magnetic resonance (1D-NMR), infrared (IR) spectroscopy, and melting point (MP) assays. The results were in accordance with data in the literature (Carmo et al, 2011).

***P. falciparum* tests to evaluate cytotoxic and cytostatic activities**

CQ-resistant (CQ-R, W2 clone) and -sensitive (CQ-S, 3D7 strain) forms of the *P. falciparum* parasites were cultured according to Trager & Jensen (1976), and synchronized with sorbitol (Lambros & Vanderberg, 1979) immediately before the *in vitro* tests to concentrate the ring stage parasites. The CQAn and CQ (chloroquine diphosphate, Sigma-Aldrich) were solubilized in dimethyl-sulfoxide (DMSO) and complete medium, respectively.

The anti-*P. falciparum* cytotoxic (LC_{50}) and cytostatic (IC_{50}) activities were evaluated as described in Paguio et al (2011) with minor modifications. SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, Molecular Probes, refS33102) was used to measure parasite growth by comparing parasite growth in the drug-free control cultures, considered as representative of 100% growth, with that in the drug test-cultures. A sigmoidal dose-response curve enabled the determination of LC_{50} or IC_{50} values for each drug, generated through a curve-fitting software (Microcal Origin Software 5.0, Inc.). Two to four experiments were performed for each molecule tested in triplicate; CQ was used as a control.

Resistance Indexes (RI) of CQAns and CQ were calculated as a ratio of LC_{50} or IC_{50} between CQ-R and CQ-S parasites.

RESULTS

CQAn33 exhibited LC_{50} similar to that of CQ ($20.1 \pm 1.7 \mu\text{M}$ and $15.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$, respectively) against CQ-R parasites, eight times lower than that of CQAn37 ($LC_{50} = 161.5 \pm 7.0 \mu\text{M}$). The IC_{50} of CQAn33 and CQ were also similar ($0.35 \pm 0.03 \mu\text{M}$ and $0.25 \pm 0.09 \mu\text{M}$, respectively), which was around 4 times higher for CQAn37 ($1.34 \pm 0.34 \mu\text{M}$). Regarding the activity against CQ-S parasites, none of the CQAn exhibited cytotoxic or cytostatic activities higher than those of CQ.

Comparing CQ-R and CQ-S parasites with regard to cytotoxic activity, CQAn had similar LC_{50} . The IC_{50} for CQAn were lower against CQ-R parasites in comparison to CQ-S parasites (**Table 1**).

Table 1- Evaluation of the cytotoxic (LC₅₀) and cytostatic (IC₅₀) activities of chloroquine (CQ) and two analogues (CQAn33 and CQAn37) against *P. falciparum* CQ-R or CQ-S parasites *

| Molecule | W2 | | 3D7 | |
|----------|-----------|------------|--------------|-------------|
| | Cytocidal | Cytostatic | Cytocidal | Cytostatic |
| CQAn33 | 20.1±1.7 | 0.35±0.03 | 21.89±0.14 | 12.86±6.60 |
| CQAn37 | 161.5±7.0 | 1.34±0.34 | 142.39±14.44 | 4.03±1.34 |
| CQ | 15.5±0.2 | 0.25±0.09 | 9.69±0.78 | 0.107±0.004 |

* Results in μM represent the average±SD of two to four experiments.

The resistance indexes (RI) were similar for CQAn33 and CQ considering the LC₅₀. Regarding the cytostatic activity, however, the RI differed substantially and CQAn33 exhibited the lowest RI, around 10 and 86-fold lower than that of CQAn37 and CQ, respectively (Table 2).

Table 2- Resistance Indexes of chloroquine (CQ), CQAn33 and CQAn37, according to their cytotoxic or cytostatic activities.

| Molecule | RI (W2/3D7) | |
|----------|-------------------------------|--------------------------------|
| | Cytocidal (LC ₅₀) | Cytostatic (IC ₅₀) |
| CQAn33 | 0.920 | 0.027 |
| CQAn37 | 1.134 | 0.332 |
| CQ | 1.6 | 2.33 |

DISCUSSION

With the aim to provide new antimalarial prototypes better than CQ, an up-to-date approach has been used to evaluate the modes of action the analogs CQAn33 and CQAn37, rather promising, based in previous recent *in vitro* results (de Souza et al, 2014).

The cytotoxic potential of CQAn33 was similar to that of CQ against the CQ-R parasites, whereas CQAn37 was much less effective as a cytotoxic agent. These structurally-distinct CQAn may cause different interactions with heme, owed to their geometry, as shown for other quinolines such as quinine and their derivatives (Gorka et al, 2013c). Indeed, CQAn37 was less effective in inhibiting β -hematin formation in our previous work (de Souza

et al, 2014). Nevertheless, this issue deserves further studies to clarify the reason why this analogue is a less effective cytotoxic agent.

Although the data on CQAn33 and CQAn37 cytostatic activities obtained in this work using SYBR are in accordance with those in previous work using the anti-HRP2 test (de Souza et al, 2014), that is to say, CQAn33 is the best molecule against CQ-R parasites while CQAn37 is the best against CQ-S parasites, the IC_{50} value of the CQAn33 is higher. This may be a consequence of the distinct incubation periods: in this work, it is shorter than in the previous (around 48h *versus* 72h), accounting for lower IC_{50} values due to a longer contact with the compounds. Another possible explanation is that perhaps the complete killing effects of the CQAn evaluated herein will only be detectable at 72h or later, as it is the case of atovaquone, an antimalarial with a delayed-action profile (Sanz et al, 2012) that targets the parasite mitochondrion (Srivastava et al, 1997). Thus, as suggested before (de Souza et al, 2014) other mechanisms of action for these CQAns, besides inhibition of hemozoin formation, may be acting. Indeed, quinolines and their derivatives interfere with cell growth inhibiting proteasome, tyrosine kinases, DNA repair, and tubulin polymerization (Solomon & Lee, 2011). CQ itself has already been shown to inhibit topoisomeres I and II (Solary et al, 1994; Sorensen et al, 1997; Snyder, 2000), and DNA damage triggers apoptosis (Kaufmann & Hengartner, 2001). However, the plausibility of this possibility remains controversial due to the absence of apoptosis markers in *P. falciparum* (Sinai & Roepe, 2012) and molecular alterations in this process for CQ-R parasites (Gaviria et al, 2013), which leads to the speculation of autophagy being responsible for death of these parasites induced by CQ. In any case, parasite death due to these effects could only be measured after a full parasite cycle, i.e. after 48h, which is in line with the anti-HRP2 test providing reliable results for compounds that do not stop the parasite metabolism immediately (Wein et al, 2010).

The concentrations of CQAn needed to kill the parasites differed substantially from those necessary to just prevent their growth, suggesting that the target for these antiplasmodial activities may differ, as observed for other quinoline antimalarials (Paguio et al, 2011), including CQ (Gaviria et al, 2013). With respect to RI, the results also suggest that resistance-related mechanisms to cytotoxic effects of these CQAn differ from the cytostatic ones, as shown for CQ (Gaviria et al, 2013) and other quinoline antimalarials (Cabrera et al, 2009; Gorka et al, 2013b). The mechanisms of CQ-resistance to this antimalarial-cytostatic effects involve mutations in *P. falciparum* chloroquine resistance transporter (*PfCRT*) and/or *P. falciparum* multidrug resistance protein (*PfMDR1*), responsible for altered CQ-transport (Cooper et al, 2002; Sidhu et al, 2002; Cooper et al, 2007; Roepe, 2011). Resistance to

cytotoxic effects may otherwise be a consequence of changes in digestive-vacuole physiology (Bennett et al, 2004; Zhang et al, 2004; Gorka et al, 2013b) or mechanisms not related to metabolism of heme (Cabrera et al, 2009; Sinai & Roepe, 2012) such as a process similar to autophagy (Gaviria et al, 2013). A point that also needs clarification is whether these mechanisms function as alternative or additive ones.

CONCLUSIONS

The results show that CQAn33 is more cytostatic to CQ-R parasites than to the CQ-S ones. CQAn37 was more effective in preventing growth of CQ-S parasites. CQAn33 exhibited the lowest resistance-index value considering the cytostatic activity, indicating the lowest likelihood of developing resistance to this activity. The data presented here suggest that the target for cytostatic effects of these CQAn is different from targets to the cytotoxic ones. The amount of the molecules, as defined by the different concentrations used in the cytotoxic and cytostatic assays and their structure-activity relationships may affect distinct action/resistance-pathways. In addition, results highlight the possibility of other mechanisms of action for these CQAn and confirm previous data, pointing CQAn33 as a surrogate for CQ against CQ-R parasites and CQAn37 for the CQ-S ones. Overall, further studies are necessary to clarify the intriguing issues raised in this work.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the financial support from the Brazilian funding agencies MCT/CNPq/CT-Saúde/MS/SCTIE/DECIT (Edital PRONEX-55675/2009-2 and Edital Doenças Negligenciadas-404455/2012-3); to FAPEMIG (PRONEX-Project 16712); FIOCRUZ for providing facilities and mice, and to CNPq for the fellowships to the authors (AUK; NBS).

REFERENCES

Alumasa JN; Gorka AP; Casabianca LB; Comstock E; de Dios AC; Roepe PD. The Hydroxyl Functionality and a Rigid Proximal N Are Required for Forming a Novel Non-Covalent Quinine–Heme Complex. *J. Inorg. Biochem.* 2011, 105, 467–475

Ashley, E. A., Dhorda, M., Fairhurst, R. M., Amaratunga, C., Lim, P., Suon, S., ... & Samad, R. (2014). Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *New England Journal of Medicine*, 371(5), 411-423.

Bennett TN, Kosar AD, Ursos LM, Dzekunov S, Singh- Sidhu AB, Fidock DA, Roepe PD 2004. Drug Resistance-Associated pfCRT Mutations Confer Decreased Plasmodium falciparum Digestive Vacuolar pH. *Mol. Biochem Parasitol* (133):99–114.

Cabrera M, Paguio MF, Xie C, Roepe PD 2009. Reduced digestive vacuolar accumulation of chloroquine is not linked to resistance to chloroquine toxicity. *Biochem* 48:11152–11154.

Carmo AM, Silva FM, Machado PA, Fontes AP, Pavan FR, Leite CQ, Leite SR, Coimbra ES, Da Silva AD: Synthesis of 4-aminoquinoline analogues and their platinum(II) complexes as new antileishmanial and antitubercular agents. *Biomed Pharmacother* 2011, 65(3):204-209.

Casagrande M, Barteselli A, Basilico N, Parapini S, Taramelli D, et al. (2012). Synthesis and antiplasmodial activity of new heteroaryl derivatives of 7-chloro-4-aminoquinoline. *Bioorg Med Chem* 20(19):5965-79.

Cooper RA, Ferdig MT, Su XZ, Ursos LM, Mu J, Nomura T, Fujioka H, Fidock DA, Roepe PD, Wellems TE. 2002. Alternative mutations at position 76 of the vacuolar transmembrane protein PfCRT are associated with chloroquine resistance and unique stereospecific quinine and quinidine responses in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Pharmacol.* 61:35– 42.

Cooper RA, Lane KD, Deng B, Mu J, Patel JJ, Wellems TE, Su X, Ferdig MT. 2007. Mutations in transmembrane domains 1, 4, and 9 of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter alter susceptibility to chloroquine, quinine, and quinidine. *Mol. Microbiol.* 63:270–282. (Erratum, *Mol. Microbiol.* 64:1139 –1148.

de Dios AC; Tycko R; Ursos LMB; Roepe PD. NMR Studies of Chloroquine–Ferriprotoporphyrin IX Complex. *J. Phys. Chem. A* 2003, 107, 5821–5825.

de Souza NB, Carmo AML, Lagatta DC, Alves MJM, Fontes APS, et al. (2011). 4-aminoquinoline analogues and its platinum (II) complexes as antimalarial agents. *Biomed Pharmacother* 65(4):313-316.

de Souza NB, Carmo AML, Lagatta DC, Alves MJM, Fontes APS, et al. (2011). 4-aminoquinoline analogues and its platinum (II) complexes as antimalarial agents. *Biomed Pharmacother* 65(4):313-316.

de Souza NB, Carmo AM, da Silva AD, França TC, Krettli AU. 2014. Antiplasmodial activity of chloroquine analogs against chloroquine-resistant parasites, docking studies and mechanisms of drug action. *Malaria Journal* 2014, 13 :469

Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Physo AP, et al. (2009). Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 361(5): 455-467.

