

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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE TIAZOLIDINONAS
DERIVADAS DE PRIMAQUINA**

por

FLÁVIO JÚNIOR BARBOSA FIGUEIREDO

Belo Horizonte

Fevereiro/2012

DISSERTAÇÃO MDIP-CPqRR F.J.B. FIGUEIREDO 2012

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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE TIAZOLIDINONAS
DERIVADAS DE PRIMAQUINA**

por

FLÁVIO JÚNIOR BARBOSA FIGUEIREDO

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

Orientação: Profa. Dra. Antoniana Ursine Krettli

Belo Horizonte
Fevereiro/2012

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

F475A Figueiredo, Flávio Júnior Barbosa.
2012

Avaliação de atividade antimalárica de tiazolidinonas derivadas de primaquina / Flávio Júnior Barbosa Figueiredo. – Belo Horizonte, 2012.

XIX, 86 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 87 - 104

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

1. Malária/quimioterapia 2. Primaquina/administração & dosagem 3. *Plasmodium gallinaceum*/parasitologia 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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE TIAZOLIDINONAS
DERIVADAS DE PRIMAQUINA**

por

FLÁVIO JÚNIOR BARBOSA FIGUEIREDO

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profª. Dra. Antoniana Ursine Krettli (Presidente)

Prof. Dr. Luciano Moreira Andrade

Prof. Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo

Suplente: Profª. Dra. Eliana Maria Maurício da Rocha

Dissertação defendida e aprovada em: 24/02/2012

“A descoberta consiste em mesmo vendo o que todo mundo vê, pensar o que ninguém pensou.”

Albert Szent-Gyorgi

Prêmio Nobel em Medicina, 1937

A Deus, pela presença constante em minha vida.

Aos meus pais Flávio e Terezinha, que caminham ao meu lado e que se alegram com cada conquista.

À orientadora desse trabalho, **Professora Antoniana Ursine Krettli**, pelo imenso prazer e entusiasmo em ensinar e fazer Ciência. Os meus agradecimentos pela contribuição à minha formação acadêmica, científica e cultural, pelo constante estímulo, dedicação e, principalmente por ter me aceitado como seu aluno, onde me apontou a importância da Malária Humana e Experimental. Repito a observação de Carlos Chagas em sua tese inaugural: “ *Do que houver de aproveitável neste trabalho, cabem as honras ao mestre que me orientou; foram dele recebidas as verdades que aqui trazemos. Pelos desacertos nele contidos, é responsável único o autor*” .

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou, da Fundação Oswaldo Cruz, sob a orientação da Profa. Dra. Antoniana Ursine Krettli e com suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e PAPES V/FIOCRUZ, a quem agradecemos.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) da Fundação Oswaldo Cruz em Minas Gerais, na pessoa do seu diretor, o Dr. Rodrigo Corrêa-Oliveira.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do CPqRR, na pessoa do seu coordenador, o Prof. Dr. Paulo F. Paolucci Pimenta.

Aos professores Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do CPqRR, pelos ensinamentos, em especial ao Prof. Dr. João Carlos Pinto Dias.

Às secretarias do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do CPqRR, Cristiane Pinheiro Gomes e Andréa Dias da Silva e, mais recente Patricia da Conceição Parreiras.

À Biblioteca do CPqRR, nas pessoas do Segemar Magalhães e Nuzia dos Santos, em prover acesso gratuito e remoto à informação técnico científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

Aos funcionários e técnicos do Biotério de Experimentação Animal, em especial ao Sr. Jaci de Souza pelo cuidado com as aves utilizadas nesse trabalho.

À Dra. Luzia Helena de Carvalho e ao Dr. Luciano Andrade Moreira pela coordenação do insetário do Laboratório de Malária.

Aos técnicos Walison Eustáquio e Fernanda Rezende pelo provimento dos mosquitos necessários para os experimentos.

Aos colegas e amigos do Centro de Pesquisas René Rachou pela convivência agradável.

Aos colegas de Pós-Graduação, em especial Carolina Cunha, Fernanda Trindade, Juvana Moreira e Raquel Fellet.

À Alessandra Orfanó, companheira de modelo experimental, pelas valiosas ajudas sempre que necessárias.

À Renata Cristina de Paula pela disponibilidade em ensinar os protocolos do laboratório e pelo carinho e consideração.

À Dra. Isabela Penna Cérvolo, pelos ensinamentos, alegria e disponibilidade em ajudar.

À Dra. Eliana Maurício pela conversas e sugestões nos resultados com o *P. gallinaceum*.

Ao Dr. Bernardo Franklin pela ajuda na montagem dos gráficos.

Aos amigos, companheiros de pesquisa em antimaláricos, que já fizeram parte do laboratório: Bruna Mazzoni, Débora Salim, Isabela Oliveira, Joaquim Lima, Juliana Mattos e Letícia Albertti.

Às amigas da Equipe AUK: Carol Aguiar, Glaecia Nascimento, Isabel Mayer, Julia Penna e Nicolli Bellotti, pelo companheirismo e pela amizade, bem como pela ajuda na fase final dessa dissertação. Obrigado por fazerem a pesquisa em antimaláricos ainda mais prazerosa.

À amiga e colaboradora Msc. Anna Caroline Campos Aguiar pela realização dos testes de atividade contra o *P. falciparum in vitro* e colaboração em dois trabalhos científicos.

Ao Geraldo Felício (*Xerê*) pelo suporte técnico no laboratório.

Aos estudantes, pesquisadores e funcionários do Laboratório de Malária do CPqRR, em especial a equipe do insetário.

Ao Prof. Dr. Wilson Cunico e seu grupo, pela síntese das tiazolidinonas derivadas de primaquina testadas nesse trabalho.

Aos professores da graduação que me apontaram a Ciência, em especial aos Drs. Flávia Marcia Oliveira, Analina Valadão, Leonardo Ramos e Valfredo Azevedo e as Msc. Martha de Almeida e Orcione Pereira.

Aos amigos que conquistei até aqui, novos e antigos, espalhados pelas diversas partes por onde passei, pela torcida, confiança e amizade.

Àqueles da minha família, que acreditam no meu sonho em tornar-me Cientista e que me incentivam a caminhar, em especial as queridas tias Mirthes, Zenólia, Nely e Luzenilda pelo carinho, ajuda e consideração.

Ao meu primo-irmão, Glaydson Souza, pela torcida e entusiasmo em relação a minha carreira.

Aos animais de experimentação, pela oportunidade de estudar a malária murina e aviária.

Aos órgãos financiadores (CNPq, FAPEMIG, FIOCRUZ e Ministério da Saúde) desse trabalho em especial ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao povo brasileiro que pagando impostos tornou possível a realização desse estudo e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRIA DAS TIAZOLIDINONAS DERIVADAS DE PRIMAQUINA.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XVII
RESUMO	XVIII
ABSTRACT	XIX
1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Malária	21
1.2 Malária no Brasil	22
1.3 Ciclo Evolutivo do <i>Plasmodium</i> spp	22
1.4 Quimioterapia Antimalárica.....	26
1.5 O <i>Plasmodium vivax</i> e os hipnozoítos	27
1.6 A Primaquina e seus derivados	29
1.7 Modelos para testes de antimaláricos	31
2 JUSTIFICATIVA	34
3 OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 Obtenção das tiazolidinonas derivadas de primaquina (PQ)	39
4.2 Solubilização dos compostos para testes de atividade biológica.....	39
4.3 Atividade esquizotocida sanguínea <i>in vitro</i> contra o <i>P. falciparum</i>	40
4.3.1 Cultivo contínuo das formas sanguíneas do parasito.....	40
4.3.2 Sincronização do parasito para utilização nos testes <i>in vitro</i>	40
4.3.3 Preparo das placas para os ensaios de quimioterapia	41
4.3.4 Teste de incorporação de hipoxantina tritiada.....	41
4.3.5 Teste imunoenzimático anti-HRP II	42
4.3.6 Determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento do parasito (IC ₅₀)	43
4.4 Ensaio <i>in vitro</i> de citotoxicidade	43
4.4.1 Cultivo de linhagens celulares.....	43
4.4.2 Preparo de placas	43
4.4.3 Ensaio de citotoxicidade utilizando o MTT	44

4.4.4 Índice de Seletividade.....	44
4.5 Testes em camundongos inoculados com formas sanguíneas do <i>P. berghei</i>	44
4.5.1 Testes de esquizonticida sanguíneo em camundongos.....	44
4.5.2 Determinação da parasitemia.....	45
4.6. Comitê de Ética para uso de animais	45
4.7 Avaliação do efeito das tiazolidinonas derivadas de PQ sobre o ciclo esporogônico do <i>P. gallinaceum</i> em mosquitos <i>Aedes fluviatilis</i>	46
4.7.1 Cepa do <i>P. gallinaceum</i>	46
4.7.2 Aves	46
4.7.3 Mosquitos	46
4.7.4 Teste de atividade gametocitocida das tiazolidinonas derivadas de PQ.....	47
4.8 Análise Estatística.....	48
5 RESULTADOS	49
5.1 Atividade esquizonticida sanguínea de tiazolidinonas contra o <i>P. falciparum</i>	50
5.2 Atividade citotóxica das tiazolidinonas e índices de seletividade	53
5.3 Atividade esquizonticida sanguínea supressiva de tiazolidinonas contra o <i>P. berghei</i> (cepa NK65) em camundongos.....	55
5.4 Atividade gametocitocida das tiazolidinonas medida pela inibição da formação de oocistos do <i>P. gallinaceum</i> em <i>Aedes fluviatilis</i>	57
6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÕES	82
8 PERSPECTIVAS	84
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
Rosenthal PJ, Miller LH. The need for new approaches to antimalarial chemotherapy. In Rosenthal PJ, editors. Antimalarial chemotherapy: mechanisms of action, resistance, and new directions in drug discovery. Totowa: Humana Press; 2001. P. 3-13.	99
Tilley L, Loria P, Foley M. Chloroquine and other quinoline antimalarials. In Rosenthal PJ, editors. Antimalarial chemotherapy: mechanisms of action, resistance, and new directions in drug discovery. Totowa: Humana Press; 2001. P. 87-122.	101

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Estrutura química da primaquina, tafenoquina e ebulaquina.....30
- Figura 2-** Estrutura química das tiazolidinonas derivadas de primaquina.....39
- Figura 3 -** Grupos controles, mostrando a dispersão do número de oocistos nos estômagos de *A. fluviatilis* dissecados no sétimo dias após repasto sanguíneo feito na mesma ave com *P. gallinaceum*, feitos no tempo zero (0h) e 6h depois.....60
- Figura 4 -** Dispersão do número de oocistos nos estômagos de *A. fluviatilis* dissecados no sétimo dias após repasto sanguíneo em aves infectadas com *P. gallinaceum*, feito antes (0h) e 6h após tratamento com **PQ** (15mg/Kg) e **DMSO** (veículo) em dose única por via oral.....61
- Figura 5 -** Dispersão do número de oocistos nos estômagos de *A. fluviatilis* dissecados no sétimo dias após repasto sanguíneo em aves infectadas com *P. gallinaceum*, feito antes (0h) e 6h após tratamento com derivados de PQ em dose única de 100mg/Kg por via oral.....62
- Figura 6 -** Dispersão do número de oocistos nos estômagos de *A. fluviatilis* dissecados no sétimo dias após repasto sanguíneo em aves infectadas com *P. gallinaceum*, feito antes (0h) e 6h após tratamento com N25B e N87B em dose única por via oral.....64
- Figura 7 -** Dispersão do número de oocistos nos estômagos de *A. fluviatilis* dissecados no sétimo dias após repasto sanguíneo em aves infectadas com *P. gallinaceum*, feito antes (0h) e 6h após tratamento com P89A e P92A em dose única por via oral.....64
- Figura 8 -** Dispersão do número de oocistos nos estômagos de *A. fluviatilis* dissecados no sétimo dias após repasto sanguíneo em aves infectadas com *P. gallinaceum*, feito antes (0h) e