Egan TJ & Ncokazi KK. (2005). Quinoline antimalarials decrease the rate of β -hematin formation. *Journal of inorganic biochemistry*, 99(7), 1532-1539.

Egan TJ; Mavuso WW; Ross DC; Marques HM. Thermodynamic Factors Controlling the Interaction of Quinoline Antimalarial Drugs with Ferriprotoporphyrin IX. *J. Inorg. Biochem.* 1997, 68, 137-145

Gaviria, D., Paguio, M. F., Turnbull, L. B., Tan, A., Siriwardana, A., Ghosh, D., ... & Roepe, P. D. (2013). A process similar to autophagy is associated with cytotoxic chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *PloS one*, 8(11), e79059.

Gorka AP, de Dios A, Roepe PD 2013a. Quinoline drug-heme interactions and implications for antimalarial cytostatic versus cytotoxic activities. *J Med Chem* 56(13):5231-46.

Gorka AP, Alumasa JN, Sherlach KS, Jacobs LM, Nickley KB, Brower JP ... & Roepe PD 2013b. Cytostatic versus cytotoxic activities of chloroquine analogues and inhibition of hemozoin crystal growth. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(1), 356-364.

Gorka AP, Sherlach KS, de Dios AC, Roepe PD 2013c. Relative to quinine and quinidine, their 9-epimers exhibit decreased cytostatic activity and altered heme binding but similar cytotoxic activity versus *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 57(1):365-74.

Graf PC, Durand S, Alvarez Antonio C, Montalvan C, Galves Montoya, et al. (2012). Failure of Supervised Chloroquine and Primaquine Regimen for the Treatment of *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. *Mal Res Treat* 2012:936067.

- Hocart SJ, Liu H, Deng H, De D, Krogstad FM et al. (2011). 4-aminoquinolines active against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*: basis of antiparasite activity and quantitative structure-activity relationship analyses. *Antimicrob Agents Chemother* 55(5):2233-2244.
- Imwong, M., Pukrittayakamee, S., Pongtavornpinyo, W., Nakeesathit, S., Nair, S., Newton, P., ... & White, N. J. (2008). Gene amplification of the multidrug resistance 1 gene of *Plasmodium vivax* isolates from Thailand, Laos, and Myanmar. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(7), 2657-2659
- Iwaniuk, D. P., Whetmore, E. D., Rosa, N., Ekoue-Kovi, K., Alumasa, J., de Dios, A. C., ... & Wolf, C. (2009). Synthesis and antimalarial activity of new chloroquine analogues carrying a multifunctional linear side chain. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(18), 6560-6566.
- Kaur K, Jain M, Reddy RP, Jain R 2010. Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. *Eur J Med Chem* 45(8):3245-64.
- Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 526–534.
- Kim KA, Park JY, Lee JS, Lim S 2003. Cytochrome P450 2C8 and CYP3A4/5 are involved in chloroquine metabolism in human liver microsomes. *Arch Pharm Res* 26(8):631-7.
- Lambros C & Vanderberg JP. (1979). Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* 418-420.
- Leed A; DuBay K; Sears D; de Dios AC; Roepe PD. Solution Structures of Antimalarial Drug–Heme Complexes. *Biochemistry* 2002, 41, 10245–10255
- Lewis DFV 2000. Structural characteristics of human P450s involved in drug metabolism: QSARs and lipophilicity profiles. *Toxic* (144): 197–203.
- Li XQ, Björkman A, Andersson TB, Gustafsson LL, Masimirembwa CM 2003. Identification of human cytochrome P(450)s that metabolise anti-parasitic drugs and predictions of *in vivo* drug hepatic clearance from *in vitro* data. *Eur J Clin Pharmacol* 59(5-6):429-42.
- Lin JH, Lu AYH 1998. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet* (35) 361–390.

- Loria P, Miller S, Foley M, Tilley L. 1999. Inhibition of the Peroxidative Degradation of Haem as the Basis of Action of Chloroquine and Other Quinoline Antimalarials. *Biochem J* 339, 363–370.
- Marques MM, Costa MR, Santana Filho FS, Vieira JL, Nascimento MT, Brasil LW, Nogueira F, Silveira H, Reyes-Lecca RC, Monteiro WM, Lacerda MV, Alecrim MG. 2014. Plasmodium vivax chloroquine resistance and anemia in the western Brazilian Amazon. *Antimicrob Agents Chemother* 58(1):342-7
- Mezencev R, Galizzi M, Kutschy P, Docampo R 2009. Trypanosoma cruzi: antiproliferative effect of indole phytoalexins on intracellular amastigotes *in vitro*. *Exp Parasitol* 122(1):66-9.
- Miotto O, Almagro-Garcia J, Manske M, MacInnis B, Campino S, et al. (2013). Multiple populations of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum in Cambodia. *Nat Genet* 45(6):648-55.
- Olagnier D, Costes P, Berry A, Linas MD, Urrutigoity M, Dechy-Cabaret O, Benoit-Vical, F 2007. Modifications of the chemical structure of terpenes in antiplasmodial and antifungal drug research. *Bioorg Med Chem Lett* 17(22):6075-6078.
- Paguio MF, Bogle KL, Roepe PD 2011. Plasmodium falciparum resistance to cytotoxic versus cytostatic effects of chloroquine. *Mol Biochem Parasitol* 178(1-2):1-6.
- Phyo AP, Nkhoma S, Stepniewska K, Ashley EA, Nair S, et al. (2012). Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet* 379(9830): 1960-1966.
- Projean D, Baune B, Farinotti R, Flinois JP, Beaune P, Taburet AM, Ducharme J 2003. *In vitro* metabolism of chloroquine: identification of CYP2C8, CYP3A4, and CYP2D6 as the main isoforms catalyzing N-desethylchloroquine formation. *Drug Metab Dispos* 31(6):748-54.
- Rendic S & Di Carlo FJ 1997. Human cytochrome P450 enzymes: A status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and Inhibitors. *Drug Metab ReV* (29) 413–580.
- Rieckmann KH, Campbell GH, Sax LJ, Mrema JE. (1978). Drug sensitivity of Plasmodium falciparum. An *in vitro* microtechnique. *Lancet* 1:22–23.

Roepe PD 2011. PfCRT-Mediated Drug Transport in Malarial Parasites. *Biochemistry* 50:163–171

Sanz, L. M., Crespo, B., De-Cózar, C., Ding, X. C., Llergo, J. L., Burrows, J. N., ... & Gamo, F. J. (2012). *P. falciparum in vitro* killing rates allow to discriminate between different antimalarial mode-of-action. *PloS one*, 7(2), e30949.

Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP 1994. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* (270) 414–423.

Sidhu AB, Verdier-Pinard D, Fidock DA. 2002. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by *pfcr*t mutations. *Science* 298:210 -213.

Sinai AP, Roepe PD 2012. Autophagy in Apicomplexa: A life Sustainind Death Mechanism? *Trends Parasitol*: 28 358-364.

Snyder, R.D., 2000. Use of catalytic topoisomerase II inhibitors to probe mechanisms of chemical-induced clastogenicity in Chinese hamster V79 cells. *Environ.Mol.Mutagen.* 35, 13–21.

Solary, E., Bertrand, R., Pommier, Y., 1994. Apoptosis induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors in human leukemic HL-60 cells. *Leuk. Lymphoma* 15, 21–32.

Solomon, V., & Lee, H. (2011). Quinoline as a privileged scaffold in cancer drug discovery. *Current medicinal chemistry*, 18(10), 1488-1508.

Sorensen, M., Sehested, M., Jensen, P.B., 1997. pH-dependent regulation of camptothecin-induced cytotoxicity and cleavable complex formation by the antimalarial agent chloroquine. *Biochem. Pharmacol.* 54, 373–380.

Srivastava, I. K., Rottenberg, H., & Vaidya, A. B. (1997). Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. *Journal of Biological Chemistry*, 272(7), 3961-3966

Trager W & Jensen JB. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193(4254):673-675.

Viskin S & Long QT 1999. Syndromes and torsade de pointes. *Lancet* (354) 1625–1633

Wein, S., Maynadier, M., Van Ba, C. T., Cerdan, R., Peyrottes, S., Fraisse, L., & Vial, H. (2010). Reliability of antimalarial sensitivity tests depends on drug mechanisms of action. *Journal of clinical microbiology*, 48(5), 1651-1660.

World Health Organization (WHO), 2014. World Malaria Report 2014.

Zhang H, Paguio M, Roepe PD 2004. The Antimalarial Drug Resistance Protein Plasmodium falciparum Chloroquine Resistance Transporter Binds Chloroquine. *Biochem* (43):8290–8296.

Figures

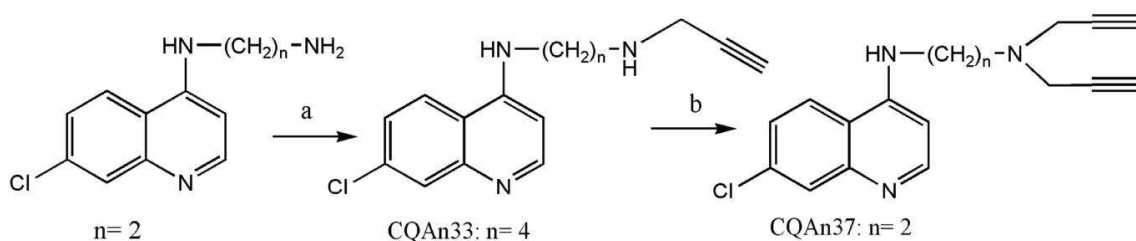


Figure 1- Scheme of synthesis of CQAn 33 and 37. a) 2 eq. propargyl bromide, K_2CO_3 , EtOH, $0^\circ C$, 72 h, yield: 50 to 60%; b) 4 eq. propargyl bromide, K_2CO_3 , EtOH, $0^\circ C$, 72 h, yield: 50 to 60%. Adapted from de Souza et al, 2014.

6 DISCUSSÃO

Os compostos estudados neste trabalho foram disponibilizados por colaboradores, sendo oriundos de produtos naturais, através de síntese química ou modificações de outros antimaláricos, utilizando reagentes de fácil acesso e a baixo custo.

Modificações estruturais na atovaquona forneceram esquizotocidas sanguíneos ativos contra *P. falciparum in vitro* e *P. berghei* em camundongos, com destaque para a naftoquinona **2** sendo seu índice de seletividade superior ao da CQ *in vitro*, apesar de menos ativa que a atovaquona *in vivo*; essa inibiu em 90% a parasitemia de camundongos na dose de 0,1 mg/Kg (Alzeer et al, 2000). As naftoquinonas **2** e **5** inibiram a parasitemia por *P. berghei* em 63% numa dose cinco vezes maior que a CQ. Sua baixa biodisponibilidade, característica das naftoquinonas (Ioset, 2008), e/ou rápida eliminação de metabólitos ativos (Zani et al, 1997), podem explicar o resultado.

As modificações estruturais na CQ forneceram análogos com intensa atividade *P. falciparum in vitro* e maior potencial terapêutico. Os AnCQ não mostraram resistência cruzada, com potencial terapêuticos superior ao da CQ, com modo de ação aparentemente diferente dos propostos para as 4-aminoquinolinas. Outros possíveis mecanismos de ação para os AnCQ seriam apoptose, autofagia, ou inibição do transporte mediado por glicoproteína P. Os resultados obtidos nesse trabalho, pelos estudos *in silico* com os AnCQ, apontaram a possível interação decorrente da energia de ligação entre eles e a *PfLDH*. Os AnCQ se mostraram fracos inibidores da enzima plasmodial e estudos de cinética enzimática são necessários para confirmar este fenômeno. Esse mecanismo não deve ser excluído, pois pode contribuir para a eficácia antiplasmodial dos AnCQ, dada a especificidade da ligação deles com a *PfLDH* em relação à *HssLDH*.

Para estudar possíveis modos de ação de alguns AnCQ, foram selecionados AnCQ33 e 37, com maiores índices de seletividade *in vitro* contra parasitos CQ-R. A avaliação da sua capacidade de causar inibição da formação de β -hematina e suas atividades citostática e citocida foram estudadas. Nestes últimos ensaios foram utilizadas concentrações elevadas dos AnCQ, nos quais o AnCQ33 mostrou potencial similar ao da CQ. Entretanto, parasitos expostos a tais concentrações por um curto período de tempo devem ser avaliados após a eliminação da pressão exercida pelo composto-teste numa cinética de crescimento parasitário mais ampla, em intervalos de tempo superiores a 48h, para determinar a velocidade de morte causada pela substância candidata a antimalárico e se ela seria responsável por recrudescência. Tais ensaios permitem inferir (i) o modo de ação da substância de acordo com

a velocidade com que elimina os parasitos, como rápido – a exemplo da artemisinina; médio, como a pirimetamina; e lento, como a atovaquona (Sanz et al, 2012); (ii) se o composto apenas reduz a viabilidade do parasito, efeito de “dormência” sugerido para a artemisinina (Teuscher et al, 2010; Codd et al, 2011; Cheng et al, 2012). O AnCQ34, com índices de seletividade *in vitro* elevados, similares contra parasitos CQ-R e CQ-S, além de intensa atividade *in vivo* contra parasitos CQ-S, dado relevante considerando o retorno da sensibilidade de *P. falciparum* à CQ em regiões endêmicas (Frosch et al, 2014).

Complexos de platina (AnCQPt) foram menos tóxicos que a CQ, a exemplo de outros estudos (Ajibade & Kolawole, 2008). Com exceção do AnCQPt28, os AnCQPt foram ativos contra *P. falciparum* CQ-R (clone W2), com a presença de alcinos aparentemente intensificando a atividade antiplasmodial, como descrito anteriormente (Olaghier et al, 2007). Sua atividade, no entanto, não foi intensificada após complexação, resultado talvez devido ao fato de que metais na forma complexada são menos tóxicos para o parasito que na forma iônica (Wasi et al, 1987). Pode ser resultado do modo de ação desses compostos, pois os centros quelantes dos complexos coordenados interagem de forma diferente com o ferro da metaloporfirina, influenciando sua atividade antimalárica (Chai et al, 1980). A permeabilidade da hemácia aos complexos metálicos também influencia na sua atividade, já que grupos sulfidrila (-SH) de proteínas de membrana da hemácia não reagem com complexos orgânicos ou metálicos (Rothstein, 1966). Moléculas mais ativas foram anteriormente obtidas pela complexação com rutênio (Glans et al, 2012) ou ouro (Navaro et al, 2004).

7 PERSPECTIVAS

Os compostos avaliados neste trabalho podem ser aprimorados para futuros estudos como protótipos antimaláricos em testes pré-clínicos e clínicos como novos fármacos; alguns mostraram intensa atividade específica contra *P. falciparum* e em camundongos com malária experimental.

Sendo o complexo citocromo *bc1* um alvo validado para terapia antimalárica, outras modificações estruturais podem potencializar a naftoquinona **2** como antimalárico, pois a atividade no sítio Q₀ – um dos sítios de ligação no complexo citocromo *bc1* – depende de características estruturais do inibidor de interesse (Stickles et al, 2015), as quais resultam na morte do parasito pelo comprometimento da síntese de pirimidinas, efeito causado pela atovaquona (Birth et al, 2014). Outros estudos evidenciando a ligação simultânea da naftoquinona **2** em Q₁ também são interessantes, já que ela é seletiva (Vaidya et al, 1993) e dificulta o surgimento de resistência por exigir mutações independentes e simultâneas numa mesma proteína.

A rápida eliminação de metabólitos ativos de naftoquinonas como **2** e **5** pode ser evitada pela sua associação com a ciclodextrina, visando melhorar sua biodisponibilidade (Del Valle, 2004). Essa estratégia foi eficaz para a artemisinina (Wong et al, 2001) e para um derivado ozonídeo (Charman et al, 2006). A biodisponibilidade pode também ser intensificada através da adição de ésteres e éteres ao grupo 3-hidroxi da atovaquona, diminuindo a ligação a proteínas plasmáticas e aumentando a lipofilia dos compostos (El Hage et al, 2009).

A administração por outras vias pode melhorar a atividade de compostos naftoquinoidais, como observado com outras fenazinas ativas pela via subcutânea, mas inativas por via oral (Andrade-Neto et al, 2004a).

Com relação aos outros possíveis mecanismos de ação propostos para os AnCQ, a apoptose pode ser avaliada pela utilização de anexina V, uma proteína conjugada a um fluoróforo que se liga à fosfatidilserina exposta na membrana plasmática da hemácia quando este processo é disparado (Van Engeland et al, 1998); ou pela técnica de TUNEL para detectar fragmentação do DNA (Gavrieli et al, 1992), um sinal apoptótico descrito em *P. falciparum* após exposição à CQ (Picot et al, 1997). A autofagia pode ser avaliada por microscopia eletrônica de transmissão ou de fluorescência com parasitos transgênicos expressando o marcador, como as proteínas semelhantes à ubiquitina *PfATG7* e *PfATG8* descritas em *P. falciparum* (Kitamura et al, 2012; Walker et al, 2013), ligado a uma proteína

fluorescente (Eickel et al, 2013) após a exposição à CQ (Totino et al, 2008). A inibição do transporte mediado por P-glicoproteína, cujo homólogo (Pgh) localiza-se na membrana do vacúolo digestivo do parasito e está relacionado com efluxo de fármacos (Le Bras & Durand, 2003) também pode ser avaliada, visto que a CQ inibe o transporte mediado por Pgh de N-metil-quinidina e proguanil (Rijpma et al, 2014). Os AnCQ podem ser avaliados em combinação com mefloquina, halofantrina, quinina ou artemisinina para aumentar a eficácia do tratamento antimalárico e evitar o surgimento e disseminação de parasitos resistentes, já que Pgh está associada à alteração da sensibilidade do parasito a esses antimaláricos (Reed et al, 2000; Sidhu et al, 2005).

Um obstáculo comumente enfrentado em testes de atividade biológica é a restrição de massa disponível para ensaios de biodisponibilidade e toxicidade aguda *in vivo*. Essenciais na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, esses testes devem ser realizados com os AnCQ33, 34, 37 e 39, além de ensaios *ex vivo* da atividade contra *P. vivax*, visto que esse parasito é amplamente distribuído no mundo e atualmente resistente à CQ. Além disso, o AnCQ33 deve ser avaliado em ensaios que permitam elucidar a cinética parasitária de uma forma mais ampla após a eliminação exercida pelo composto-teste, para determinar se ele de fato elimina os parasitos ou apenas reduz sua viabilidade.

Os AnCQ podem ser avaliados ainda em combinação com outro antimalárico com modo de ação distinto. Já os AnCQPt podem ser avaliados quanto à sua atividade antiplasmodial contra parasitos CQ-S, no intuito de demonstrar se a complexação com platina intensifica ou não a atividade dessas moléculas contra esses parasitos.

As populações de parasitos circulantes na área endêmica são compostas pela mistura de clones sensíveis e resistentes à CQ, o que torna os AnCQ33, 34, 37 e 39 as moléculas mais promissoras deste trabalho, visando o desenvolvimento de antimaláricos para o controle da doença, sendo essencial a sua produção em larga escala para testes clínicos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, A. C. C., da Rocha, E. M., de Souza, N. B., França, T. C., & Krettli, A. U. (2012). New approaches in antimalarial drug discovery and development: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(7), 831-845.

Ajibade, P. A., & Kolawole, G. A. (2008). Synthesis, characterization and antiprotozoal studies of some metal complexes of antimalarial drugs. *Transition Metal Chemistry*, 33(4), 493-497.

Alecrim, M. D. G. C., Alecrim, W., & Macêdo, V. (1999). *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32(1), 67-68.

Alzeer, J., Chollet, J., Heinze-Krauss, I., Hubschwerlen, C., Matile, H., & Ridley, R. G. (2000). Phenyl β -methoxyacrylates: A new antimalarial pharmacophore. *Journal of medicinal chemistry*, 43(4), 560-568

Amino, R., Thiberge, S., Martin, B., Celli, S., Shorte, S., Frischknecht, F., & Ménard, R. (2006). Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nature medicine*, 12(2), 220-224.

Andrade-Neto, V. F., Goulart, M. O., da Silva Filho, J. F., da Silva, M. J., Pinto, M. D. C. F., Pinto, A. V., ... & Krettli, A. U. (2004)a. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* *in vitro* and *Plasmodium berghei* *in vivo*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 14(5), 1145-1149.

Andrade-Neto, V. F., Brandão, M. G., Oliveira, F. Q., Casali, V. W., Njaine, B., Zalis, M. G., ... & Krettli, A. U. (2004)b. Antimalarial activity of *Bidens pilosa* L.(Asteraceae) ethanol extracts from wild plants collected in various localities or plants cultivated in humus soil. *Phytotherapy Research*, 18(8), 634-639.

Anstey, N. M., Russell, B., Yeo, T. W., & Price, R. N. (2009). The pathophysiology of *vivax* malaria. *Trends in parasitology*, 25(5), 220-227.

Ariey, F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Beghain, J., Langlois, A. C., Khim, N., ... & Ménard, D. (2014). A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 505(7481), 50-55

Ashley, E. A., Dhorda, M., Fairhurst, R. M., Amaratunga, C., Lim, P., Suon, S., ... & Samad, R. (2014)a. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *New England Journal of Medicine*, 371(5), 411-423.

Ashley, E. A., Recht, J., & White, N. J. (2014)b. Primaquine: the risks and the benefits. *Malaria journal*, 13(1), 418.

Baker, D. A. (2010). Malaria gametocytogenesis. *Molecular and biochemical parasitology*, 172(2), 57-65.

Basilico, N., Pagani, E., Monti, D., Olliaro, P., & Taramelli, D. (1998). A microtitre-based method for measuring the haem polymerization inhibitory activity (HPIA) of antimalarial drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42(1), 55-60.

Beadle, C., Long, G. W., McElroy, P. D., Hoffman, S. L., Long, G. W., Weiss, W. R., ... & Oloo, A. J. (1994). Diagnosis of malaria by detection of *Plasmodium falciparum* HRP-2 antigen with a rapid dipstick antigen-capture assay. *The Lancet*, 343(8897), 564-568.

Bellanca, S., Summers, R. L., Meyrath, M., Dave, A., Nash, M. N., Dittmer, M., ... & Lanzer, M. (2014). Multiple Drugs Compete for Transport via the *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter at Distinct but Interdependent Sites. *Journal of Biological Chemistry*, 289(52), 36336-36351

Bezivin, C., Tomasi, S., Lohezic-Le Devehat, F., & Boustie, J. (2003). Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*, 10(6), 499-503.

Birth, D., Kao, W. C., & Hunte, C. (2014). Structural analysis of atovaquone-inhibited cytochrome bc1 complex reveals the molecular basis of antimalarial drug action. *Nature communications*, 5

- Björkman, A., & Phillips-Howard, P. A. (1990). The epidemiology of drug-resistant malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(2), 177-180.
- Borenfreund, E., Babich, H., & Martin-Alguacil, N. (1988). Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays—the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicology in vitro*, 2(1), 1-6.
- Brand, M. D., Affourtit, C., Esteves, T. C., Green, K., Lambert, A. J., Miwa, S., ... & Parker, N. (2004). Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(6), 755-767.
- Bray, P. G., Mungthin, M., Ridley, R. G., & Ward, S. A. (1998). Access to hemozoin: the basis of chloroquine resistance. *Molecular Pharmacology*, 54(1), 170-179.
- Buss, A.D., Waigh, R.D. (1975) Natural products as leads for new pharmaceuticals, in: M.E. Wolff (Ed.), *Burger's medicinal chemistry and drug discovery. Principles and practice, vol. 1*, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, pp. 983–1033
- Calvocalle, J. M., Moreno, A., Eling, W. M. C., & Nardin, E. H. (1994). *In Vitro* Development of Infectious Liver Stages of *P. yoelii* and *P. berghei* Malaria in Human Cell Lines. *Experimental parasitology*, 79(3), 362-373.
- Carmo, A. M., Silva, F., Machado, P. A., Fontes, A. P., Pavan, F. R., Leite, C. Q., ... & Da Silva, A. D. (2011). Synthesis of 4-aminoquinoline analogues and their platinum (II) complexes as new antileishmanial and antitubercular agents. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 65(3), 204-209.
- Carvalho, L. H., Brandao, M. G., Santos-Filho, D., Lopes, J. L., & Krettli, A. U. (1990). Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied *in vivo* in *Plasmodium berghei*-infected mice and *in vitro* against *Plasmodium falciparum* in culture. *Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica...[et al.]*, 24(11), 1113-1123.