6h após tratamento com **N14A** em dose única por via oral.....67

Figura 9 - Dispersão do número de oocistos nos estômagos de *A. fluviatilis* dissecados no sétimo dias após repasto sanguíneo em aves infectadas com *P. gallinaceum*, feito antes (0h) e 6h após tratamento com **N17A** em dose única por via oral.....69

Figura 10 - Estrutura geral de uma 8-aminoquinolina mostrando os pontos (R) para modificações estruturais.....80

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Avaliação da atividade de tiazolidinonas derivadas de PQ, contra o *P. falciparum* (clone W2, cloroquina resistente), nos testes imunoenzimático anti-HRP2 e de hipoxantina, em experimentos independentes.....51
- Tabela 2** - Média e desvio padrão da atividade de derivados de PQ contra o *P. falciparum* (clone W2), nos ensaios imunoenzimático anti-HRP2 e de hipoxantina em experimentos independentes.....53
- Tabela 3** - Avaliação da atividade citotóxica e índice de seletividade (IS) de tiazolidinonas derivadas de PQ, em células de hepatoma humano (HepG2) e células renais de macaco (BGM).....54
- Tabela 4** - Atividade antimalárica de tiazolidinonas derivadas de PQ, testadas na dose de 50mg/Kg, por via oral, em três dias consecutivos, em camundongos com o *P. berghei*, cepa NK65.....55
- Tabela 5** - Atividade antimalárica de tiazolidinonas derivadas de PQ, testadas na dose de 50mg/Kg, por via oral, em três dias consecutivos, em camundongos com o *P. berghei*, cepa NK65.....56
- Tabela 6** - Número de oocistos em estômagos de *A. fluviatilis* controles, alimentados duas vezes em aves infectadas com *P. gallinaceum*, controles não tratadas, utilizadas como fonte do repasto sanguíneo no tempo zero (0h) e seis horas após (6h).....58
- Tabela 7** - Efeito inibitório de primaquina (PQ, 15mg/Kg), em quatro diferentes experimentos, na esporogonia do *P. gallinaceum* em mosquitos *A. fluviatilis* alimentados antes (0h) e 6h após o tratamento da ave infectada, por via oral; DMSO (veículo) não causou inibição da esporogonia.....59
- Tabela 8** - Efeito de tiazolidinonas derivadas de PQ, na esporogonia do *P. gallinaceum* em mosquitos *A. fluviatilis* alimentados antes (0h) ou 6h após tratamento da ave infectada, via oral, com os compostos em um único experimento realizado.....62

- Tabela 9** - Efeito de tiazolidinonas derivadas de PQ, na esporogonia do *P. gallinaceum* em mosquitos *A. fluviatilis* alimentados antes (0h) e 6h após tratamento da ave infectada, via oral, com os compostos, em diferentes experimentos.....63
- Tabela 10** - Efeito de N14A, derivado de primaquina, na esporogonia do *P. gallinaceum* em mosquitos *A. fluviatilis* alimentados antes (0h) e 6h após tratamento da ave infectada, via oral, com os compostos, em diferentes experimentos.....66
- Tabela 11** - Efeito de N17A, derivado de primaquina, na esporogonia do *P. gallinaceum* em mosquitos *A. fluviatilis* alimentados antes (0h) e 6h após tratamento da ave infectada, via oral, com os compostos, em diferentes experimentos.....68
- Tabela 12** - Atividade de PQ e das tiazolidinonas contra *P. falciparum in vitro* (IC₅₀), contra *P. berghei* em camundongos, como gametocitocida no *P. gallinaceum* em mosquitos alimentados em aves tratadas, e sua citotoxicidade para células de hepatoma humano (HepG2).....70

LISTA DE ABREVIATURAS

ACT – *Artemisinin-based combination therapy*

AS – Artemisinina

BGM – Linhagem celular de macaco verde Africano

CPqRR – Centro de Pesquisas René Rachou

CQ – Cloroquina

DMSO – Dimetilsulfóxido

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

FEE – Formas exo-eritrocíticas

G6PD–Glicose 6-fosfatodesidrogenase

HepG2 – Célula de hepatoma humano

HRPII – *Histidine rich protein II*

IC₅₀ – Concentração inibitória 50%

IS – Índice de seletividade

MDL₅₀ – Mínima Dose Letal 50%

MTT – Brometo 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Tampão de Fosfato e salina

PBS-T – Tampão de Fosfato e salina com Tween 20 à 0,05%

PQ – Primaquina

QN – Quinina

rpm – Rotação por minuto

RPMI – Meio de Cultura (“Roswell Park Memorial Institute”)

SBF – Soro Bovino Fetal

RESUMO

A malária, uma das principais doenças parasitárias no mundo, segundo a Organização Mundial de Saúde, tem como espécie mais disseminada o *Plasmodium vivax*. Responsável por mais 80% dos casos registrados anualmente no Brasil, essa espécie, origina formas hepáticas primárias e formas latentes (hipnozoítos) originadas dos esporozoítos inoculados pelos mosquitos infectados, causando as recaídas tardias da malária. O tratamento da malária pelo *P. vivax* requer, portanto, além da cloroquina, para eliminar as formas sanguíneas, a primaquina (PQ), uma 8-aminoquinolina, necessária para a cura radical da doença. A PQ elimina os hipnozoítos, sendo também usada como gametocitocida. Seus metabólitos causam anemia hemolítica em indivíduos deficientes da enzima G6PD, necessitando, portanto ser substituída. Neste trabalho, foi testada a atividade biológica de tiazolidinonas derivadas de PQ: (i) contra formas sanguíneas de cultivo do *P. falciparum*, através de teste imunoenzimático (anti-HRP2) ou pela incorporação de hipoxantina tritiada pelos parasitos; (ii) contra a malária pelo *P. berghei* em camundongos, medindo a supressão da parasitemia; (iii) anti-gametócitos, avaliada através da inibição da formação de oocistos em mosquitos *Aedes fluviatilis* alimentados com sangue de aves infectadas com *P. gallinaceum*, horas após seu tratamento com os compostos, em comparação com grupos alimentados na mesma ave antes do tratamento. A inibição da esporogonia é considerada indicador indireto de atividade anti-hipnozoíto do composto, com base nos achados com PQ nesse modelo. O efeito citotóxico das novas tiazolidinonas e da PQ foi medido *in vitro* em células de mamíferos, utilizando uma linhagem de hepatoma humano, HepG2, e uma de células renais de macaco (BGM). Todas as tiazolidinonas tiveram baixa toxicidade *in vitro*, ao contrário de PQ. Alguns compostos demonstraram intensa atividade esquizogônica *in vitro* contra o *P. falciparum* e em camundongos com malária. Três tiazolidinonas (N14A, N17A e P91A) inibiram significativamente a formação de oocistos nos estômagos dos mosquitos ($p < 0,0001$). No entanto, nenhuma delas foi tão ativa quanto a PQ. O modelo de inibição de oocistos mostrou-se reprodutível na triagem de compostos gametocitocidas, mas a atividade inequívoca anti-hipnozoítos desses compostos necessita ser ainda demonstrada em macacos *Rhesus* infectados com esporozoítos do *P. cynomolgi*, inexistentes no Brasil. Se ativas, tais tiazolidinonas seriam novos fármacos úteis a substituir a PQ na prevenção das recaídas tardias da malária humana pelo *P. vivax*.

ABSTRACT

Malaria, one of the world major parasitic diseases according to the World Health Organization, presents *Plasmodium vivax* as its most widespread species. Responsible for over 80% of the cases recorded annually in Brazil, this species has primary and dormant hepatic forms (hypnozoites) that causes causing the late relapses of the disease. Treatment of *P. vivax* malaria demands not only chloroquine to eliminate blood parasites, but also primaquine (PQ), an 8-aminoquinoline needed for the radical cure of the disease. PQ eliminates hypnozoites and is also used as a gametocidal drug. Its metabolites cause haemolytic anemia in those who lack the enzyme glucose-6-phosphate and thus needs to be replaced. In the present work, thiazolidinones derived from primaquine were evaluated for their biological activity: (i) against cultured *P. falciparum* using the anti-HRP-II immunoenzymatic assay or the hypoxanthine method; (ii) against *P. berghei* in mice by which the suppression of parasitemia was evaluated; (iii) against gametocides, measured through the inhibition of oocyst formation in *Aedes fluviatilis* mosquitoes fed on *P. gallinaceum*-infected birds, hours after treatment with the compounds, in relation to the groups fed on the same bird before treatment. The inhibition of sporogony is considered an indirect indicator of anti-hypnozoite activity of the compound based on PQ findings using this experimental model. The cytotoxic effects of the new thiazolidinones and PQ were evaluated *in vitro* using the hepatoma cell line HepG2 and monkey kidney cells (BGM). All compounds exhibited low *in vitro* toxicity, unlike PQ. Some compounds exhibited intense schizontic activity *in vitro* against *P. falciparum* and against *P. berghei*. N14A, N17A and P91A inhibited significantly ($p < 0.0001$) oocyst formation. However, none of them was as active as PQ. The oocyst inhibition model was shown to be reproducible for sorting the gametocidal compounds but the unequivocal anti-hypnozoite activity of the compounds evaluated in this work remains to be demonstrated in *Rhesus* monkeys infected with *P. cynomolgi* sporozoites, which do not exist in Brazil. If active, such thiazolidinones may be new drugs to replace PQ to prevent late relapses of human malaria caused by *P. vivax*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária

A malária é uma doença infecciosa e parasitária causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, filo Apicomplexa, e é transmitida ao homem pela picada da fêmea de mosquitos do gênero *Anopheles*. São descritas cerca de 170 espécies de *Plasmodium* que parasitam os mais diversos animais como aves, répteis e mamíferos (Schall, 1990). No entanto, apenas cinco espécies são capazes de infectar o homem, o *P. falciparum* e *P. vivax*, os parasitos mais frequentemente encontrados, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (Good, 2011), sendo esse último um parasito de símios, assinalado recentemente no ser humano (Cox-Singh, 2009).

A doença ocorre em 106 países (Alonso *et al.*, 2011), sendo endêmica nas regiões tropicais e subtropicais da África, sudeste Asiático e América Latina. Metade da população mundial (3,3 bilhões de pessoas) está exposta à transmissão em áreas de risco (Hay *et al.*, 2009). Em 2010 a malária foi responsável por aproximadamente 655 mil mortes e 216 milhões de casos e destes, 81% ocorreram em regiões da África e 86% em crianças menores que cinco anos (WHO, 2011).

O impacto da malária na saúde humana e no desenvolvimento socioeconômico a tornaram o principal foco da agenda de desenvolvimento internacional, que tem como objetivo o controle e a erradicação global da doença. No entanto, diversos fatores dificultam tal objetivo como: i) a complexidade do parasito; ii) a heterogeneidade do vetor, que compreende mais de 30 espécies de mosquitos anofelinos, com diferentes tipos de comportamento; iii) as diferenças na dinâmica da área endêmica, como fatores ambientais, humanos e sociais e iv) as dificuldades operacionais, como escassez de recursos humanos e financiamento (Alonso *et al.*, 2011). Apesar disso, os programas de controle das agências de saúde foram bem sucedidos e reduziram mais de 50% da incidência da doença em 11 países africanos (Morel *et al.*, 2005).