- Casagrande, M., Barteselli, A., Basilico, N., Parapini, S., Taramelli, D., & Sparatore, A. (2012). Synthesis and antiplasmodial activity of new heteroaryl derivatives of 7-chloro-4-aminoquinoline. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(19), 5965-5979.
- Chai, A., Chevli, R., & Fitch, C. (1980). Ferriprotoporphyrin IX fulfills the criteria for identification as the chloroquine receptor of malaria parasites. *Biochemistry*, 19(8), 1543-1549.
- Charman, S. A., Arbe-Barnes, S., Bathurst, I. C., Brun, R., Campbell, M., Charman, W. N., ... & Vennerstrom, J. L. (2011). Synthetic ozonide drug candidate OZ439 offers new hope for a single-dose cure of uncomplicated malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(11), 4400-4405.
- Charman, S. A., Perry, C. S., Chiu, F. C., McIntosh, K. A., Prankerd, R. J., & Charman, W. N. (2006). Alteration of the intravenous pharmacokinetics of a synthetic ozonide antimalarial in the presence of a modified cyclodextrin. *Journal of pharmaceutical sciences*, 95(2), 256-267
- Cheng, Q., Kyle, D. E., & Gatton, M. L. (2012). Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*: A process linked to dormancy?. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, 249-255.
- Chiodini, P. L., Conlon, C. P., Hutchinson, D. B. A., Farquhar, J. A., Hall, A. P., Peto, T. E. A., ... & Warrell, D. A. (1995). Evaluation of atovaquone in the treatment of patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 36(6), 1073-1078.
- Codd, A., Teuscher, F., Kyle, D. E., Cheng, Q., & Gatton, M. L. (2011). Artemisinin-induced parasite dormancy: a plausible mechanism for treatment failure. *Malar J*, 10(56), 1362-1368.
- Combrinck, J. M., Mabothe, T. E., Ncokazi, K. K., Ambele, M. A., Taylor, D., Smith, P. J., ... & Egan, T. J. (2012). Insights into the role of heme in the mechanism of action of antimalarials. *ACS chemical biology*, 8(1), 133-137.

Cooper, R. A., Ferdig, M. T., Su, X. Z., Ursos, L. M., Mu, J., Nomura, T., ... & Wellems, T. E. (2002). Alternative mutations at position 76 of the vacuolar transmembrane protein PfCRT are associated with chloroquine resistance and unique stereospecific quinine and quinidine responses in *Plasmodium falciparum*. *Molecular pharmacology*, *61*(1), 35-42.

Cooper, R. A., Lane, K. D., Deng, B., Mu, J., Patel, J. J., Wellems, T. E., ... & Ferdig, M. T. (2007). Mutations in transmembrane domains 1, 4 and 9 of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter alter susceptibility to chloroquine, quinine and quinidine. *Molecular microbiology*, *63*(1), 270-282.

Cortopassi, W. A., Oliveira, A. A., Guimarães, A. P., Rennó, M. N., Krettli, A. U., & França, T. C. (2011). Docking studies on the binding of quinoline derivatives and hematin to *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *29*(1), 207-218.

Cunico, W., Cechinel, C. A., Bonacorso, H. G., Martins, M. A., Zanatta, N., de Souza, M. V., ... & Krettli, A. U. (2006). Antimalarial activity of 4-(5-trifluoromethyl-1H-pyrazol-1-yl)-chloroquine analogues. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *16*(3), 649-653.

da Silva Junior, E. N., de Melo, I. M., Diogo, E. B., Costa, V. A., de Souza Filho, J. D., Valenca, W. O., ... & de Castro, S. L. (2012). On the search for potential anti *Trypanosoma cruzi* drugs: Synthesis and biological evaluation of 2-hydroxy-3-methylamino and 1, 2, 3-triazolic naphthoquinoidal compounds obtained by click chemistry reactions. *European journal of medicinal chemistry*, *52*, 304-312.

de Castro, S. L., Emery, F. S., & da Silva Junior, E. N. (2013). Synthesis of quinoidal molecules: strategies towards bioactive compounds with an emphasis on lapachones. *European journal of medicinal chemistry*, *69*, 678-700.

Danoun, S., Baziard-Mouysset, G., Stigliani, J. L., Ané-Margail, M., Payard, M., Léger, J. M., ... & Bories, C. (1999). Synthesis and protozoocidal activity of new 1, 4-naphthoquinones. *Heterocyclic Communications*, *5*(4), 343-348.

- de Souza, N. B., Carmo, A. M., Lagatta, D. C., Alves, M. J. M., Fontes, A. P. S., Coimbra, E. S., ... & Abramo, C. (2011). 4-aminoquinoline analogues and its platinum (II) complexes as antimalarial agents. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 65(4), 313-316.
- De, D., Krogstad, F. M., Byers, L. D., & Krogstad, D. J. (1998). Structure-activity relationships for antiplasmodial activity among 7-substituted 4-aminoquinolines. *Journal of medicinal chemistry*, 41(25), 4918-4926.
- Delhaes, L., Biot, C., Berry, L., Delcourt, P., Maciejewski, L. A., Camus, D., ... & Dive, D. (2002). Synthesis of ferroquine enantiomers: first investigation of effects of metallocenic chirality upon antimalarial activity and cytotoxicity. *ChemBioChem*, 3(5), 418-423.
- Del Valle, E. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process biochemistry*, 39(9), 1033-1046.
- Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods*, 89(2), 271-277.
- Dive, D., & Biot, C. (2008). Ferrocene conjugates of chloroquine and other antimalarials: the development of ferroquine, a new antimalarial. *ChemMedChem*, 3(3), 383-391.
- Djimdé, A., Doumbo, O. K., Steketee, R. W., & Plowe, C. V. (2001). Application of a molecular marker for surveillance of chloroquine-resistant falciparum malaria. *The Lancet*, 358(9285), 890-891.
- Dondorp, A. M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyto, A. P., Tarning, J., ... & White, N. J. (2009). Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *New England Journal of Medicine*, 361(5), 455-467.
- dos Santos, E. V., Carneiro, J. W. D. M., & Ferreira, V. F. (2004). Quantitative structure-activity relationship in aziridinyl-1, 4-naphthoquinone antimalarials: study of theoretical correlations by the PM3 method. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 12(1), 87-93.

Dressman, J. B., & Reppas, C. (2000). *In vitro–in vivo* correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. *European journal of pharmaceutical sciences*, *11*, S73-S80.

Durand, R., Jafari, S., Vauzelle, J., Delabre, J. F., Jesic, Z., & Le Bras, J. (2001). Analysis of *pfcr* point mutations and chloroquine susceptibility in isolates of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology*, *114*(1), 95-102.

Dyer, M., & Day, K. P. (2000). Commitment to Gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology today*, *16*(3), 102-107.

Egan, T. J. (2008). Haemozoin formation. *Molecular and biochemical parasitology*, *157*(2), 127-136.

Egan, T. J., & Ncokazi, K. K. (2005). Quinoline antimalarials decrease the rate of β -hematin formation. *Journal of inorganic biochemistry*, *99*(7), 1532-1539.

Egan, T. J., Mavuso, W. W., Ross, D. C., & Marques, H. M. (1997). Thermodynamic factors controlling the interaction of quinoline antimalarial drugs with ferriprotoporphyrin IX. *Journal of inorganic biochemistry*, *68*(2), 137-145.

Egan, T.J., Hunter, R., Kaschula, C.H., Marques, H.M., Mispion, A., Walden, J. (2000) Structure-function relationships in aminoquinolines: effect of amino and chloro groups on quinoline-hematin complex formation, inhibition of beta-hematin formation, and antiplasmodial activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, *43*(2):283-91

Eggleston, K. K., Duffin, K. L., & Goldberg, D. E. (1999). Identification and characterization of falcilysin, a metallopeptidase involved in hemoglobin catabolism within the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(45), 32411-32417.

Ekland, E. H., & Fidock, D. A. (2008). *In vitro* evaluations of antimalarial drugs and their relevance to clinical outcomes. *International journal for parasitology*, *38*(7), 743-747.

Eickel, N., Kaiser, G., Prado, M., Burda, P. C., Roelli, M., Stanway, R. R., & Heussler, V. T. (2013). Features of autophagic cell death in *Plasmodium* liver-stage parasites. *Autophagy*, *9*(4), 568-580

Ekland, E. H., & Fidock, D. A. (2008). In vitro evaluations of antimalarial drugs and their relevance to clinical outcomes. *International journal for parasitology*, 38(7), 743-747.

El Hage, S., Ane, M., Stigliani, J. L., Marjorie, M., Vial, H., Baziard-Mouysset, G., & Payard, M. (2009). Synthesis and antimalarial activity of new atovaquone derivatives. *European journal of medicinal chemistry*, 44(11), 4778-4782.

Famin, O., & Ginsburg, H. (2003). The treatment of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes with chloroquine leads to accumulation of ferriprotoporphyrin IX bound to particular parasite proteins and to the inhibition of the parasite's 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Parasite (Paris, France)*, 10(1), 39-50.

Famin, O., Krugliak, M., & Ginsburg, H. (1999). Kinetics of inhibition of glutathione-mediated degradation of ferriprotoporphyrin IX by antimalarial drugs. *Biochemical pharmacology*, 58(1), 59-68.

Färnert, A., Lindberg, J., Gil, P., Swedberg, G., Berqvist, Y., Thapar, M. M., ... & Björkman, A. (2003). Evidence of *Plasmodium falciparum* malaria resistant to atovaquone and proguanil hydrochloride: case reports. *Bmj*, 326(7390), 628-629.

Fidock, D. A., Eastman, R. T., Ward, S. A., & Meshnick, S. R. (2008). Recent highlights in antimalarial drug resistance and chemotherapy research. *Trends in parasitology*, 24(12), 537-544.

Fidock, D. A., Nomura, T., Talley, A. K., Cooper, R. A., Dzekunov, S. M., Ferdig, M. T., ... & Wellems, T. E. (2000). Mutations in the *P. falciparum* Digestive Vacuole Transmembrane Protein PfCRT and Evidence for Their Role in Chloroquine Resistance. *Molecular cell*, 6(4), 861-871.

Fieser, L. F., & Fieser, M. (1948). Naphthoquinone Antimalarials. XII. The Hooker Oxidation Reaction1. *Journal of the American Chemical Society*, 70(10), 3215-3222.

Fieser, L.F., Berliner, E., Bondhus, F.J., Chang, F.C., Dauben, W.G., Ettliger, M.G., Fields, G.F.M., Fieser, M., Heidelberger, C., Heymann, H., Seligman, A.M., Vaughan, W.R., Wilson, A.G., Wilson, E., Wu, M., Leffler, M.T., Hamlin, K.E., Hathaway, R.J., Matson, E.J., Moore,

- E.E., Moore, M.B., Rapala, R.T., Zaugg, H.E. (1948). Naphthoquinone antimalarials.4.5.6.7.8.9.10.11. synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 70:3174–3215
- Fitch, C. D. (1970). Plasmodium falciparum in owl monkeys: drug resistance and chloroquine binding capacity. *Science*, 169(3942), 289-290.
- Fivelman, Q. L., Butcher, G. A., Adagu, I. S., Warhurst, D. C., & Pasvol, G. (2002). Malarone treatment failure and *in vitro* confirmation of resistance of *Plasmodium falciparum* isolate from Lagos, Nigeria. *Malaria journal*, 1(1), 1.
- Fleck, S. L., Pudney, M., & Sinden, R. E. (1996). The effect of atovaquone (566C80) on the maturation and viability of *Plasmodium falciparum* gametocytes *in vitro*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(3), 309-312.
- Foley, M., Deady, L. W., Ng, K., Cowman, A. F., & Tilley, L. (1994). Photoaffinity labeling of chloroquine-binding proteins in Plasmodium falciparum. *Journal of Biological Chemistry*, 269(9), 6955-6961
- Frosch, A.E., Laufer, M.K., Mathanga, D.P., Takala-Harrison, S., Skarbinski, J., Claassen, C.W., Dzinjalama, F.K., Plowe, C.V. (2014).Return of widespread chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* to Malawi. *The Journal of Infectious Diseases* 210, 1110–1114
- Fry, M., & Pudney, M. (1992). Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[*trans*-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl]-3-hydroxy-1, 4-naphthoquinone (566C80). *Biochemical pharmacology*, 43(7), 1545-1553.
- Garcia-Bustos, J.F., Gamo, F. J. (2013). Antimalarial drug resistance and early drug discovery. *Current pharmaceutical design*, 19(2), 270-281.
- Gaviria, D., Paguio, M. F., Turnbull, L. B., Tan, A., Siriwardana, A., Ghosh, D., ... & Roepe, P. D. (2013). A process similar to autophagy is associated with cytotoxic chloroquine resistance in Plasmodium falciparum. *PLoS one*,8(11), e79059.

Ghosh, A., Edwards, M. J., & Jacobs-Lorena, M. (2000). The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century. *Parasitology Today*, *16*(5), 196-201.