O controle da malária é realizado utilizando-se diferentes medidas, que incluem diagnóstico específico, o tratamento imediato com antimaláricos e a proteção individual contra a picada de mosquitos, realizada com uso de repelentes e mosquiteiros impregnados com inseticidas (WHO, 2010). Ainda não há uma vacina eficaz disponível (de Ridder *et al.*, 2008), no entanto, diversas proteínas recombinantes tem sido testadas em seres humanos na África (Schwartz *et al.*, 2012). Recentemente, um protocolo de vacinação em estudo de Fase 3, demonstrou 50% de proteção em crianças africanas que receberam três doses da vacina RTS,S/AS01 (Agnandji *et al.*, 2011), um híbrido construído com antígenos de superfície do vírus da Hepatite B e com uma proteína recombinante derivada de parte da proteína circum-

esporozoíto do *Plasmodium* (White, 2011a). Entretanto, apesar de todas intervenções de controle quem vem sendo tomadas, a quimioterapia é ainda a principal estratégia no combate da malária (de Ridder *et al.*, 2008).

1.2 Malária no Brasil

No Brasil, a malária é causada pelas espécies *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, sendo endêmica na Amazônia Legal (Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e parte do estado do Maranhão) onde 99% do total dos casos são registrados. No ano de 2009 foram registrados aproximadamente 306 mil casos de malária, sendo 83,7% e 16,7%, causados, respectivamente, pelo *P. vivax* e *P. falciparum* (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010). Na região extra-amazônica, mais de 80% dos casos registrados são importados, principalmente, da área endêmica ou do continente africano (Brasil, 2009).

Apesar da ampla distribuição do *Anopheles darlingi*, principal vetor da malária no Brasil, presente em 80% do país, a incidência da doença restringe-se praticamente à região da Bacia Amazônica, onde diversos fatores combinados favorecem a transmissão e prejudicam as medidas de controle (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010). A transmissão da malária no Brasil ocorre normalmente em áreas de mineração, acampamentos e assentamentos agrícolas, os quais induzem mudanças ambientais que alteram a biologia do vetor. Além disso, esses lugares são habitados, em sua grande maioria, por indivíduos não imunes que se aglomeram em regiões próximas ao local de reprodução dos mosquitos (da Silva-Nunes *et al.*, 2011).

O Plano Nacional de Controle da Malária (PNCM), do Ministério da Saúde, tem reduzido drasticamente o número de mortes, casos graves, hospitalizações e incidência da doença no país, baseando-se no diagnóstico e tratamento precoce dos indivíduos infectados (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010), mas tem sido dificultado pela dispersão de cepas do *P. falciparum* e *P. vivax* resistentes aos antimaláricos disponíveis (Zalis *et al.*, 1998; Alecrim *et al.*, 1998). A possibilidade do surgimento, no Brasil, de resistência à terapia combinada à base de artemisinina e a ausência de antimaláricos alternativos, torna necessária a investigação de novos medicamentos que possam substituir os atuais (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010).

1.3 Ciclo Evolutivo do *Plasmodium* spp

O ciclo evolutivo dos plasmódios envolve uma fase de multiplicação assexuada no hospedeiro vertebrado e outra sexuada no inseto vetor (anofelinos, no caso da malária de mamíferos e culicíneos no caso da malária aviária); essa última culmina com a produção de esporozoítos, os quais, se inoculados pela fêmea infectada do mosquito na epiderme do vertebrado, inicia a infecção. Os esporozoítos podem ser inoculados diretamente nos vasos ou na pele do vertebrado, onde se movimentam ativamente pelo epitélio até atingirem um vaso sanguíneo alcançando o sistema circulatório (70%) ou linfático (30%) (Vanderberg & Frevert, 2004).

Os esporozoítos podem invadir e evoluir em diferentes tipos de células a depender da espécie de plasmódio. No caso dos plasmódios aviários, como o *P. gallinaceum*, são células do sistema fagocítico mononuclear, os macrófagos, inicialmente no tecido subcutâneo no local do inóculo, nas células retículo-endoteliais do fígado, encéfalo, baço e medula óssea que albergam as formas exo-eritrocíticas (FEE) (Paraense, 1943; Huff & Coulston, 1944). Na malária de mamíferos, acreditava-se que os esporozoítos diferenciavam-se exclusivamente nos hepatócitos, no entanto Mota *et al.* (2001) utilizando o *P. berghei in vitro*, demonstraram que tais formas do parasito invadem e evoluem em macrófagos. Na análise desse trabalho, feita posteriormente por Krettli & Miller (2001), os autores chamam atenção para observações da literatura com malária humana, e descrevem a permanência de esporozoítos íntegros no local da picada, dentro de células no tecido subcutâneo. Outros trabalhos especulam que até chegarem a um vaso sanguíneo, os esporozoítos podem ser transportados passivamente por linfócitos ou macrófagos (Krettli & Dantas, 2000).

Recentemente, foi demonstrado na malária de roedores, que após a picada do mosquito, 50% dos esporozoítos permanecem no local de inoculação, e 10% destes evoluem e se diferenciam na epiderme e derme do hospedeiro; além disso, algumas formas podem permanecer dormentes no folículo piloso, posteriormente sendo ativadas, servindo como fonte para nova onda de parasitemia (Gueirard *et al.*, 2010).

Ao chegarem ao fígado, os esporozoítos invadem os hepatócitos, multiplicam-se por esquizogonia e dão origem aos merozoides, dos quais os merozoítos são liberados. Nesse local, o parasito modifica o hepatócito, utilizando-o como uma vesícula e evitando a fagocitose pelos macrófagos residentes, também chamados de células de Küpffer (Sturm *et al.*, 2006). Nas infecções pelo *P. vivax* e *P. ovale* algumas formas evolutivas dos parasitos, denominadas hipnozoítos, permanecem latentes nos hepatócitos e, são consideradas como responsáveis pelas recaídas tardias da doença (Wells *et al.*, 2010). Essas formas hepáticas latentes já foram demonstradas em símios infectados com esporozoítos de *P. vivax* (Krotoski

et al., 1982a). Os determinantes biológicos que levam ao desenvolvimento e/ou ativação dos hipnozoítos ainda são desconhecidos (Mueller *et al.*, 2009).

Os parasitos do ciclo exo-eritrocítico nos plasmódios aviários, tem uma capacidade de se diferenciar muito diferente do ciclo da malária de mamíferos. Assim, as formas teciduais primárias geradas pelos esporozoítos não se diferenciam nos hepatócitos, sendo encontradas em monócitos, macrófagos, células do endotélio em vários órgãos, podendo originar novas formas exo-eritrocíticas (FEE) secundárias ou as formas sanguíneas. Os merozoítos sanguíneos, por sua vez também podem originar novas FEE. Deste modo, o ciclo exo-eritrocítico nas aves pode ter origem nos esporozoítos, nos merozoítos das FEE ou das formas sanguíneas (Krettli, 1994; Frevert *et al.*, 2008).

No caso da malária de mamíferos, uma vez na circulação sanguínea, os merozoítos apenas são capazes de invadir os eritrócitos, iniciando o ciclo eritrocítico ou se diferenciando em formas sexuadas, os gametócitos. A invasão dos eritrócitos pelos merozoítos se dá por interações entre proteínas do parasito e receptores específicos presentes na superfície da célula hospedeira, como as sialoglicoproteínas e o receptor DARC (*Duffy antigen/receptor for chemokines*) para quimiocinas, nos casos do *P. falciparum* e *P. vivax*, respectivamente. Esse processo de invasão é complexo e envolve muitas etapas, incluindo: i) reconhecimento e adesão reversível do merozoíto à membrana do eritrócito; ii) reorientação apical do merozoíto em direção à membrana da célula hospedeira; iii) formação de uma junção irreversível no ponto de contato entre o cone apical do parasito e a membrana celular do eritrócito e iv) movimento da junção ao redor do merozoíto com simultânea invaginação da membrana do eritrócito, até que o parasito se encontre dentro da célula e seja circundado pelo vacúolo parasitóforo (Gaur *et al.*, 2004).

Nos eritrócitos, os merozoítos são denominados trofozoítos ou anéis, crescem e sofrem nova esquizogonia (24 a 72h após invasão), onde novos merozoítos são liberados na corrente sanguínea invadindo outros eritrócitos. O ciclo eritrocítico se repete a cada 48 a 72h, a depender da espécie de plasmódio, sendo aparentemente sincronizado principalmente pela melatonina (Hotta *et al.*, 2000). Esse sincronismo, e o conseqüente rompimento dos eritrócitos infectados é o que causa as febres cíclicas nas infecções pelo *Plasmodium*, com uma periodicidade ou paroxismos típico da doença.

Uma pequena proporção dos merozoítos se diferencia em formas evolutivas sexuadas do parasito, os gametócitos masculinos e femininos, os quais amadurecem sem sofrerem nova divisão celular, evoluindo apenas se ingeridas pelo mosquito suscetível, dando origem ao ciclo sexuado esporogônico no hospedeiro invertebrado (Baker, 2010). Minutos após o

repasto sanguíneo infectante, os gametócitos ingeridos se diferenciam, originando gametas móveis que emergem do eritrócito. O gametócito masculino ou microgametócito, sofre exflagelação (formação dos microgametas) no lúmen do intestino médio dos mosquitos, sendo o evento regulado por fatores específicos, como diminuição da temperatura, aumento do pH, e exposição ao ácido xanturênico, um subproduto do metabolismo do triptofano (Billker *et al.*, 1998). A fusão dos gametas resulta no zigoto, que por ser uma estrutura móvel, é denominada oocineto, o qual atravessa a matriz peritrófica -uma estrutura acelular que recobre o intestino médio abdominal do mosquito- e iniciam o processo de invasão do epitélio intestinal (Ghosh *et al.*, 2000). Os mecanismos celulares envolvidos nessa migração ainda são pouco elucidados; no entanto, Shahabuddin & Pimenta (1998), utilizando um sistema de cultura *in vitro*, sugeriram que oocinetos de *P. gallinaceum* invadem um tipo celular específico que expressa altos níveis de ATPase, diferentes de outras células epiteliais presentes no intestino médio de *Aedes aegypti*, que foi denominada células de Ross.

Posteriormente, através de técnicas de imunofluorescência do intestino médio de *Anopheles stephensi* infectados com o *P. berghei*, foi indicado que os oocinetos também podem invadir os pontos onde as membranas celulares apicais de células adjacentes se encontram, invadindo estas células, as quais entram em apoptose com perda das microvilosidades e fragmentação do DNA (Han *et al.*, 2000). Tais eventos foram observados posteriormente em *P. falciparum*, onde oocinetos foram detectados atravessando o epitélio de *A. stephensi* (Baton & Ranford-Cartwright, 2004) e com *P. gallinaceum* invadindo *A. aegypti* (Gupta *et al.*, 2005). Apesar disso, Gupta *et al.* (2005), sugeriram que os mecanismos envolvidos no processo de invasão podem variar com a espécie de mosquito infectado, explicando diferenças entre o modelo proposto por este grupo e aquele anteriormente reportado por Shahabuddin & Pimenta (1998).

Depois de atravessar o epitélio intestinal do inseto, o oocineto atinge o espaço extracelular (entre o epitélio do intestino médio e a lâmina basal), onde se forma o oocisto. Milhares de novos esporozoítos são formados por reprodução assexuada dentro do oocisto encapsulado, gerando fragmentação da cápsula e propiciando o escape dos esporozoítos para a hemolinfa (Meis *et al.*, 1992). Na hemolinfa, o parasito segue em direção à glândula salivar e cerca de 10% a 20% dos esporozoítos conseguem invadir as glândulas salivares do mosquito, onde se alojam (Rosenberg & Rungsiwongse, 1991). A invasão das glândulas salivares pelos esporozoítos ocorre através de interações entre receptores específicos do parasito e ligantes presentes na superfície celular da glândula salivar (Vlachou *et al.*, 2006). As principais proteínas do parasito envolvidas nesse processo de invasão são a TRAP (Proteína Adesiva

Relacionada à Trombospondina) e a CSP (Proteína circumesporozoíto) (Touray *et al.*, 1992). Um estudo realizado por Barreau *et al.* (1999) demonstrou que anticorpos monoclonais dirigidos contra a superfície celular das glândulas salivares inibem a invasão dos esporozoítos. Warburg *et al.* (1992) mostraram que anticorpos monoclonais anti-CSP inibem completamente a invasão das glândulas salivares do *Aedes aegypti* pelo *P. gallinaceum*. Uma vez nas glândulas salivares, os esporozoítos são inoculados pelo mosquito vetor, ao exercer o hematofagismo, no hospedeiro vertebrado suscetível.