Ginsburg, H., Famin, O., Zhang, J., & Krugliak, M. (1998). Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action. *Biochemical pharmacology*, *56*(10), 1305-1313.

Glans, L., Ehnbohm, A., de Kock, C., Martínez, A., Estrada, J., Smith, P. J., ... & Nordlander, E. (2012). Ruthenium (II) arene complexes with chelating chloroquine analogue ligands: Synthesis, characterization and *in vitro* antimalarial activity. *Dalton Transactions*, *41*(9), 2764-2773.

Glans, L., Taylor, D., de Kock, C., Smith, P. J., Haukka, M., Moss, J. R., & Nordlander, E. (2011). Synthesis, characterization and antimalarial activity of new chromium arene-quinoline half sandwich complexes. *Journal of inorganic biochemistry*, *105*(7), 985-990.

Gligorijevic, B., Purdy, K., Elliott, D. A., Cooper, R. A., & Roepe, P. D. (2008). Stage independent chloroquine resistance and chloroquine toxicity revealed via spinning disk confocal microscopy. *Molecular and biochemical parasitology*, *159*(1), 7-23.

Gorka, A. P., de Dios, A., & Roepe, P. D. (2013a). Quinoline drug-heme interactions and implications for antimalarial cytostatic versus cytotoxic activities. *Journal of medicinal chemistry*, *56*(13), 5231-5246.

Gorka, A. P., Alumasa, J. N., Sherlach, K. S., Jacobs, L. M., Nickley, K. B., Brower, J. P., ... & Roepe, P. D. (2013b). Cytostatic versus cytotoxic activities of chloroquine analogues and inhibition of hemozoin crystal growth. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *57*(1), 356-364.

Graf, P. C., Durand, S., Alvarez Antonio, C., Montalvan, C., Galves Montoya, M., Green, M. D., ... & Fryauff, D. J. (2012). Failure of supervised chloroquine and primaquine regimen for the treatment of *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. *Malaria research and treatment*, 2012.

Gramiccia, G., & Beales, P. F. (1983). *Recent History of Malaria Control and Eradication*.

Gavrieli, Y., Sherman, Y., & Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology*, *119*(3), 493-501.

Greenwood, B. M., Fidock, D. A., Kyle, D. E., Kappe, S. H., Alonso, P. L., Collins, F. H., & Duffy, P. E. (2008). Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *The Journal of clinical investigation*, *118*(4), 1266-1276.

Hammond, D. J., Burchell, J. R., & Pudney, M. (1985). Inhibition of pyrimidine biosynthesis de novo in *Plasmodium falciparum* by 2-(4-*t*-butylcyclohexyl)-3-hydroxy-1, 4-naphthoquinone *in vitro*. *Molecular and biochemical parasitology*, *14*(1), 97-109.

Hocart, S. J., Liu, H., Deng, H., De, D., Krogstad, F. M., & Krogstad, D. J. (2011). 4-Aminoquinolines active against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*: basis of antiparasite activity and quantitative structure-activity relationship analyses. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *55*(5), 2233-2244.

Hodel, E. M., Zanolari, B., Mercier, T., Biollaz, J., Keiser, J., Olliaro, P., ... & Decosterd, L. A. (2009). A single LC-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 14 antimalarial drugs and their metabolites in human plasma. *Journal of Chromatography B*, *877*(10), 867-886.

Horton, D. A., Bourne, G. T., & Smythe, M. L. (2003). The combinatorial synthesis of bicyclic privileged structures or privileged substructures. *Chemical reviews*, *103*(3), 893-930.

Hrycyna, C. A., Summers, R. L., Lehane, A. M., Pires, M. M., Namanja, H., Bohn, K., ... & Martin, R. E. (2014). Quinine Dimers Are Potent Inhibitors of the *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter and Are Active against Quinoline-Resistant *P. falciparum*. *ACS chemical biology*, *9*(3), 722-730.

Hudson, A. T., Dickins, M., Ginger, C. D., Gutteridge, W. E., Holdich, T., Hutchinson, D. B., ... & Latter, V. S. (1990). 566C80: a potent broad spectrum anti-infective agent with activity against malaria and opportunistic infections in AIDS patients. *Drugs under experimental and clinical research*, *17*(9), 427-435.

Hughes, L. M., Lanteri, C. A., O'Neil, M. T., Johnson, J. D., Gribble, G. W., & Trumppower, B. L. (2011). Design of anti-parasitic and anti-fungal hydroxy-naphthoquinones that are less susceptible to drug resistance. *Molecular and biochemical parasitology*, 177(1), 12-19.

Ioset, J. R. (2008). Natural products for neglected diseases: a review. *Current Organic Chemistry*, 12(8), 643-666.

Kafsack, B. F., Rovira-Graells, N., Clark, T. G., Bancells, C., Crowley, V. M., Campino, S. G., ... & Llinás, M. (2014). A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites. *Nature*, 507(7491), 248-252.

Kaur, K., Jain, M., Reddy, R. P., & Jain, R. (2010). Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. *European journal of medicinal chemistry*, 45(8), 3245-3264.

Kester, K. E., Cummings, J. F., Ofori-Anyinam, O., Ockenhouse, C. F., Krzych, U., Moris, P., ... & Heppner, D. G. (2009). Randomized, double-blind, phase 2a trial of *falciparum* malaria vaccines RTS, S/AS01B and RTS, S/AS02A in malaria-naive adults: safety, efficacy, and immunologic associates of protection. *Journal of Infectious Diseases*, 200(3), 337-346.

Kitamura, K., Kishi-Itakura, C., Tsuboi, T., Sato, S., Kita, K., Ohta, N., & Mizushima, N. (2012). Autophagy-related Atg8 localizes to the apicoplast of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS One*, 7(8), e42977

Kouznetsov, V. V., & Gómez-Barrio, A. (2009). Recent developments in the design and synthesis of hybrid molecules based on aminoquinoline ring and their antiplasmodial evaluation. *European journal of medicinal chemistry*, 44(8), 3091-3113.

Krettli, A. U., Pereira, J. P., Brener, Z. (1969). Comparative study of experimental infections in mice inoculated with normal and chloroquine-resistant strains of *Plasmodium berghei*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 11(2), 94-100.

Krettli, A.U., Aguiar, A.C.C., Souza, N.B., Chaves, K.M., Fontes, C.J., Tauil, P.L. (2013) Malária fora da Amazônia – Como evitar mortes desnecessárias. *Ciência Hoje*, 305 (51), 32-36.

- Krotoski, W. A., Krotoski, D. M., Garnham, P. C., Bray, R. S., Killick-Kendrick, R., Draper, C. C., ... & Guy, M. W. (1980). Relapses in primate malaria: discovery of two populations of exoerythrocytic stages. Preliminary note. *British medical journal*, 280(6208), 153.
- Kumar, S., & Bandyopadhyay, U. (2005). Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicology letters*, 157(3), 175-188.
- Kumar, S., Kumari, R., & Pandey, R. (2014). New insight-guided approaches to detect, cure, prevent and eliminate malaria. *Protoplasma*, 1-37
- Lacerda, M. V., Fragoso, S. C., Alecrim, M. G., Alexandre, M. A., Magalhães, B. M., Siqueira, A. M., ... & Bassat, Q. (2012). Postmortem characterization of patients with clinical diagnosis of *Plasmodium vivax* malaria: to what extent does this parasite kill?. *Clinical Infectious Diseases*, cis615.
- Lambros, C., & Vanderberg, J. P. (1979). Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *The Journal of parasitology*, 418-420.
- Le Bras, J. & Durand, R. (2003). The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundamental & clinical pharmacology*, 17,2, 147-153.
- Lee, N., Baker, J., Bell, D., McCarthy, J., & Cheng, Q. (2006). Assessing the genetic diversity of the aldolase genes of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* and its potential effect on performance of aldolase-detecting rapid diagnostic tests. *Journal of clinical microbiology*, 44(12), 4547-4549.
- Leed, A., DuBay, K., Ursos, L. M., Sears, D., de Dios, A. C., & Roepe, P. D. (2002). Solution structures of antimalarial drug-heme complexes. *Biochemistry*, 41(32), 10245-10255.
- Looareesuwan, S., Viravan, C., Webster, H. K., Kyle, D. E., Hutchinson, D. B., & Canfield, C. J. (1996). Clinical studies of atovaquone, alone or in combination with other antimalarial drugs, for treatment of acute uncomplicated malaria in Thailand. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 54(1), 62-66.

Loria, P., Miller, S., Foley, M., Tilley, L. (1999). Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials. *Biochemical Journal*, 339, 363-370.

Machado, R. L. D., A. F. Filho, V. S. P. Calvosa, M. C. Figueredo, J. M. Nascimento, and M. M. Pova. (2003). Correlation between *Plasmodium vivax* variants in Belem, Para State, Brazil and symptoms and clearance of parasitemia. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 7, 175–177.

Madrid, P. B., Wilson, N. T., DeRisi, J. L., & Guy, R. K. (2004). Parallel synthesis and antimalarial screening of a 4-aminoquinoline library. *Journal of combinatorial chemistry*, 6(3), 437-442.

Madureira, M.C., Martins, A.P., Gomes, M., Paiva, J., Cunha, A.P., Rosário, V. (2002). Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tomé and Príncipe islands. *J Ethnopharmacol* 81: 23-29.

Makgatho, M. E., Anderson, R., O'Sullivan, J. F., Egan, T. J., Freese, J. A., Cornelius, N., & van Rensburg, C. E. (2000). Tetramethylpiperidine- substituted phenazines as novel anti-plasmodial agents. *Drug development research*, 50(2), 195-202.

Makler, M. T., Piper, R. C., & Milhous, W. K. (1998). Lactate dehydrogenase and the diagnosis of malaria. *Parasitology today*, 14(9), 376-377.

Maltha, J. & Jacobs, J. (2011). Clinical practice: the diagnosis of imported malaria in children. *European Journal of Pediatrics*, 170, 821–829.

Marques, M. M., Costa, M. R., Santana Filho, F. S., Vieira, J. L., Nascimento, M. T., Brasil, L. W., ... & Alecrim, M. G. (2014). *Plasmodium vivax* chloroquine resistance and anemia in the Western Brazilian Amazon. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(1), 342-347.

Martin, S.K., Oduola, A.M., Milhous, W.K. (1987). Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. *Science* 235, 899–901.

Martiney, J.A., Cerami, A., Slater, A.F. (1995). Verapamil reversal of chloroquine resistance in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* is specific for resistant parasites and independent of the weak base effect. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 22393–22398.

Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M. S., Darriet, F., Berge, J. B., Devonshire, A. L., ... & Pauron, D. (1998). Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* ss. *Insect molecular biology*, 7(2), 179-184.

Matuschewski, K., Nunes, A. C., Nussenzweig, V., & Ménard, R. (2002). Plasmodium sporozoite invasion into insect and mammalian cells is directed by the same dual binding system. *The EMBO journal*, 21(7), 1597-1606.

Mayxay, M., Pukrittayakamee, S., Newton, P. N., & White, N. J. (2004). Mixed-species malaria infections in humans. *Trends in parasitology*, 20(5), 233-240.

McKeage, K., Scott, L. (2003). Atovaquone/Proguanil: A Review of its use for the prophylaxis of *Plasmodium falciparum* Malaria. *Drugs*, 63, 597-623

Meis, J. F. G. M., Wismans, P. G. P., Jap, P. H. K., Lensen, A. H. W., & Ponnudurai, T. (1992). A scanning electron microscopic study of the sporogonic development of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles stephensi*. *Acta tropica*, 50(3), 227-236.

Ménard, R., Sultan, A. A., Cortes, C., Altszuler, R., van Dijk, M. R., Janse, C. J., ... & Nussenzweig, V. (1997). Circumsporozoite protein is required for development of malaria sporozoites in mosquitoes.

Menting, J. G., Tilley, L., Deady, L. W., Ng, K., Simpson, R. J., Cowman, A. F., & Foley, M. (1997). The antimalarial drug, chloroquine, interacts with lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology*, 88(1), 215-224.

Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K., & Doumbo, O. K. (2002). The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 415(6872), 673-679.