1.4 Quimioterapia Antimalárica

Os antimaláricos têm diferentes aplicações terapêuticas e agem nas diversas formas do parasito sendo caracterizados, portanto, como esquizonticidas sanguíneos, teciduais, gametocitocidas e esporozoitocidas. Os esquizonticidas sanguíneos atuam contra as formas assexuadas do ciclo eritrocítico, que são as causadoras dos sintomas. Nesse grupo incluem-se a maioria dos antimaláricos, como a quinina, cloroquina, mefloquina, halofantrina, artemisinina e derivados. Compostos com ação contra os estágios teciduais primários do parasito são denominados esquizonticidas teciduais, ou profiláticos causais. Dentre eles estão amodiaquina, atavaquona, doxiciclina, pirimetamina, proguanil e primaquina, que é o único fármaco capaz de destruir os hipnozoítos (Rosenthal & Miller, 2001).

A maior parte dos antimaláricos utilizados no tratamento da malária humana é derivada do anel quinolínico, responsável pela atividade da quinina, extraída de plantas do gênero *Cinchona* (*Cinchona calisaya* e *C. succirubra*) encontradas na Amazônia Peruana, ausente no Brasil. A quinina foi a base para a formulação da cloroquina e numerosos outros compostos ativos durante a Segunda Guerra Mundial. Obtida por síntese, a cloroquina foi empregada durante décadas, sendo ativa contra todas as espécies de *Plasmodium* spp., além de ser produzida a baixo custo e ter baixa toxicidade (Rathore *et al.*, 2005). A cloroquina foi utilizada mundialmente durante décadas, como monoterapia, no tratamento de pacientes infectados e na profilaxia doença em áreas endêmicas (Tilley *et al.*, 2001). Com o aparecimento de isolados de *P. falciparum* cloroquina-resistentes, novos antimaláricos foram sintetizados, e utilizados em substituição à cloroquina (Rathore *et al.*, 2005).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem recomendado terapias de combinação com artemisinina (*Artemisinin-based combination therapy* ACT), as quais são baseadas em associações da artemisinina, ou um de seus derivados, com um antimalárico ou outro fármaco

de classes diferentes, inclusive antibióticos (de Ridder *et al.*, 2008; WHO, 2010b). Os derivados da artemisinina foram obtidos por modificação química desta molécula e sintetizados para melhorar suas características farmacocinéticas (Li & Wu, 2003). Apesar da associação desses compostos, o surgimento de resistência à ACT foi relatado na literatura desde 2004, quando o primeiro caso de recrudescência foi descrito no Camboja (Dondorp *et al.*, 2011).

A múltipla resistência dos plasmódios humanos à maioria dos antimaláricos disponíveis (Parija & Praharaj, 2011), a elevada toxicidade da PQ, único medicamento disponível para tratar as recaídas tardias da malária, e o fato de seu controle depender essencialmente da quimioterapia específica, sugere a necessidade da identificação de novos protótipos de fármacos que possam ser empregados no tratamento da doença (Ridley, 2002).

A busca por novos antimaláricos é feita empregando-se diferentes abordagens (Rosenthal, 2003). As principais são: i) a otimização de terapias já existentes (Duarte *et al.*, 2001) e testes de medicamentos comercialmente disponíveis (Penna-Coutinho *et al.*, 2011); ii) a utilização de plantas medicinais e de compostos delas extraídos (Krettli *et al.*, 2009a); iii) o estudo computacional de ancoramento e “*high-throughput screening*” (Tonmunphean *et al.*, 1998); e, iv) o desenvolvimento de análogos e híbridos de fármacos já utilizados para tratar malária (Capela *et al.*, 2011). Esta última é considerada promissora, uma vez que modificações na estrutura de fármacos podem alterar as suas propriedades e, eventualmente, melhorar a atividade farmacológica, abordagem proposta no presente trabalho.

1.5 O *Plasmodium vivax* e os hipnozoítos

O *P. vivax* é a espécie responsável pelo maior número de casos de malária humana no mundo (80 a 300 milhões de casos clínicos anuais) e ameaça 40% da população exposta em áreas de risco (Hay *et al.*, 2004). Trata-se da espécie mais amplamente distribuída no mundo, sendo comum na Ásia, Oceania, Américas Central e do Sul e Oriente Médio (Mueller *et al.*, 2009). No Brasil, em 2010, dos 306.908 casos de malária registrados, 85% foram causados por essa espécie (Pereira *et al.*, 2011).

As infecções por *P. vivax*, anteriormente consideradas benignas, tem causado complicações graves, algumas ocasionando óbitos (Anstey *et al.*, 2009). No Brasil, de 1998 a 2008, 234 mortes por malária *P. vivax* foram relatadas na Amazônia Brasileira (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010). Trabalhos recentes relatam casos de malária grave pelo *P. vivax* na Índia

(Kochar *et al.*, 2009), Indonésia (Tjitra *et al.*, 2008) e no Brasil (Alexandre *et al.*, 2010). Em paralelo, ocorreu a identificação de cepas cloroquina-resistentes (Rieckmann *et al.*, 1989), inclusive no Brasil (de Santana Filho *et al.*, 2007).

As dificuldades no controle dessa espécie de plasmódio tem sido explicadas por diversas razões, dentre elas: i) a biologia do *P. vivax* é diferente das outras espécies, possuindo peculiaridades na gametocitogênese (Baker, 2010) e no desenvolvimento exo-eritrocítico, os quais podem explicar os diversos surtos da doença; ii) a resposta do *P. vivax* a alguns antimaláricos é diferente quando comparado ao *P. falciparum*; iii) o comportamento e a fisiologia dos mosquitos vetores, que muitas vezes são desconhecidas nas regiões onde *P. vivax* é endêmico e iv) a falta de pesquisas e financiamentos, que limitou por anos o entendimento desta espécie (Sattabongkot *et al.*, 2004).

A principal característica do *P. vivax*, que o distingue das outras espécies, com exceção do *P. ovale*, que infectam humanos, é o desenvolvimento dos hipnozoítos hepáticos, os quais são responsáveis pelas recaídas tardias da doença (Mueller *et al.*, 2009). Esse fenômeno também ocorre na malária de símios causada por *P. cynomolgi*, *P. fieldi*, *P. semiovale* e *P. schwetzi* e em infecções causadas por *P. ovale* (Hulden & Hulden, 2011), sendo esta última recentemente questionada (Richter *et al.*, 2010).

Os hipnozoítos foram primeiramente observados em infecções por *P. cynomolgi* em macacos *Rhesus* (Krotoski *et al.*, 1982b) e, posteriormente, em biópsias hepáticas de chimpanzés infectados com esporozoítos de *P. vivax* (Krotoski *et al.*, 1982a). Até o presente momento, pouco se sabe sobre a natureza bioquímica e celular dos hipnozoítos, ou dos eventos moleculares envolvidos no seu processo de formação e/ou ativação (Dembele *et al.*, 2011). No entanto, fatores como características genéticas de cada cepa (Imwong *et al.*, 2007) e a exposição prévia do hospedeiro à picada por mosquitos não infectados (Hulden, 2011) tem tentado explicar este processo. A proporção de infecções que gera recaídas varia consideravelmente entre as regiões geográficas (em Zonas Tropicais a proporção de recaídas é maior quando comparada às Zonas Temperadas) e entre as propriedades intrínsecas do parasito. Já o intervalo de recaídas, que pode variar de meses a anos, é consequente do número de esporozoítos inoculados e da imunidade do hospedeiro vertebrado (White, 2011b).

O protocolo de tratamento da malária causada pelo *P. vivax* é complexo e exige a associação de um esquizotocida sanguíneo, nesse caso a cloroquina (dose de 10mg/Kg de peso no primeiro dia de tratamento, seguido por uma dose de 7,5mg/Kg de peso no segundo e terceiro dias) e outro fármaco de ação tecidual, contra os hipnozoítos, neste caso a primaquina (regimes de doses diárias de 0,25-0,50mg/Kg por 14 dias) (WHO, 2010b). No entanto, a PQ é

extremamente tóxica e causa efeitos colaterais graves, necessitando, portanto, de ser substituída (Baird & Hoffman, 2004), já que os hipnozoítos representam um dos maiores obstáculos para o controle da malária no mundo (Wells *et al.*, 2010) e a sua completa eliminação depende essencialmente do tratamento medicamentoso dificultado pelo número limitado de fármacos ativos contra tais formas e pela toxicidade da primaquina (Baird, 2009).

1.6 A Primaquina e seus derivados

A primaquina (PQ), uma 8-aminoquinolina (8-AQ), foi primeiro sintetizada nos Estados Unidos da América (EUA) como parte do programa de desenvolvimento em massa de antimaláricos durante a década de 40 (Sweeney 2000). Ao contrário dos demais antimaláricos, exerce um amplo espectro de ação sobre as formas assexuadas e sexuadas do parasito, sendo o único fármaco disponível para tratar as recaídas tardias através da destruição dos hipnozoítos latentes no fígado (Mueller *et al.*, 2009). Além disso, devido à sua atividade gametocitocida, a PQ é recomendada em áreas endêmicas para bloquear a transmissão da malária pelo *P. falciparum* (WHO, 2010b).

A PQ é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal e concentra-se no fígado, cérebro, coração, pulmões e musculatura esquelética. Possui um volume médio de distribuição de 3L/Kg, um pico plasmático de aproximadamente 70mg/mL (após 1-3h da administração) e é rapidamente excretada na urina, porém permanece circulante por cerca de 4-9h (Baird & Hoffman, 2004). As enzimas microssomais hepáticas do citocromo P450 (CYP 1A2, 2B6, 2D6 e 2E1) são as principais responsáveis pela metabolização da PQ (Li *et al.*, 2003). O mecanismo de ação ainda é pouco estabelecido, mas acredita-se que possa atuar interferindo na cadeia transportadora de elétrons, na geração de radicais livres tóxicos ao parasito e na inibição da formação de hemozoína, um mecanismo essencial para a sobrevivência do parasito (Vale *et al.*, 2009).

A PQ é extremamente tóxica na dose utilizada, causando efeitos colaterais graves como desconforto gastrointestinal e, principalmente, anemia hemolítica em indivíduos deficientes da enzima glicose 6-fosfato-desidrogenase (G6PD) (Hill *et al.*, 2006; Carmona-Fonseca, *et al.*, 2009; Baird & Surjadjaja, 2011). Em estudo recente, realizado na Tanzânia, a anemia hemolítica relatada pelo uso de PQ foi assinalada em indivíduos que não apresentam a deficiência da enzima G6PD (Shekalaghe *et al.*, 2010). Essa enzima desempenha um papel crucial no sistema de defesa antioxidante dos eritrócitos, sendo necessária para a redução do

NADP a NADPH, que, por sua vez, é necessária para a manutenção da glutatona na forma reduzida (GSH). A GSH neutraliza o estresse oxidativo que leva a danos celulares; a ausência de G6PD aumenta a sensibilidade do eritrócito aos agentes oxidantes (Shiraki *et al.*, 2011). Bolchoz *et al.* (2001; 2002), sugeriram que são os metabólitos da PQ os responsáveis pela toxicidade do fármaco.

Baseados em todos os problemas acima relatados, diversos fármacos foram desenvolvidos com base na estrutura química da PQ, na tentativa de substituí-la. A introdução de grupos substituintes no anel quinolinóico e modificações no grupo primário amino terminal tem sido o principal alvo das pesquisas que buscam novos antimaláricos. Dentre os diversos análogos/derivados de PQ sintetizados com esta abordagem, alguns já se encontram em testes clínicos; como a tafenoquina e ebulaquina (**Figura 1**) (Vale *et al.*, 2009).

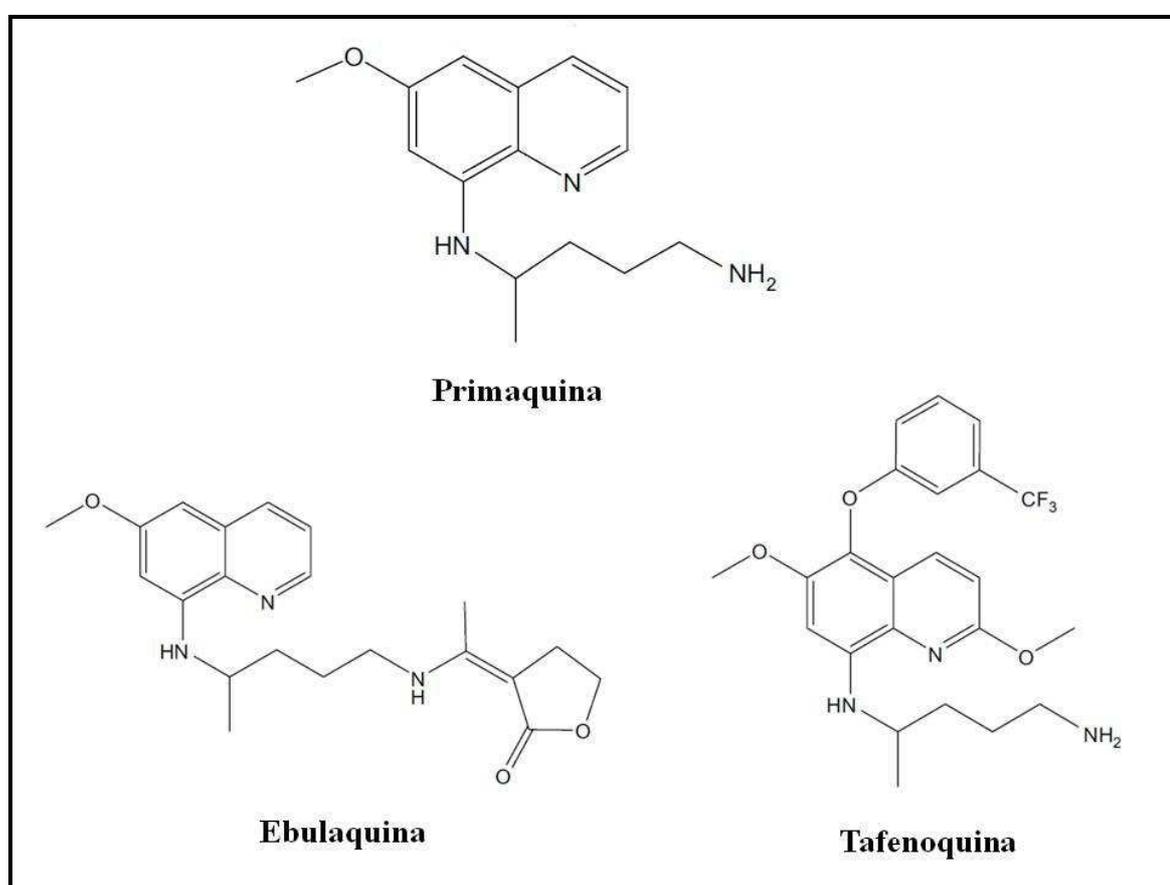


Figura 1- Estrutura química da primaquina, tafenoquina e ebulaquina.

A tafenoquina (GlaxoSmithKline[®]) atua contra todas as formas evolutivas dos parasitos que causam a malária humana (Walsh *et al.*, 2004) e se encontra em testes clínicos de fase III, sendo utilizada, inclusive, na prevenção das recaídas tardias causadas pelo *P. vivax*. Apesar de apresentar meia-vida longa e bom perfil farmacocinético, a tafenoquina,

assim como a PQ, desencadeia hemólise em pacientes deficientes na enzima G6PD (Walsh *et al.*, 1999).

A ebulaquina foi desenvolvida pelo Instituto Central de Pesquisas de Fármacos da Índia e é considerada a molécula mais promissora (Mazier *et al.*, 2009). Em estudos de toxicidade, esse fármaco mostrou-se aproximadamente quatro vezes menos tóxico do que a PQ quando testado em cães (Puri *et al.*, 1989). Os níveis de metahemoglobina em voluntários humanos tratados com sete doses de 25mg/Kg do composto não foram alterados, ao contrário de PQ, que na dose de 15mg/Kg alterou tais níveis. Apesar da ebulaquina ser metabolizada à PQ após administração oral, ela parece ser melhor tolerada por indivíduos deficientes da enzima G6PD. Outra questão que merece destaque é o fato desse composto ter se mostrado mais ativo que PQ contra as recaídas tardias do *P. vivax* (Valecha *et al.*, 2001), além de apresentar uma elevada atividade contra gametócitos de *P. cynomolgi* (Puri & Dutta, 2005).

1.7 Modelos para testes de antimaláricos

Durante a Primeira e Segunda Guerras Mundiais, um grande número de compostos sintéticos com potencial atividade antimalárica foi testado por cientistas dos exércitos americano e britânico, em aves como canários, pardais e galinhas domésticas infectadas pelos *P. cathemerium*, *P. relictum* e *P. gallinaceum*, respectivamente. Utilizando esses modelos de malária aviária, diversos compostos, como a plasmocina (precursor da PQ), demonstraram ser capazes de reduzir a parasitemia sanguínea das aves tratadas. Posteriormente, com a confirmação da atividade antimalárica nesses modelos de experimentação, os compostos mais promissores foram testados em soldados voluntários tratados com estes compostos e expostos à transmissão experimental, através da picada de mosquitos infectados com *P. falciparum* e *P. vivax*. Nestes experimentos observou-se que a plasmocina foi capaz de curar as recaídas tardias causadas pelo *P. vivax*, mas induziu efeitos colaterais graves. Dessa forma, foram realizadas modificações químicas na estrutura da plasmocina e uma série de 8-aminoquinolinas foram sintetizadas; dentre elas, a PQ (Sweeney, 2000).

A identificação de parasitos causadores de malária em roedores por Vincke & Lips (1948) e, posteriormente a descrição do método supressivo de Peters para testar esquizotomicidas sanguíneos (Peters, 1965), levou a adoção desse modelo experimental como padrão para busca de antimaláricos, já que os plasmódios que infectam aves diferem em muitos aspectos daqueles que parasitam mamíferos (Mazier *et al.*, 2009).

O desenvolvimento do cultivo contínuo de formas sanguíneas do *P. falciparum* (Trager & Jensen, 1976) impulsionou o desenvolvimento de ensaios *in vitro* para triagem de compostos com atividade antiplasmodial utilizando radioisótopos (Desjardins *et al.*, 1979). Mais recentemente, anticorpos monoclonais direcionados contra proteínas e enzimas específicas do parasito, como a HRPII (*Histidine-Rich Protein II*) (Noedl *et al.*, 2002) e a lactato desidrogenase (LDH) (Druilhe *et al.*, 2001), respectivamente, permitem avaliar a sobrevivência do parasito após exposição aos fármacos. Uma revisão de técnicas empregadas para testes de antimaláricos foi recentemente publicada (Krettli *et al.*, 2009a) e descreve as peculiaridades de cada modelo.

Por muitos anos a pesquisa por novos antimaláricos se concentrou em compostos capazes de destruir as formas assexuadas do parasito, causadoras dos sintomas da malária. No entanto, nos últimos anos pesquisas por fármacos ativos contra as FEE da doença, incluindo os hipnozoítos latentes do fígado, aumentaram substancialmente, apesar de ainda serem limitadas (Mazier *et al.*, 2009). Fármacos capazes de eliminar as formas hepáticas da malária devem ser definidos como principais alvos de pesquisa em antimaláricos; esses podem atrasar o desenvolvimento de resistência do parasito, uma vez que na fase exo-eritrocítica poucos parasitos estão envolvidos (Derbyshire *et al.*, 2011). Por outro lado, os recentes apelos para a eliminação da malária no mundo, apontam a necessidade de fármacos capazes de atuar contra todas as formas do *Plasmodium*, principalmente nos hipnozoítos (*The malERA Consultative Group on Drugs*, 2011).

A busca por novos hipnozoiticidas, substitutos da PQ, é dificultada pela ausência de testes *in vitro* que reproduzam hipnozoítos (Mueller *et al.*, 2009). Os modelos para testes de hipnozoiticidas são extremamente complexos e caros, requerem esporozoítos retirados de glândulas salivares de mosquitos, o que os tornam inviáveis no Brasil diante da ausência de mosquitos anofelinos suscetíveis à infecção pelo *Plasmodium* e capazes de serem mantidos em laboratório (Carvalho *et al.*, 1992).

O modelo mais amplamente empregado para testes de fármacos com atividade de cura radical (*i.e.* completa eliminação do parasito), utiliza macacos *Rhesus* infectados com esporozoítos de *P. cynomolgi* (Schmidt *et al.*, 1982), que induz infecções semelhantes as do *P. vivax* em humanos, incluindo as recaídas tardias (Mazier *et al.*, 2009).

Recentemente, FEE de crescimento lento foram observadas, *in vitro*, 11 dias após infecção de células hepáticas primárias de *Macaca fascicularis* com esporozoítos de *P. cynomolgi* (Dembele *et al.*, 2011). Outro modelo *in vitro* demonstrou a presença de pequenas formas parasitárias, que foram sugeridas como sendo hipnozoítos, em um hepatoma humano

infectado com esporozoítos de *P. vivax* (Chattopadhyay *et al.*, 2010). Estes dois trabalhos representam um importante passo visando o estabelecimento de um modelo *in vitro* que reproduza hipnozoítos e que possa ser empregado para testes de novos fármacos; no entanto, ambos necessitam serem melhor esclarecidos e validados (Derbyshire *et al.*, 2011).

Um modelo mais prático para triagem de anti-hiponozoiticidas foi descrito na malária aviária por *P. gallinaceum*, quando Gwadz *et al.* (1983) sugeriram que os gametócitos circulantes no hospedeiro vertebrado, os quais somente evoluem no mosquito vetor, e os hipnozoítos latentes no fígado, poderiam apresentar sensibilidade semelhante aos fármacos. Assim, propuseram um protocolo experimental ao demonstrarem que a PQ afeta irreversivelmente a infectividade de gametócitos no sangue das aves impedindo seu posterior desenvolvimento no mosquito *Aedes aegypti*. Além da PQ, outros esquizotomicidas teciduais inibiram o ciclo esporogônico do parasito em mosquitos alimentados em aves previamente infectadas e tratadas com tais compostos (Gwadz *et al.*, 1983). Mais tarde, o protocolo proposto por Gwadz *et al.* (1983) foi revisto e modificado por Carvalho *et al.* (1992), utilizando *A. fluviatilis*, um mosquito altamente suscetível ao *P. gallinaceum* (Tasón de Camargo & Krettli, 1978). Apesar do *A. fluviatilis* ser extremamente antropofílico, mosquitos mantidos em jejum por 2 a 24h se alimentam em aves e reproduzem excelentes infecções. Curiosamente, as autoras observaram que o nível de parasitemia é crucial para se obter boas infecções; parasitemias em ascensão e menores que 6% foram ideais para a reprodução do protocolo (Carvalho *et al.*, 1992). Na ausência de modelos experimentais *in vitro* e as dificuldade de se manter primatas superiores suscetíveis, este modelo parece uma boa alternativa na identificação de possíveis compostos capazes de evitar as recaídas tardias da malária.