- Miotto, O., Almagro-Garcia, J., Manske, M., MacInnis, B., Campino, S., Rockett, K. A., ... & Oyola, S. O. (2013). Multiple populations of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Cambodia. *Nature genetics*, 45(6), 648-655.
- Monti, D., Basilico, N., Parapini, S., Pasini, E., Olliaro, P., & Taramelli, D. (2002). Does chloroquine really act through oxidative stress? *FEBS letters*, 522(1), 3-5.
- Moorthy, V. S., Newman, R. D., & Okwo-Bele, J. M. (2013). Malaria vaccine technology roadmap. *The Lancet*, 382(9906), 1700-1701.
- Mota, M. M., Hafalla, J. C., & Rodriguez, A. (2002). Migration through host cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection. *Nature medicine*, 8(11), 1318-1322.
- Mueller, I., Zimmerman, P. A., & Reeder, J. C. (2007). *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*—the ‘bashful’ malaria parasites. *Trends in parasitology*, 23(6), 278-283.
- Muregi, F. W., Kano, S., Kino, H., & Ishih, A. (2009). *Plasmodium berghei*: Efficacy of 5-fluoroorotate in combination with commonly used antimalarial drugs in a mouse model. *Experimental parasitology*, 121(4), 376-380.
- Nájera, J. A., González-Silva, M., & Alonso, P. L. (2011). Some lessons for the future from the Global Malaria Eradication Programme (1955–1969). *PLoS medicine*, 8(1), e1000412.
- Navarro, M., Vásquez, F., Sánchez-Delgado, R. A., Pérez, H., Sinou, V., & Schrével, J. (2004). Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 7. Synthesis and in vitro antimalarial activity of new gold-chloroquine complexes. *Journal of medicinal chemistry*, 47(21), 5204-5209.
- Nilsen, A., LaCrue, A. N., White, K. L., Forquer, I. P., Cross, R. M., Marfurt, J., ... & Riscoe, M. K. (2013). Quinolone-3-diarylethers: a new class of antimalarial drug. *Science translational medicine*, 5(177), 177ra37-177ra37.
- Noedl, H., Se, Y., Schaecher, K., Smith, B. L., Socheat, D., & Fukuda, M. M. (2008). Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *New England Journal of Medicine*, 359(24), 2619-2620.

Noedl, H., Wongsrichanalai, C., Scott Miller, R., Saw Aye Myint, K., Looareesuwan, S., Sukthana, Y., ... & Wernsdorfer, W. H. (2002). *Plasmodium falciparum*: effect of anti-malarial drugs on the production and secretion characteristics of histidine-rich protein II. *Experimental parasitology*, 102(3), 157-163.

Oduola, A. M., Weatherly, N. F., Bowdre, J. H., & Desjardins, R. E. (1988). *Plasmodium falciparum*: cloning by single-erythrocyte micromanipulation and heterogeneity *in vitro*. *Experimental parasitology*, 66(1), 86-95.

Ojima, I. (2008). Modern natural products chemistry and drug discovery. *Journal of medicinal chemistry*, 51(9), 2587-2588.

Okombo, J., Ohuma, E., Picot, S., & Nzila, A. (2011). Update on genetic markers of quinine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology*, 177(2), 77-82.

Olagnier, D., Costes, P., Berry, A., Linas, M. D., Urrutigoity, M., Dechy-Cabaret, O., & Benoit-Vical, F. (2007). Modifications of the chemical structure of terpenes in antiplasmodial and antifungal drug research. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 17(22), 6075-6078.

Olliaro, P. (2001). Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. *Pharmacology & therapeutics*, 89(2), 207-219.

Paguio, M. F., Bogle, K. L., & Roepe, P. D. (2011). *Plasmodium falciparum* resistance to cytotoxic versus cytostatic effects of chloroquine. *Molecular and biochemical parasitology*, 178(1), 1-6.

Painter, H. J., Morrisey, J. M., Mather, M. W., & Vaidya, A. B. (2007). Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 446(7131), 88-91.

Pandey, S. K., Naware, N. B., Trivedi, P., & Saxena, A. K. (2001). Molecular modeling and 3D-QSAR studies in 2-aziridinyl- and 2, 3-bis (aziridinyl)-1, 4-naphthoquinonyl sulfonate and acylate derivatives as potential antimalarial agents. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 12(6), 547-564.

- Peters, W., Portus, J. H., & Robinson, B. L. (1975). The four-day suppressive *in vivo* antimalarial test. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 69, 155-171.
- Phyo, A. P., Nkhoma, S., Stepniewska, K., Ashley, E. A., Nair, S., McGready, R., ... & Nosten, F. (2012). Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *The Lancet*, 379(9830), 1960-1966.
- Picot, S., Burnod, J., Bracchi, V., Chumpitazi, B. F. F., & Ambroise-Thomas, P. (1997). Apoptosis related to chloroquine sensitivity of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(5), 590-591.
- Plowe, C. V. (2014). Malaria: Resistance nailed. *Nature*, 505(7481), 30-31
- Pradines, B., Dormoi, J., Briolant, S., Bogreau, H., & Rogier, C. (2010). La résistance aux antipaludiques. *Revue francophone des laboratoires*, 2010(422), 51-62.
- Price, R. N., Douglas, N. M., & Anstey, N. M. (2009). New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. *Current opinion in infectious diseases*, 22(5), 430-435.
- Raghavendra, K., Barik, T. K., Reddy, B. N., Sharma, P., & Dash, A. P. (2011). Malaria vector control: from past to future. *Parasitology research*, 108(4), 757-779.
- Rajapakse, C. S., Martinez, A., Naoulou, B., Jarzecki, A. A., Suarez, L., Deregnaucourt, C., ... & Sanchez-Delgado, R. A. (2009). Synthesis, characterization, and *in vitro* antimalarial and antitumor activity of new ruthenium (II) complexes of chloroquine. *Inorganic chemistry*, 48(3), 1122-1131.
- Read, J. A., Wilkinson, K. W., Tranter, R., Sessions, R. B., & Brady, R. L. (1999). Chloroquine Binds in the Cofactor Binding Site of *Plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(15), 10213-10218.

- Reed, M. B., Saliba, K. J., Caruana, S. R., Kirk, K., & Cowman, A. F. (2000). Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 403(6772), 906-909
- Reyes-Sandoval, A., Khan, S., Janse, C., Bachmann, M., & Hill, A. (2014). Development of a *Plasmodium vivax* malaria vaccine for clinical applications using transgenic parasites, virus-like particles and recombinant viruses. *Malaria Journal*, 13(Suppl 1), P77.
- Ridley, R. G. (2002). Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*, 415(6872), 686-693.
- Ridley, R. G., Hofheinz, W., Matile, H., Jaquet, C., Dorn, A., Masciadri, R., ... & Peters, W. (1996). 4-aminoquinoline analogs of chloroquine with shortened side chains retain activity against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40(8), 1846-1854.
- Rieckmann, K. H., Davis, D. R., & Hutton, D. C. (1989). *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? *The Lancet*, 334(8673), 1183-1184.
- Rijpma, S. R., van den Heuvel, J. J., van der Velden, M., Sauerwein, R. W., Russel, F. G., & Koenderink, J. B. (2014). Atovaquone and quinine anti-malarials inhibit ATP binding cassette transporter activity. *Malar J*, 13(359), 10-1186
- Rock, E. P., Marsh, K., Saul, S. J., Wellems, T. E., Taylor, D. W., Maloy, W. L., Howard, R. J. (1987). Comparative analysis of the *Plasmodium falciparum* histidine-rich proteins HRP1, HRP2 and HRP3 in malaria diagnosis of diverse origin. *Parasitology*, 95,209–227.
- Roepe, P. D. (2011). PfCRT-mediated drug transport in malarial parasites. *Biochemistry*, 50(2), 163-171.
- Roll Back Malaria Partnership. (2008). The global malaria action plan for a malaria free world. Geneva: RBM. <http://www.rollbackmalaria.org/gmap/gmap.pdf>

Rosenthal, P. J., Miller, L. H. (2001). The need for new approaches to antimalarial chemotherapy. *In Antimalarial chemotherapy: mechanisms of action, resistance, and new directions in drug discovery*. pp. 3-13. Humana Press, Totowa.

Rothstein, A. (1959). Cell membrane as site of action of heavy metals. *Federation proceedings*, 18, 1026-1038.

Rts, S. C. T. P., Agnandji, S. T., Lell, B., Fernandes, J. F., Abossolo, B. P., Methogo, B. G., ... & Laserson, K. F. (2012). A phase 3 trial of RTS, S/AS01 malaria vaccine in African infants. *The New England journal of medicine*, 367(24), 2284-95.

Ryter, S. W., & Tyrrell, R. M. (2000). The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity: heme oxygenase has both pro-and antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(2), 289-309.

Sanchez, C. P., Wunsch, S., & Lanzer, M. (1997). Identification of a chloroquine importer in *Plasmodium falciparum* Differences in import kinetics are genetically linked with the chloroquine-resistant phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, 272(5), 2652-2658.

Sanz, L. M., Crespo, B., De-Cózar, C., Ding, X. C., Llergo, J. L., Burrows, J. N., ... & Gamo, F. J. (2012). *P. falciparum in vitro* killing rates allow to discriminate between different antimalarial mode-of-action. *PloS one*, 7(2), e30949.

Schmitt, T. H., Frezzatti, W. A., & Schreier, S. (1993). Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis. *Archives of biochemistry and biophysics*, 307(1), 96-103.

Schuck, D. C., Ferreira, S. B., Cruz, L. N., Da Rocha, D. R., Moraes, M. S., Nakabashi, M., ... & Garcia, C. R. (2013). Biological evaluation of hydroxynaphthoquinones as anti-malarials. *Malaria journal*, 12(1), 234.

Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (SVS/MS), Boletim Epidemiológico. (2014). http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/boletim_1_de_2014_malaria.pdf

Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (SVS/MS). (2010). Guia prático de tratamento da malária no Brasil. http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_malaria.pdf

Shapiro, T. A., Ranasinha, C. D., Kumar, N., & Barditch-Crovo, P. (1999). Prophylactic activity of atovaquone against *Plasmodium falciparum* in humans. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 60(5), 831-836.

Sherman, I. W. (1979). Biochemistry of *Plasmodium* (malarial parasites). *Microbiological reviews*, 43(4), 453.

Sherman, I.W. (1998). *Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis and Protection*. ASM Press, Washington, DC.

Sherman, I.W., Tanigoshi, L. (1970). Incorporation of ¹⁴C-Amino Acids by Malaria. *International Journal of Biochemistry*, 1, 635–637.

Schellenberg, D. (2011). The malERA Consultative Group on Diagnoses and Diagnostics. A Research Agenda for Malaria Eradication: Diagnoses and Diagnostics. *PLoS Med* 8(1): e1000396. doi:10.1371/journal.pmed.1000396.

Sidhu, A. B. S., Valderramos, S. G., & Fidock, D. A. (2005). pfm^{dr1} mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in *Plasmodium falciparum*. *Molecular microbiology*, 57(4), 913-926

Sidhu, A.B., Verdier-Pinard, D., Fidock, D.A. (2002). Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by pfcrt mutations. *Science* 298, 210 -213.

Sinai, A. P., & Roepe, P. D. (2012). Autophagy in Apicomplexa: a life sustaining death mechanism? *Trends in parasitology*, 28(9), 358-364.

Slater, A. F., Swiggard, W. J., Orton, B. R., Flitter, W. D., Goldberg, D. E., Cerami, A., & Henderson, G. B. (1991). An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(2), 325-329.

Smith, T. G., Walliker, D., & Ranford-Cartwright, L. C. (2002). Sexual differentiation and sex determination in the Apicomplexa. *Trends in parasitology*, 18(7), 315-323.

Šolaja, B. A., Opsenica, D., Smith, K. S., Milhous, W. K., Terzić, N., Opsenica, I., ... & Bavari, S. (2008). Novel 4-aminoquinolines active against chloroquine-resistant and sensitive *P. falciparum* strains that also inhibit botulinum serotype A. *Journal of medicinal chemistry*, 51(15), 4388-4391.

Solomon, V. R., Haq, W., Srivastava, K., Puri, S. K., & Katti, S. B. (2007). Synthesis and antimalarial activity of side chain modified 4-aminoquinoline derivatives. *Journal of medicinal chemistry*, 50(2), 394-398.

Solomon, V. R., Puri, S. K., Srivastava, K., & Katti, S. B. (2005). Design and synthesis of new antimalarial agents from 4-aminoquinoline. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13(6), 2157-2165.

Srivastava, I. K., Morrisey, J. M., Darrouzet, E., Daldal, F., & Vaidya, A. B. (1999). Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome b in malaria parasites. *Molecular microbiology*, 33(4), 704-711.

Srivastava, I. K., Rottenberg, H., & Vaidya, A. B. (1997). Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. *Journal of Biological Chemistry*, 272(7), 3961-3966.