2 JUSTIFICATIVA

A malária, considerada a maior responsável pelos danos econômicos e sociais das sociedades mais acometidas pela doença (Sachs & Malaney, 2002) afeta, sobretudo os países mais pobres do mundo. O controle da malária depende essencialmente do tratamento medicamentoso dos pacientes sintomáticos na fase aguda da doença. Um dos maiores obstáculos atuais é a resistência do *P. falciparum* à maioria dos antimaláricos disponíveis (Baird, 2004), agora também um problema do *P. vivax*, parasito mais prevalente no Brasil (Brasil, 2010b). A elevada toxicidade da PQ, único fármaco disponível para tratar as recaídas tardias da malária pelo *P. vivax* é um fator complicador adicional ao seu controle (Mueller *et al.*, 2009). O aparecimento constante de cepas resistentes às mais diversas classes de antimaláricos, demanda novos fármacos para seu melhor controle, como estratégia capaz de retardar o surgimento da resistência (Burrows *et al.*, 2011). No caso do *P. vivax*, é necessário associar ao tratamento feito com cloroquina, a PQ, capaz de curar a doença, eliminando os hipnozoítos (WHO, 2009). Diante da ampla distribuição do *P. vivax* no mundo e das restrições do uso da PQ, devido aos seus graves efeitos colaterais, a descoberta de novos hipnozoiticidas é urgente (Greenwood *et al.*, 2008; Mazier *et al.*, 2009).

Descobrir e desenvolver novos fármacos, ativos contra todas as formas do parasito, incluindo os gametócitos e hipnozoítos, além de aumentar as opções de antimaláricos disponíveis, irá reduzir o atual dilema das agências encarregadas do controle da malária, sem muitas alternativas terapêuticas e solucionar os problemas advindos do desenvolvimento de resistência e toxicidade de fármacos como a PQ (Ridley, 2002).

Diante dos problemas encontrados para o controle da malária e com base na experiência do nosso grupo em estudar a atividade antimalárica de novos fármacos (Krettli, 2009) propomos, nesse trabalho, pesquisar a atividade antimalárica de moléculas sintéticas derivadas de PQ, em especial, as tiazolidinonas. Utilizaremos protocolos e modelos experimentais para testar sua atividade esquizonticida sanguínea e anti-gametócitos, visando encontrar novos protótipos de fármacos para o tratamento da malária humana pelo *P. vivax*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimalárica de diferentes moléculas tiazolidinonas, derivadas da primaquina, sintetizadas e caracterizadas por químicos colaboradores.

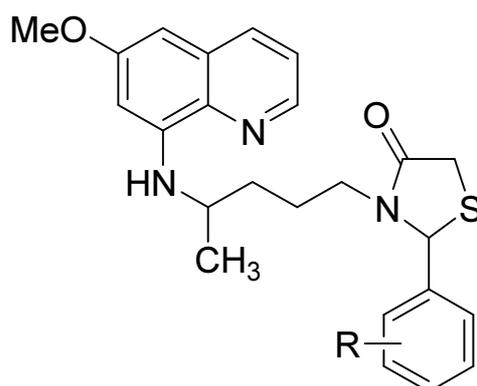
3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade esquizotocida das tiazolidinonas contra *P. falciparum in vitro* e contra o *P. berghei* em camundongos;
- Avaliar a citotoxicidade das tiazolidinonas *in vitro* em células de mamíferos;
- Pesquisar a atividade gametocitocida, medida pela capacidade anti-esporogônica das tiazolidinonas utilizando o *P. gallinaceum* em mosquitos *Aedes fluviatilis*, como um modelo substituto da busca de novas substâncias anti-hipnozoítos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das tiazolidinonas derivadas de primaquina (PQ)

As tiazolidinonas derivadas de PQ (**Figura 2**) foram sintetizadas e enviadas para os ensaios quimioterápicos pelo colaborador químico Dr. Wilson Cunico, do Instituto de Química e Geociências da Universidade Federal de Pelotas – UFPel. Esses compostos são heterociclos sintetizados a partir de reações químicas entre a PQ e arenaldeídos. As estratégias de síntese desses compostos, bem como o rendimento das reações foram recentemente reportadas por (Neuenfeldt *et al.*, 2011). em colaboração com o nosso grupo de pesquisas.



Composto	R	Composto	R
B42A/5l	3-OMe	N85A/5k	2-OMe
B46A/5e	2-Cl	N86A/5d	4-F
N14A/5c	3-F	N87B/5b	2-F
N17A/5m	4-OMe	P89A/5f	3-Cl
N25B/5h	2-NO ₂	P91A/5p	4-CN
N26A/5j	4-NO ₂	P92A/5q	4-CH ₃
N78A/5o	3-CN	P97B/5g	4-Cl
N79A/5i	3-NO ₂		

Figura 2- Estrutura química das tiazolidinonas derivadas de primaquina.

4.2 Solubilização dos compostos para testes de atividade biológica

Para a realização dos testes antimaláricos *in vitro*, os compostos foram solubilizados de acordo com as especificações e informações fornecidas pelo colaborador químico. Para o preparo da solução estoque foi utilizado o solvente dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na concentração final de até 0,5% para testes *in vitro* e 5% para testes *in vivo*. Todas as soluções foram preparadas no dia da realização dos experimentos.

4.3 Atividade esquizotóxica sanguínea *in vitro* contra o *P. falciparum*

4.3.1 Cultivo contínuo das formas sanguíneas do parasito

Nos ensaios de atividade antimalárica foram utilizadas formas sanguíneas de um clone de *P. falciparum* cloroquina-resistente (W2) (Oduola *et al.*, 1988). Os parasitos foram cultivados em hemácias humanas sob condições estabelecidas por Trager & Jensen (1976), com pequenas modificações, utilizando um protocolo previamente padronizado no Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) (de Andrade-Neto *et al.*, 2004). Os parasitos foram cultivados em placas de Petri (Corning, Santa Clara, CA, EUA) com hematócrito a 2%, diluídos em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 25mM de HEPES (Sigma-Aldrich), 21mM de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich), 11mM de glicose (Sigma-Aldrich), 40µg/mL de gentamicina (Schering-Plough, Kenilworth, New Jersey, EUA) e 10% (v/v) de plasma humano A⁺ inativado a 56°C por 30min. As placas foram mantidas em dessecadores a 37°C com uma vela ou em mistura gasogênica contendo 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂. Diariamente, foram realizadas trocas do meio de cultura e a parasitemia monitorada em esfregaços sanguíneos, fixados com metanol, corados com Giemsa e visualizados em microscópio óptico com objetiva de imersão (1.000x).

4.3.2 Sincronização do parasito para utilização nos testes *in vitro*

Os cultivos com predomínio de anéis utilizados nos ensaios de quimioterapia foram obtidos através de sincronização com sorbitol conforme descrito na literatura (Lambros & Vanderberg, 1979). Resumidamente, o meio de cultura foi retirado da placa de Petri e 10mL 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 de centrífuga de fundo cônico de 15mL (tipo Falcon) e incubado à 37°C por 10min. Após esse período o material foi centrifugado por 5min, 70g à temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspenso com meio RPMI suplementado com soro humano A⁺ inativado, ajustando-se o hematócrito para 5%. Essa suspensão foi novamente transferida para uma placa de Petri, e deixada em repouso a 37°C por aproximadamente 10min para que as hemácias sedimentassem. Posteriormente, foi realizado um esfregaço sanguíneo para determinação da

parasitemia. O hematócrito e a parasitemia, pré-determinados para cada teste, foram ajustados com a adição de hemácias e meio RPMI completo em quantidades adequadas.

4.3.3 Preparo das placas para os ensaios de quimioterapia

Culturas de parasitos sincronizadas com predomínio de anéis de *P. falciparum* foram distribuídas em microplacas de 96 poços (Corning, Santa Clara, CA, EUA) adicionando-se 180µL/poço de meio de cultura RPMI contendo: (i) 1% de parasitemia e 1% de hematócrito para o teste de incorporação de hipoxantina tritiada, ou (ii) 0,05% de parasitemia e 1,5% de hematócrito para o teste de ELISA anti-HRP2. Anteriormente a adição da suspensão dos parasitos, 20µL dos compostos a serem testados foram adicionados a placa teste, em triplicatas, e em diferentes diluições seriadas (400-0.625ng/mL). Os poços controles (seis por teste) continham hemácias normais não infectadas (controle negativo), ou hemácias infectadas sem adição dos compostos-testes (controle positivo). O antimalárico padrão cloroquina foi testado em paralelo em todos os experimentos realizados, em diluições seriadas de 500 à 7,8ng/mL. Já os compostos-testes foram testados em diluições seriadas a partir da concentração de 25µg/mL, até atingir a concentração inibitória para 50% do crescimento dos parasitos (IC₅₀).

4.3.4 Teste de incorporação de hipoxantina tritiada

No teste de incorporação de hipoxantina, os parasitos foram previamente cultivados em meio isento de hipoxantina por pelo menos 72h, posteriormente sincronizados e utilizados como descrito acima (item 4.3.2). Após o preparo das microplacas com os compostos teste e controles (item 4.3.3), a mistura dos parasitos com os compostos teste e controles foi incubada por 24h à 37°C em dessecador. Após esse período, a cada poço foram adicionados 20µL de solução de [³H]-hipoxantina à 5µCi (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA), e as placas incubadas por mais 18h à 37°C (Desjardins *et al.*, 1979). Após este segundo período de incubação, as microplacas foram mantidas à -20°C (por 6 a 10h) para promover a lise das hemácias. As amostras foram então aspiradas pelo coletor de células “Harvester 96 Mach III” (TomTec Imaging Systems GmbH, Unterschleissheim, Germany), em papéis de filtro (Perkin Elmer), secas em microondas por 3min em potência média e acondicionadas em embalagem plástica apropriada, na qual foram adicionados 4mL de líquido de cintilação (ABGold, Perkin Elmer). A concentração de hipoxantina tritiada incorporada aos parasitos foi avaliada através

da leitura da radioatividade incorporada, sendo a mesma realizada no equipamento Microbeta 1450 (Perkin Elmer). A medida de incorporação de [³H]-hipoxantina foi realizada em contagem por minuto, sendo proporcional à viabilidade do parasito. Os resultados foram comparados com os controles positivos, considerando-se que nestes últimos a viabilidade foi igual a 100%.

4.3.5 Teste imunoenzimático anti-HRP II

No ensaio imunoenzimático anti-HRP II (Noedl *et al.*, 2002) duas placas de 96 poços foram preparadas para cada experimento, sendo uma placa-teste, contendo os parasitos e os compostos a serem testados (item 4.3.3), e outra pré-sensibilizada com o anticorpo monoclonal anti-HRP II. Inicialmente, as placas-testes foram incubadas por 24h à 37°C, e o conteúdo de seis poços (controle positivo) foi retirado e congelado à -20°C para ser utilizado posteriormente como *background*. Essas foram novamente incubadas por 48h nas condições ideais para o crescimento do parasito. Após 72h totais de incubação, as placas foram congeladas e descongeladas duas vezes para que houvesse a lise das hemácias. Para a sensibilização das placas no teste anti-HRP II, 100µL do anticorpo primário (MPFM-55A ICLLAB®, EUA) a 1,0µg/mL foram adicionados a cada poço da placa de ensaio (Maxysorp, Nunc, Denmark). Após incubação por 12 a 16h a 4°C, o conteúdo dos poços foi descartado e 200µL/poço de uma solução de bloqueio (PBS-BSA 2%) adicionada, sendo a placa mantida à temperatura ambiente por 2h. Após esse tempo, o conteúdo dos poços foi novamente descartado e a placa lavada três vezes com PBS-Tween 20 a 0,05% (PBS-T). A cada poço da placa foram adicionados 100µL das amostras da cultura de *P. falciparum* hemolisadas. Em seis poços da placa foram adicionados 100µL dos controles congelados nas primeiras 24h (*background*). A placa foi então incubada por 1h à temperatura ambiente, em câmara úmida, em seguida foi lavada três vezes com PBS-T, adicionando-se a cada poço 100µL do anticorpo secundário (MPFG55P ICLLAB®, EUA) diluído a 1:5.000. Após incubação à temperatura ambiente por 1h, em câmara úmida, a placa foi lavada três vezes com PBS-T e 100µL de uma solução de 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) acrescentados a cada poço. A placa foi incubada por 5 a 10min à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, e a reação interrompida adicionando-se 50µL/poço de uma solução de ácido sulfúrico 1M. A leitura das absorvâncias foi realizada à 450nm em um espectrofotômetro de microplacas (leitor de ELISA) (Spectra Max 340PC³⁸⁴, Molecular Devices).