Stickles, A. M., de Almeida, M. J., Morrisey, J. M., Sheridan, K. A., Forquer, I. P., Nilsen, A., ... & Riscoe, M. K. (2015). Subtle changes in endochin-like quinolone (ELQ) structure alter site of inhibition within the cytochrome bc1 complex of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, AAC-04149

Stocks, P. A., Raynes, K. J., Bray, P. G., Park, B. K., O'Neill, P. M., & Ward, S. A. (2002). Novel short chain chloroquine analogues retain activity against chloroquine resistant K1 *Plasmodium falciparum*. *Journal of medicinal chemistry*, 45(23), 4975-4983.

Stojiljkovic, I., Evavold, B. D., & Kumar, V. (2001). Antimicrobial properties of porphyrins. *Expert opinion on investigational drugs*, 10(2), 309-320.

- Straimer, J., Gnädig, N. F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Duru, V., Ramadani, A. P., ... & Fidock, D. A. (2015). K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Science*, 347(6220), 428-431
- Susin, S. A., Zamzami, N., & Kroemer, G. (1998). Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1366(1), 151-165.
- Tagboto, S., & Townson, S. (2001). Antiparasitic properties of medicinal plants and other naturally occurring products. *Advances in Parasitology*, 50, 199-295.
- Tasón, D. C. M., & Krettli, A. U. (1978). *Aedes fluviatilis* (Lutz), a new experimental host for *Plasmodium gallinaceum* brumpt. *The Journal of parasitology*, 64(5), 924.
- Teuscher, F., Gatton, M. L., Chen, N., Peters, J., Kyle, D. E., & Cheng, Q. (2010). Artemisinin-induced dormancy in *Plasmodium falciparum*: duration, recovery rates, and implications in treatment failure. *Journal of Infectious Diseases*, 202(9), 1362-1368.
- Totino, P. R. R., Daniel-Ribeiro, C. T., Corte-Real, S., & de Fátima Ferreira-da-Cruz, M. (2008). *Plasmodium falciparum*: erythrocytic stages die by autophagic-like cell death under drug pressure. *Experimental parasitology*, 118(4), 478-486
- Trager, W., & Jensen, J. B. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193(4254), 673-675.
- Vaidya, A. B., Lashgari, M. S., Pologe, L. G., & Morrisey, J. (1993). Structural features of *Plasmodium* cytochrome b that may underlie susceptibility to 8-aminoquinolines and hydroxynaphthoquinones. *Molecular and biochemical parasitology*, 58(1), 33-42
- Vaidya, A. B., & Mather, M. W. (2000). Atovaquone resistance in malaria parasites. *Drug Resistance Updates*, 3(5), 283-287
- Van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B., & Reutelingsperger, C. P. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31(1), 1-9.

Van Rensburg, C. E., Joone, G. K., Sirgel, F. A., Matlola, N. M., & O'Sullivan, J. F. (1999). *In vitro* investigation of the antimicrobial activities of novel tetramethylpiperidine-substituted phenazines against *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemotherapy*, 46(1), 43-48.

Vilamil-Fernandez, S., Stoppani, A.O.M., Dubin, M. (2004). Redox cycling of β -lapachone and structural analogues in microsomal and cytosol liver preparations. *Methods in Enzymology*, 378, 67-87.

Villalobos-Salcedo, J. M., Tada, M. S., Kimura, E., Menezes, M. J., & Pereira-da-Silva, L. H. (2000). In-vivo sensitivity of *Plasmodium vivax* isolates from Rondonia (western Amazon region, Brazil) to regimens including chloroquine and primaquine. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 94(8), 749-758.

Vincent, S. H. (1989). Oxidative effects of heme and porphyrins on proteins and lipids. In *Seminars in hematology* 26(2), 105-113.

Walker, D. M., Mahfooz, N., Kemme, K. A., Patel, V. C., Spangler, M., & Drew, M. E. (2013). *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage parasites require the putative autophagy protein PfAtg7 for normal growth. *PloS one*, 8(6), e67047.

Wang, W., Préville, P., Morin, N., Mounir, S., Cai, W., & Siddiqui, M. A. (2000). Hepatitis C viral IRES inhibition by phenazine and phenazine-like molecules. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 10(11), 1151-1154.

Wasi, N., Singh, H. B., Gajanana, A., & Raichowdhary, A. N. (1987). Synthesis of metal complexes of antimalarial drugs and *in vitro* evaluation of their activity against *Plasmodium falciparum*. *Inorganica chimica acta*, 135(2), 133-137.

Wellems, T. & Plowe, C.V. (2001) Chloroquine-resistant malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, 184, 770–776

Wells, T. N., Burrows, J. N., & Baird, J. K. (2010). Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. *Trends in parasitology*, 26(3), 145-151.

Wernsdorfer, W.H. & McGregor, I. (1989). *Malaria. Principles and practice of malariology.* Edinburgh, London, Melbourne, New York: Churchill Livingstone. pp 1335–1378

White, N. J. (2008). *Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite.* *Clinical infectious diseases*, 46(2), 172-173.

WHO. (1957). Expert Committee on malaria, sixth report, WHO Technical Report Series, number 123. Geneva: World Health Organization. 4 p.

WHO. (1965). Technical Support Series, 296:29.

WHO. (1973). *Malaria. Handbook of resolutions and decisions of the World Health Assembly and the Executive Board. Volume I, 1948–1972, 1st to 25th WHA and 1st to 50th EB.* Geneva: World Health Organization. pp 66–81.

WHO. (1993). *Implementation of the global malaria control strategy: report of a WHO Study Group on the Implementation of the Global Plan of Action for Malaria Control 1993-2000 [meeting held in Geneva from 8 to 12 February 1993].*

WHO. (2003). World Health Organization. Malaria Control Unit, UNICEF. *The Africa Malaria Report 2003.* Geneva: World Health Organization.

WHO. (2005). World Health Organization, *World Malaria Report 2005.* Geneva: World Health Organization.

WHO (2010)a. *Guidelines for the treatment of malaria, 2nd edition.* World Health Organization

WHO (2010)b. *Global Report on Antimalarial Drug Efficacy and Drug Resistance 2000-2010*

WHO. (2010)c. AFR E: Cost effectiveness results for Malaria. 2010. http://www.who.int/choice/results/mal_afre/en/

WHO. (2011). *Global plan for artemisinin resistance containment.* http://www.who.int/malaria/publications/atoz/artemisinin_resistance_containment_2011.pdf

WHO. (2012)a. Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors. Geneva, World Health Organization. <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/gpirm/en/index.html>

WHO. (2012)b. World Malaria Report. [database on the Internet] Available from: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/report/en/index.html

WHO. (2012)c. International travel and health. <http://www.who.int/ith/en/>

WHO. (2013)a. World Health Organization, World Malaria Report 2013. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/en/

WHO. (2013)b. Malaria entomology and vector control: GUIDE FOR PARTICIPANTS. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85890/1/9789241505819_eng.pdf?ua=1

WHO. (2014)a. World Health Organization, World Malaria Report 2014. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/144852/2/9789241564830_eng.pdf?ua=1

WHO, (2014)b. Disponível em <http://www.who.int/malaria/travellers/en/>

Wilson, D. W., Langer, C., Goodman, C. D., McFadden, G. I., & Beeson, J. G. (2013). Defining the timing of action of antimalarial drugs against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(3), 1455-1467

Wong, J. W., & Yuen, K. H. (2001). Improved oral bioavailability of artemisinin through inclusion complexation with β - and γ -cyclodextrins. *International journal of pharmaceutics*, 227(1), 177-185

Wongsrichanalai, C., Barcus, M. J., Muth, S., Sutamihardja, A., & Wernsdorfer, W. H. (2007). A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 77(6 Suppl), 119-127.

Wünsch, S., Sanchez, C. P., Gekle, M., Große-Wortmann, L., Wiesner, J., & Lanzer, M. (1998). Differential stimulation of the Na⁺/H⁺ exchanger determines chloroquine uptake in *Plasmodium falciparum*. *The Journal of cell biology*, 140(2), 335-345.

Yayon, A., Timberg, R., Friedman, S., Ginsburg, H. (1984). Effects of Chloroquine on the Feeding Mechanism of the Intraerythrocytic Human Malarial Parasite *Plasmodium falciparum*. *The Journal of protozoology*, 31(3), 367-372.

Yohannes, A. M., Teklehaimanot, A., Bergqvist, Y., & Ringwald, P. (2011). Confirmed *vivax* resistance to chloroquine and effectiveness of artemether-lumefantrine for the treatment of *vivax* malaria in Ethiopia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 84(1), 137-140.

Young, R. D., & Rathod, P. K. (1993). Clonal viability measurements on *Plasmodium falciparum* to assess in vitro schizonticidal activity of leupeptin, chloroquine, and 5-fluoroorotate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 37(5), 1102-1107.

Zani, C. L., Chiari, E., Krettli, A. U., Murta, S. M., Cunningham, M. L., Fairlamb, A. H., & Romanha, A. J. (1997). Anti-plasmodial and anti-trypanosomal activity of synthetic naphtho [2, 3-b] thiophen-4, 9-quinones. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 5(12), 2185-2192

Zhang, J., Krugliak, M., & Ginsburg, H. (1999). The fate of ferriprotophyrin IX in malaria infected erythrocytes in conjunction with the mode of action of antimalarial drugs. *Molecular and biochemical parasitology*, 99(1), 129-141.

9 ANEXOS

Anexo I - artigos publicados em colaboração

Aguiar, A. C. C., da Rocha, E. M., **de Souza, N. B.**, França, T. C., & Krettli, A. U. (2012). New approaches in antimalarial drug discovery and development: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(7), 831-845.

Adebayo, J. O., Balogun, E. A., Malomo, S. O., Soladoye, A. O., Olatunji, L. A., Kolawole, O. M., Oguntoye, O. S., Babatunde, A. S., Akinola O. B., Aguiar, A. C. C., Andrade, I. M, **Souza, N. B.**, Krettli, A. U. (2013). Antimalarial activity of Cocos nucifera husk fibre: further studies. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.

Luiz C. S. Pinheiro, Núbia Boechat, Maria de Lourdes G. Ferreira, Carlos C. S. Júnior, Antônio M. L. Jesus, Milene M. M. Leite, **Nicolli B. Souza** and Antoniana U. Krettli (2015). Anti-*Plasmodium falciparum* activity of quinoline–sulfonamide hybrids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(17), 5979-5984.. [doi:10.1016/j.bmc.2015.06.056](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.06.056)

Anexo II - Textos em jornais/revistas

Casos fatais de malária fora da área endêmica – evitar é possível. Antoniana Ursine Krettli, Anna Caroline Campos Aguiar, Nicolli Bellotti de Souza, Katia Maria Chaves e Pedro Luiz Tauil. *Ciência Hoje*, 2013.



EPIDEMIOLOGIA

MALÁRIA FORA

Hoje mais restrita a regiões tropicais, a malária ainda causa grande número de mortes no mundo. Algumas vítimas, porém, vivem longe de áreas afetadas e contraem a doença durante viagens, de lazer ou a trabalho, a essas regiões. Parte desses casos fatais deve-se à pouca familiaridade com a doença de profissionais de saúde das áreas onde a transmissão não ocorre mais, como o Sul e o Sudeste do Brasil. Tais fatalidades – em Minas Gerais, por exemplo, foram 12, entre 2008 e 2012 – são desnecessárias, e medidas relativamente simples poderiam evitá-las.

Antoniana Ursine Krettli
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, Universidade Federal de Minas Gerais, e Laboratório de Malária, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Instituto Oswaldo Cruz (MG)

Anna Caroline Campos Aguiar
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, Universidade Federal de Minas Gerais

Nicolli Bellotti de Souza
Laboratório de Malária, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Instituto Oswaldo Cruz (MG)

Katia Maria Chaves
Diretoria de Vigilância Ambiental, Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais

Cor Jesus Fontes
Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Federal de Mato Grosso

Pedro Luiz Tauil
Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Universidade de Brasília

Doença febril aguda, causada por parasitos microscópicos e transmitida por mosquitos, a malária é um dos principais problemas de saúde do mundo. Registrada principalmente nas regiões tropicais, a doença é responsável, na África subsaariana, onde ocorre a espécie mais nociva do parasito (*Plasmodium falciparum*), por 1 milhão de mortes por ano, sobretudo de crianças, adultos não imunes e gestantes. No Brasil, outra espécie (*P. vivax*, menos letal) provoca a grande maioria dos casos. Em 2011, segundo dados do Ministério da Saúde, mais de 260 mil pessoas foram infectadas e 69 morreram de malária (a maioria infectada por *P. falciparum*).