4.3.6 Determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento do parasito (IC₅₀)

A inibição do crescimento de 50% dos parasitos foi determinada através de curvas dose-resposta, em função de regressão não linear, para isso foi utilizado o programa Origin[®] Versão 8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA), para determinar o valor de IC₅₀.

4.4 Ensaio *in vitro* de citotoxicidade

4.4.1 Cultivo de linhagens celulares

As linhagens celulares, uma derivada de um hepatoma humano (HepG2) e outra de célula renais basais de macaco verde africano (BGM) foram cultivadas como recomendado por Calvo-Calle *et al.* (1994), sendo mantidas em garrafas de cultura de 75cm² (Corning) suplementadas em RPMI1640 contendo 5% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 40mg/L de gentamicina (Schering-Plough). As células foram mantidas em estufa com 5% de CO₂, a 95% de umidade e a 37°C. O meio das garrafas foi substituído a cada dois dias. Após confluência de cerca de 80%, a cultura de células foi subdivida em outras garrafas, ou utilizada para realização de ensaios de citotoxicidade. Quando necessário, o congelamento das células foi realizado em ampolas de criopreservação com uma solução contendo 95% de SBF e 5% de DMSO.

4.4.2 Preparo de placas

Para o preparo das placas-testes, as células foram lavadas com meio sem SBF, acrescentadas de 1mL de tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco/Invitrogen) e incubadas a 37°C por 3min, para que as células descolassem da garrafa. Ao conteúdo resultante da tripsinização foram adicionados 9mL de meio completo, seguido por centrifugação a 80g por 5min na temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em meio completo contendo 5% de SBF. Após contagem das células em câmara de Neubauer, a suspensão foi ajustada para 5,0x10³/mL e 180μL da suspensão acrescentados a cada poço da microplaca. As células foram incubadas por 12 a 16h em estufa de CO₂ a 37°C para adesão aos poços da microplaca. Em seguida, 20μL de meio completo, contendo diferentes

concentrações dos compostos (1000 - 1 µg/mL), foram adicionados aos poços da microplaca. As placas foram incubadas por 24h à 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade.

4.4.3 Ensaio de citotoxicidade utilizando o MTT

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em triplicata, conforme descrito por (do Céu de Madureira *et al.*, 2002). Após o preparo das placas como descrito no item 4.4.2, 20µL de uma solução de Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma-Aldrich), na concentração de 5mg/mL foram adicionados aos poços da placa (Denizot & Lang, 1986). Após 3h de incubação com o MTT, o sobrenadante foi retirado e o corante presente nos fundos dos poços da placa diluído em uma solução de DMSO em um volume de 100µL/poço. As microplacas foram então lidas em um leitor de ELISA (Spectra Max340PC³⁸⁴, Molecular Devices), utilizando-se filtro de 570nm.

4.4.4 Índice de Seletividade

O índice de seletividade (IS) das amostras testadas foi obtido calculando-se a razão entre o valor de MDL₅₀ e o valor de IC₅₀. Para compostos inativos contra o *P. falciparum in vitro* não se calculou o índice de seletividade. Valores maiores que 10 foram considerados indicativos de ausência de toxicidade, enquanto compostos com valores abaixo de 10 foram consideradas tóxicas (Bézivin *et al.*, 2003)

4.5 Testes em camundongos inoculados com formas sanguíneas do *P. berghei*

4.5.1 Testes de esquizonticida sanguíneo em camundongos

Essa metodologia se baseia no teste supressivo descrito por (Peters, 1965), com algumas modificações. Camundongos fêmeas Swiss Webster (alimentados com água e ração para roedores Nuvilab[®] CR1 autoclavável, *ad libitum*), pesando 20 ± 2g, provenientes do biotério de produção do CPqRR, foram inoculados com hemácias infectadas com *P. berghei*, cepa NK65, originalmente recebida da Universidade de Nova Iorque (EUA) e mantida em camundongos por passagens sanguíneas semanais e congelada em nitrogênio líquido. A partir da porcentagem da parasitemia e do número total de hemácias foi padronizado o inóculo com

diluições adequadas do sangue parasitado diluído em solução de citrato de sódio 3,8% e meio RPMI completo com 5% de SBF. Cada camundongo foi inoculado com 10^5 hemácias parasitadas (0,2mL), via intraperitoneal (1º dia de experimento). Aproximadamente 24h após a inoculação os animais foram divididos, aleatoriamente, em grupos de seis camundongos por gaiola. Em cada experimento foram utilizados dois grupos controles: um não tratado, e um tratado com PQ, utilizando três a cinco animais por grupo. No 2º, 3º e 4º dias após a inoculação, os camundongos foram tratados por via oral com os compostos-testes na dose de 50mg/Kg e com o controle (PQ), em diferentes concentrações. A parasitemia foi avaliada nos 5º e 7º dias de experimento pela contagem dos parasitos em esfregaços sanguíneos em microscópio óptico (objetiva de imersão a 1.000x).

A atividade antimalárica foi determinada pela porcentagem de redução da parasitemia dos animais tratados em relação aos controles. Inibição de 30% do crescimento dos parasitos, quando o grupo controle foi comparado com o grupo teste, foi considerada como indicador de uma amostra ativa (Carvalho *et al.*, 1991).

4.5.2 Determinação da parasitemia

Para avaliação da parasitemia os esfregaços sanguíneos feitos com uma gota ($\sim 2\mu\text{L}$) de sangue da cauda dos camundongos foram secos ao ar, fixados com metanol e corados com solução recém diluída de Giemsa, na proporção de duas gotas para cada 1mL de água tamponada (pH 6,8). Após 10min, as lâminas foram lavadas em água corrente, secas ao ar e examinadas ao microscópio óptico com objetiva de imersão (1.000x). A parasitemia foi determinada através da contagem do número de hemácias infectadas. Nesse caso, a avaliação foi realizada pela estimativa do número total de hemácias visualizadas em cada campo microscópico, sendo quantificados os parasitos em 10 a 100 campo, conforme o nível de parasitemia. A parasitemia foi expressa em porcentagem de hemácias parasitadas.

4.6. Comitê de Ética para uso de animais

Os experimentos envolvendo o uso de animais de laboratório neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz (CEUA L-0046/08).

4.7 Avaliação do efeito das tiazolidinonas derivadas de PQ sobre o ciclo esporogônico do *P. gallinaceum* em mosquitos *Aedes fluviatilis*

4.7.1 Cepa do *P. gallinaceum*

A cepa do *P. gallinaceum* (8A), originalmente isolada por Brumpt (1935) vem sendo mantido no Laboratório de Malária do CPqRR, desde 1969 quando a cepa foi recebida do Instituto Oswaldo Cruz (Manguinhos, FIOCRUZ-RJ), sua manutenção é feita através de passagens sanguíneas semanais em seu hospedeiro natural, a galinha doméstica, utilizando inóculos cegos de hemácias parasitadas por via intramuscular. Essas passagens também foram feitas através da picada de mosquitos *A. fluviatilis* infectados, conforme protocolo estabelecido pelo nosso grupo há décadas (Tasón de Camargo & Krettli, 1978). A cepa também é mantida em nitrogênio líquido.

4.7.2 Aves

Foram utilizados pintos híbridos de corte (*Gallus gallus domesticus*) de uma até duas semanas de idade, obtidos após eclosão de ovos embrionados adquiridos comercialmente (Granja Rivelli Ltda.) e mantido em chocadeira térmica até o nascimento das aves no CPqRR. As aves de até três semanas foram mantidas em gaiolas metálicas, com aquecimento feito através de lâmpada elétrica de 60 Volts instalada na gaiola. Diariamente as gaiolas eram limpas e aos animais mantidos ração (Costura Ltda.) e água *ad libitum*

4.7.3 Mosquitos

Mosquitos *Aedes fluviatilis* altamente suscetível à infecção pelo *P. gallinaceum* (Tasón de Camargo & Krettli, 1978) foram mantidos no insetário do Laboratório de Malária do CPqRR em uma ambiente climatizado, a uma temperatura média de 27°C, umidade relativa do ar média de 80%, fotoperíodo de 12h. As larvas de *A. fluviatilis* foram mantidas em bandejas com água desclorada e alimentadas com ração para peixes (Goldfish Colour, Alcon). As pupas eram coletadas diariamente das bandejas e colocadas em copos de plásticos dentro de gaiolas onde emergiam os mosquitos adultos, sendo então alimentados com solução de sacarose a 10% (p/v). Para a manutenção da colônia, as fêmeas foram semanalmente alimentadas com sangue de camundongos Swiss Webster, previamente anestesiados com 5mg

de Thiopentax[®] (Cristália, São Paulo, SP, Brasil) (Tiopental sódico) por via intraperitoneal. Três dias após o repasto sanguíneo nos camundongos, um recipiente de plástico contendo água era colocado no interior das gaiolas para que as fêmeas realizassem a postura dos ovos. Após 48h, os recipientes eram retirados das gaiolas e os ovos transferidos para bandejas plásticas com água.

4.7.4 Teste de atividade gametocitocida das tiazolidinonas derivadas de PQ

Este teste se baseia na atividade gametocitocida de esquizotocidas teciduais, como a PQ, que quando administradas ao hospedeiro vertebrado a ser usado no repasto sanguíneo, inibem totalmente o ciclo esporogônico da malária no mosquito vetor, conforme modelo proposto por Gwadz *et al.* (1983), modificado por (Carvalho *et al.*, 1992).

Gallus gallus domesticus de uma a duas semanas de idade, foram infectadas com $1,0 \times 10^6$ hemácias parasitadas pelo *P. gallinaceum*, pela via intramuscular, em um volume de 0,2mL. Quatro dias após inoculação, a parasitemia foi monitorada diariamente em esfregaços sanguíneos corados pelo Giemsa. Na fase de ascensão de parasitemia (2-9%), as aves foram utilizadas para alimentar mosquitos *A. fluviatilis* adultos com idade entre três e sete dias. Cerca de 12 - 24 horas antes do repasto sanguíneo, a solução de açúcar foi retirada da gaiola. No dia do experimento, as aves foram divididas em grupos: (i) uma ave por composto-teste, (ii) uma ave controle não tratada, (iii) uma ave tratada com primaquina. Alguns experimentos foram realizados apenas com aves tratadas com os compostos testes, considerando que o tempo 0h é o controle sem tratamento.