Os mosquitos que transmitem a malária pertencem ao gênero *Anopheles* e são conhecidos no Brasil como mosquitos-prego. As espécies existentes na África são mais eficazes que o principal transmissor no Brasil (*A. darlingi*), por preferir o sangue humano aos dos outros animais e por se infectarem mais facilmente com o parasito. O ciclo de vida dos parasitos da malária envolve muitas etapas (figura 1).

32 | CIÊNCIAHOJE | 305 | VOL. 51

DA AMAZÔNIA

Como evitar mortes desnecessárias

Cinco espécies de *Plasmodium* produzem malária humana, e três ocorrem no Brasil: *P. falciparum* (o mais letal), *P. vivax* (o mais comum: causa 90% dos casos atuais) e *P. malariae* (responsável por menos de 1% dos casos). A malária continua endêmica na região amazônica, onde fatores como extensos cursos d'água (onde os mosquitos se reproduzem), elevada temperatura e umidade favorecem o ciclo do parasito, transmitido durante o ano inteiro graças ao grande número de hospedeiros (adultos com sintomas ou assintomáticos, mas com parasitos no sangue).

Casos 'importados' A existência de tantos 'reservatórios' de parasitas e a migração de adultos de outras regiões sem malária dificultam o controle da doença. Dos casos registrados no Brasil, mais de 98% ocorreram na Amazônia. Nas demais regiões, a transmissão foi interrompida há décadas, mas ocorrem casos 'importados' de áreas endêmicas. Minas Gerais, entre 2008 e 2012, registrou 562 casos importados, 344 causados por *P. vivax* e 157 por *P. falciparum*, com 12 falecimentos.

Nesses casos, as mortes resultam de atraso no diagnóstico e no tratamento – o que também acontece nos Estados Unidos, em casos relatados pelo Centro de Controle de Doenças daquele país.

Dados da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde, revelam que a probabilidade de morte por malária, no Brasil, é 100 vezes maior fora da área de endemismo (figura 2). Isso pode ser atribuído ao desconhecimento da doença fora da Amazônia, por falta de contato com essa realidade.

Os principais sintomas da malária são febre elevada regular e intermitente (cede sem medicamentos antitérmicos), dor na cabeça e no corpo, fortes calafrios, suor intenso, falta de apetite e fraqueza. Sem tratamento, a quantidade de parasitos aumenta muito (parasitemia) e leva às complicações da malária grave: febre acima de 41°C, queda na taxa de glicose, redução da função renal, icterícia, distúrbios de consciência e convulsões, quadro quase sempre fatal.

Em nove dos 12 casos fatais recentes de malária em Minas Gerais, a doença foi contraída na África, e to-

ILUSTRACIONAL: SIMONE SCIENCE PHOTO LIBRARY/SPC

>>>

dos evoluíram rapidamente para quadro grave. Portanto, em casos de febre elevada e regular em indivíduos que retornam de áreas onde ocorre malária, é preciso investigar essa possibilidade. Alguns pacientes ou seus familiares, por terem ouvido relatos de casos ou por conviverem com a doença onde residiam ou onde estiveram em viagens, sugerem, no atendimento médico: “Deve ser malária”. Essa queixa deve ser valorizada na consulta.

Por ser uma doença febril aguda, com sintomas típicos (febre elevada associada a ‘tremedeira’ e suor intenso), a malária é fácil de ser reconhecida, mas é necessário identificar a espécie do parasito em exame microscópico de sangue. O sangue do paciente com suspeita de malária deve ser coletado durante ou logo após o pico (paroxismo) febril – que dura de uma a duas horas e decorre da liberação no sangue de grande número de parasitos e do pigmento malárico, quando as hemá-

cias se rompem, e da própria resposta inflamatória do organismo à infecção.

Em Minas Gerais, a Fundação Instituto Oswaldo Cruz diagnosticou, nas décadas de 1970 a 1990, centenas de casos de malária. As solicitações foram espontâneas e, na maioria delas, o tempo entre o surgimento de sintomas e a busca por diagnóstico foi de uma semana. Em caso recente, porém, o rápido diagnóstico evitou a morte do paciente (ver ‘Por pouco’).

Na infecção por *P. falciparum*, apenas hemácias com parasitos jovens (‘anéis’) permanecem no sangue circulante. Aquelas com parasitos em maturação aderem à parede de vasos capilares e afetam a microcirculação, gerando reações inflamatórias, que levam ao bloqueio dos capilares e a sintomas neurológicos – é a malária grave pulmonar e/ou cerebral. Após sucessivos ciclos do parasito, o paciente pode morrer.

Figura 1. Ciclo de vida dos parasitos causadores da malária

1. Ao picar uma pessoa, o mosquito injeta saliva com uma forma do parasito (esporozoíto) em sua corrente sanguínea. Em geral, o período de incubação (da infecção à primeira ocorrência dos sintomas) varia entre sete e 28 dias.

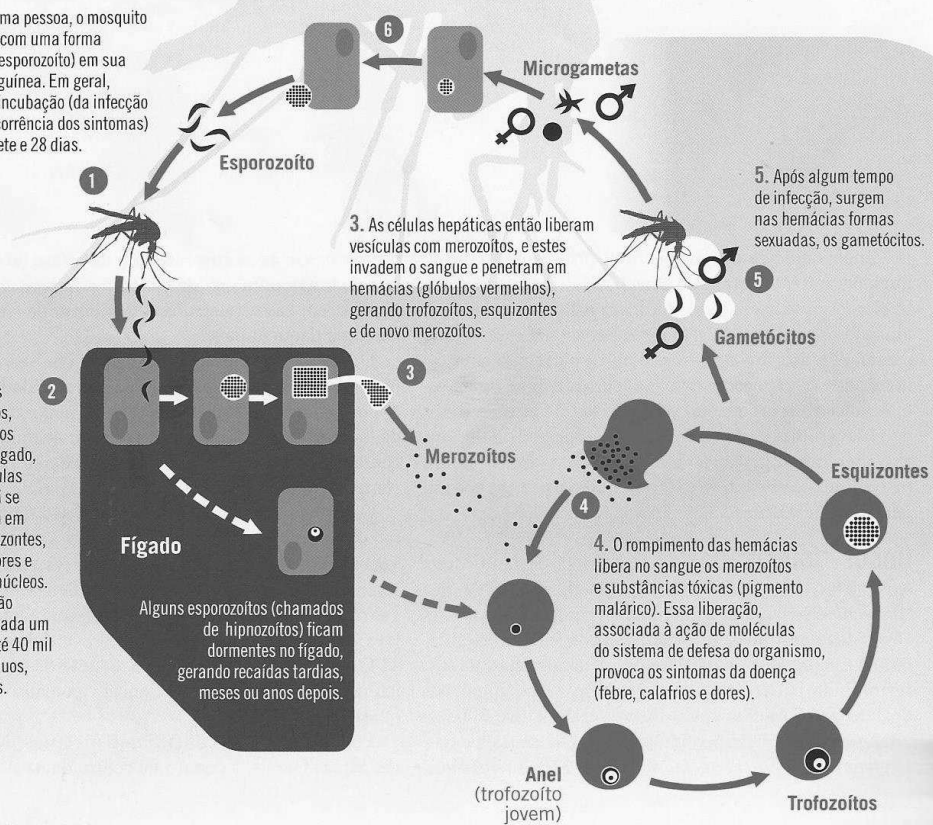
2. Em menos de 30 minutos, os esporozoítos chegam ao fígado, invadem células do órgão e ali se transformam em formas esquizontes, que são maiores e com muitos núcleos. Por reprodução assexuada, cada um pode gerar até 40 mil novos indivíduos, os merozoítos.

6. Se os gametócitos são ingeridos por mosquitos que picam pessoas infectadas, surgem no organismo do inseto gametas que, por reprodução sexuada, geram oocistos com novos esporozoítos, que invadem as glândulas salivares do inseto e podem ser inoculados em outras pessoas, dando continuidade ao ciclo da doença.

3. As células hepáticas então liberam vesículas com merozoítos, e estes invadem o sangue e penetram em hemácias (glóbulos vermelhos), gerando trofozoítos, esquizontes e de novo merozoítos.

5. Após algum tempo de infecção, surgem nas hemácias formas sexuadas, os gametócitos.

4. O rompimento das hemácias libera no sangue os merozoítos e substâncias tóxicas (pigmento malárico). Essa liberação, associada à ação de moléculas do sistema de defesa do organismo, provoca os sintomas da doença (febre, calafrios e dores).



AÇÕES NECESSÁRIAS



Casos de febre alta com dores, suor e tremores, em indivíduos que chegam de área endêmica de malária (sobretudo em voos vindos da África) exigem diagnóstico laboratorial imediato para malária. Ainda nos aeroportos internacionais, uma gota de sangue deve ser coletada no dedo, com lanceta descartável, colocada em lâmina de microscópio, identificada e encaminhada (seca ao ar) a um CRDTM pelo próprio paciente, para agilizar o diagnóstico da doença.



Os serviços médicos de urgência em hospitais e ambulatórios, fora da região endêmica, precisam ser alertados da gravidade da malária importada, agravada pela grande mobilidade das populações. Um diagnóstico adiado por um dia pode ser fatal.



Nos casos de malária por *P. vivax* importada, é preciso minimizar o risco de mosquitos picarem o paciente e gerarem focos da doença em áreas onde já estava erradicada. Essa reintrodução, que seria catastrófica, é favorecida pela movimentação intensa de pessoas e pela existência de mosquitos suscetíveis em todo o país. Para que isso não ocorra, são essenciais campanhas de alerta sobre a doença importada e mudanças nos protocolos de atendimento no sistema de saúde.



Empregadores e viajantes devem ser alertados sobre a possibilidade de contrair malária nas áreas endêmicas, em viagens de lazer ou trabalho, e orientados a insistir com seus médicos, se apresentarem os sintomas típicos durante ou após a viagem de volta, para que seja feito o exame específico. Esse alerta pode ser feito por meio de cartazes e folhetos distribuídos por agências de viagens e nos aeroportos.

Mortes evitáveis A presença de sintomas febris agudos, típicos de malária, em viajantes vindos de áreas endêmicas exige a pesquisa imediata dos parasitos da doença, em especial se o próprio paciente manifesta essa suspeita. Nas regiões do Brasil onde a malária foi eliminada há décadas (Sul, Sudeste), os profissionais não estão familiarizados com a doença, atrasando o diagnóstico por falta de suspeita clínica.

As mortes, fora das áreas endêmicas, em casos de infecção pelo *P. falciparum*, resultam em sua maioria do diagnóstico tardio da doença e podem ocorrer poucos dias após o atendimento inicial. Não é raro que a doença só seja diagnosticada após a morte. Há dois anos, uma jovem diplomata, atendida em hospital privado em Brasília (DF) com sintomas de malária, foi orientada a esperar, em casa, o resultado do exame de PCR para diagnóstico, e não resistiu. Em maio deste ano, mais uma morte por malária (causada por *P. falciparum*) ocorreu em Brasília. Uma brasileira, de 68 anos, vinda da Nigéria, faleceu em um hospital privado, após 10 dias sem diagnóstico correto, tratada para hepatite, devido à presença de icterícia.

Tem sido frequente, no Sul e no Sudeste, a chegada de indivíduos não imunes e com malária – empregados de mineradoras e da construção civil, religiosos, diplomatas, estudantes. Essa constatação aumenta a possibilidade de mortes pela doença e mesmo de reintrodu-

ção da malária em áreas onde atualmente não é mais transmitida.

A repetição de mortes é altamente preocupante e poderia ser evitada. A adoção de algumas medidas (ver 'Ações necessárias') minimizaria esse atraso no diagnóstico e evitaria casos fatais de malária fora das áreas endêmicas do Brasil, nas quais o controle da doença tem sido eficaz há muitas décadas, com a redução do número de casos e de falecimentos. ■

Sugestões para leitura

ANDRADE-NETO, V. F. e KRETTLI, A. U. 'Busca de antimaláricos na medicina popular', em *Ciência Hoje*, v. 35, n° 208, p. 70, 2004.
FUNASA, *Manual de terapêutica da malária*, Brasília, Ministério da Saúde – Vigilância Epidemiológica, 2001.

NA INTERNET

Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS/MS, 2012 (http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Fev/08/dados_malaria_brasil_2010_2011_at2013_svs.pdf)

Centros de Referência para atendimento de malária em viajantes (http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/centros_de_referencia.pdf)

Mortes evitáveis por malária (<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1368&sid=32>)