Os compostos foram administrados às aves, por via oral, em dose única de 15mg/Kg de peso para primaquina e 100mg/Kg das substâncias testadas. Fêmeas de *A. fluviatilis* (40 mosquitos/ave) foram colocadas para alimentar nas aves, um grupo imediatamente antes da administração dos compostos (tempo zero), outro grupo 6h após o tratamento. Após o repasto sanguíneo todas as fêmeas não alimentadas foram retiradas com auxílio de um capturador e desprezadas, as demais foram mantidas na mesma gaiola nas condições acima citadas (item 4.7.3). Sete dias após a infecção, os mosquitos foram dissecados (20 fêmeas/grupo) com o auxílio de estiletos metálicos sob microscópio estereoscópico (10 x) e seus estômagos removidos. Os estômagos foram corados com solução de mercurocromo 2% e examinados diretamente ao microscópio ótico (100 x) entre lâmina e lamínula. O número de oocistos foi determinado e a média por estômago calculado para cada grupo, nos dois diferentes intervalos de tempo (0h e 6h). A atividade do composto foi avaliada através da porcentagem de redução

do número de oocistos nos grupos de mosquitos alimentados nas aves tratadas, nos diferentes intervalos de tempo, em relação ao número de oocistos presentes nos mosquitos alimentados nessa mesma ave antes da administração do composto.

4.8 Análise Estatística

O Programa MicroCal Origin (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA) versão 8.0 foi usado para a determinação de curvas dose-resposta de viabilidade de *P. falciparum* para determinação do valor de IC₅₀. Para a comparação estatística do número de oocistos nos estômagos dos mosquitos alimentados em aves antes e após tratamento com os compostos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann Whitney empregando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Inc, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

As tiazolidinonas derivadas de PQ, em um total de 15, foram testadas quanto à sua atividade antiplasmodial empregando-se diferentes modelos de experimentação e, quanto à sua toxicidade em células de HepG2 (hepatoma humano) e BGM (célula renal de macaco). A atividade esquizonticida sanguínea foi avaliada *in vitro* contra o *P. falciparum* e contra o *P. berghei* em camundongos. A ação das novas tiazolidinonas derivadas de PQ foi ainda testada contra gametócitos, avaliando sua capacidade de inibir o desenvolvimento do ciclo esporogônico, medida através do número de oocistos do *P. gallinaceum* em mosquitos *Aedes fluviatilis* alimentados no vertebrado infectado e tratado com os compostos. Esse modelo foi anteriormente proposto por outros grupos do *National Institute of Health* - EUA, (Gawdz *et al.*, 1983) como sendo um indicador indireto da atividade anti-hipnozoítos, com base nas evidências de total inibição da formação de oocistos pela PQ, fármaco sabidamente hipnozoitocida usado para prevenir as recaídas tardias do *P. vivax*.

5.1 Atividade esquizonticida sanguínea de tiazolidinonas contra o *P. falciparum*

As amostras de tiazolidinonas foram inicialmente testadas em cultivos de formas sanguíneas do *P. falciparum*, clone W2 resistente à cloroquina, sendo a atividade esquizonticida *in vitro* avaliada por dois métodos: i) a incorporação de hipoxantina tritiada, base nitrogenada importante para síntese de DNA pelos parasitos viáveis; e, ii) o ensaio imunoenzimático com anticorpos monoclonais dirigidos contra uma proteína do parasito, rica em alanina e histidina (HRPII, do inglês, *histidine rich protein*). Presente na membrana das várias formas sanguíneas, essa proteína é indispensável à sobrevivência do parasito.

Os compostos foram testados em diluições seriadas a partir da concentração de 25µg/mL, sendo a cloroquina utilizada como controle. Cada teste foi repetido pelo menos duas vezes, feito em triplicata para cada concentração.

Tabela 1 - Avaliação da atividade de tiazolidinonas derivadas de PQ contra o *P. falciparum* (clone W2, cloroquina resistente), nos testes imunoenzimático anti-HRP-II e de hipoxantina, em experimentos independentes.

Composto	IC ₅₀ (µg/mL) em três experimentos (Média ± DP)							
	Anti-HRP-II			Média ± DP	Hipoxantina			Média ± DP
	1	2	3		1	2	3	
B42A	5,0	3,2	6,6	4,9 ± 1,7	3,5	6,7	12,8	7,7 ± 4,7
B46A	1,08	≤0,7	NT	0,89 ± 0,27	3,9	1,08	NT	2,5 ± 1,9
N14A	11,0	6,5	8,1	8,5 ± 2,3	12,2	17,0	12,8	13,8 ± 2,9
N17A	5,3	3,2	5,6	4,7 ± 1,3	12,0	12,0	13,0	12,3 ± 0,6
N25B	7,4	3,4	16,8	9,2 ± 6,9	18,3	18,0	26,0	20,7 ± 4,5
N26A	7,8	10,1	7,2	8,4 ± 1,5	9,6	9,3	16,3	12,0 ± 4,0
N78B	7,0	2,3	2,7	4,0 ± 2,6	5,04	11,2	7,5	7,9 ± 3,1
N79A	8,0	4,6	9,8	7,5 ± 2,6	12,0	13,0	NT	12,0 ± 0,7
N85A	6,1	1,5	1,5	3,0 ± 2,6	5,1	7,3	10,0	7,5 ± 2,5
N86A	7,0	10,2	NT	8,6 ± 2,3	9,6	10,8	14,0	11,5 ± 2,3
N87B	8,0	8,0	5,3	7,0 ± 1,5	14,0	13,0	13,0	13,3 ± 0,6
P89A	13,2	16,3	14,9	14,7 ± 1,6	18	12,2	21,0	17,0 ± 4,5
P91A	9,3	12,0	6,7	9,3 ± 2,6	6,6	10	12,3	9,6 ± 2,9
P92A	15,0	12,0	18,0	15,0 ± 3,0	16,0	28,0	12,0	18,6 ± 8,3
P97B	14,8	13,6	NT	14,2 ± 0,8	9,2	9,7	NT	9,45 ± 0,35
Cloroquina	0,01	0,012	0,01	0,01 ± 0,001	0,119	0,120	0,121	0,12 ± 0,001
Primaquina	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7 ± 0,0	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7 ± 0,0

* IC₅₀ < 10µg/mL = ativo; IC₅₀ ≥ 10 e < 20µg/mL = parcialmente ativo; IC₅₀ ≥ 20µg/mL = inativo.

Os valores de IC_{50} foram obtidos em cada experimento através de curva de dose-resposta utilizando-se o programa Origin[®] (versão 8.0). Foram calculadas a média e o desvio padrão dos valores dos IC_{50} nos diversos experimentos. Entre as 15 tiazolidinonas testadas, cinco (B42A, B46A, N78A, N85A e P91A) foram consideradas ativas ($IC_{50} < 10\mu\text{g/mL}$) nos métodos de anti-HRP II e hipoxantina; B46A foi a mais ativa (IC_{50} de $0,89\mu\text{g/mL}$ e $2,5\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Considerando apenas o teste de anti-HRP II, 12 compostos foram ativos (B42A, B46A, N14A, N17A, N25B, N26A, N78B, N79A, N85A, N86A, N87B e P91A); no de hipoxantina apenas, seis foram ativos (B42A, B46A, N78B, N85A, P91A e P97B), os dados encontram-se ilustrados na **Tabelas 1 e 2**.

Apenas uma tiazolidinona (N25B) foi inativa (IC_{50} médio de $20,7\mu\text{g/mL}$) no teste de hipoxantina, considerado padrão-ouro, tendo sido, no entanto ativa no teste anti-HRP II. Os demais compostos (P89A e P92A) foram parcialmente ativos ($IC_{50} > 10$ e $< 20\mu\text{g/mL}$) em ambos os testes. As tiazolidinonas N14A, N17A, N26A, N79A, N86A, N87B, embora tenham apresentando $IC_{50} < 10\mu\text{g/mL}$ no teste de anti-HRP II, foram consideradas parcialmente ativas, uma vez que no teste de hipoxantina o $IC_{50} > 10$ e $< 20\mu\text{g/mL}$.

A cloroquina foi sempre ativa em concentrações de 10 a 120 nanogramas. A PQ também foi ativa em ambos os métodos com $IC_{50} < 0,75\mu\text{g/mL}$.

Tabela 2 - Média e desvio padrão da atividade de derivados de PQ contra o *P. falciparum* (clone W2), nos ensaios imunoenzimático anti-HRP-II e de hipoxantina em experimentos independentes.

Composto	IC ₅₀ (µg/mL) média ± DP		Atividade *
	Anti-HRP-II	Hipoxantina	
B42A	4,9 ± 1,7	7,7 ± 4,7	Ativa
B46A	0,89 ± 0,27	2,5 ± 1,9	Ativa
N14A	8,5 ± 2,3	13,8 ± 2,9	Parcial
N17A	4,7 ± 1,3	12,3 ± 0,6	Parcial
N25B	9,2 ± 6,9	20,7 ± 4,5	Inativa
N26A	8,4 ± 1,5	12,0 ± 4,0	Parcial
N78B	4,0 ± 2,6	7,9 ± 3,1	Ativa
N79A	7,5 ± 2,6	12,0 ± 0,7	Parcial
N85A	3,0 ± 2,6	7,5 ± 2,5	Ativa
N86A	8,6 ± 2,3	11,5 ± 2,3	Parcial
N87B	7,0 ± 1,5	13,3 ± 0,6	Parcial
P89A	14,7 ± 1,6	17,0 ± 4,5	Parcial
P91A	9,3 ± 2,6	9,6 ± 2,9	Ativa
P92A	15,0 ± 3,0	18,6 ± 8,3	Parcial
P97B	14,2 ± 0,8	9,45 ± 0,35	Ativa
Cloroquina	0,01 ± 0,001	0,12 ± 0,001	Ativa
Primaquina	< 0,7 ± 0,0	< 0,7 ± 0,0	Ativa

* IC₅₀<10µg/mL = ativo; IC₅₀≥10 e < 20µg/mL= parcialmente ativo; IC₅₀≥20µg/mL= inativo, tomando como base o método de hipoxantina.

5.2 Atividade citotóxica das tiazolidinonas e índices de seletividade

Os resultados da atividade citotóxica das tiazolidinonas estão resumidos na **Tabela 3**, com a dose letal mínima para 50% das células (MDL₅₀) determinada em três experimentos independentes. Algumas tiazolidinonas tiveram baixa toxicidade, com MDL₅₀ > 1000µg/mL, a máxima concentração testada. Outras tiveram um MDL₅₀ entre 115 a 682µg/mL nas duas linhagens celulares, portanto, pouco tóxicas. A PQ demonstrou valores de MDL₅₀ iguais a 84 e 106µg/mL nas linhagens BGM e HepG2, respectivamente.

O cálculo entre as médias de citotoxicidade da atividade antimalárica dos compostos e dos controles, cloroquina e primaquina, permitiu se avaliar os índices terapêuticos ou de seletividade (IS). Foi utilizada a razão entre o MDL₅₀ em células de hepatoma humano (HepG2) e o IC₅₀ obtido na atividade anti-*P. falciparum in vitro* no teste de hipoxantina (padrão ouro). Os IS das tiazolidinonas variaram de 17 e 400, sendo maiores para B46A e N85A, com 400 e 133, respectivamente.

Tabela 3 - Avaliação da atividade citotóxica e índice de seletividade (IS) de tiazolidinonas derivadas de PQ, em células de hepatoma humano (HepG2) e células renais de macaco (BGM).

Composto	MDL ₅₀ (µg/mL) média ± DP		Índice de Seletividade MDL ₅₀ / IC ₅₀
	BGM	HepG2	
B42A	>1000	>1000	129
B46A	>1000	>1000	400
N14A	242 ± 98	572 ± 108	41
N17A	>1000	>1000	81
N25B	586 ± 65	682 ± 105	(composto inativo)
N26A	>1000	>1000	83
N78B	>1000	>1000	127
N79A	244 ± 98	250 ± 17	21
N85A	>1000	>1000	133
N86A	>1000	>1000	87
N87B	NT	NT	NT
P89A	115 ± 11	292 ± 31	17
P91A	>1000	>1000	104
P92A	>1000	>1000	54
P97B	>1000	>1000	106
Cloroquina	443 ± 80	330 ± 28	2750
Primaquina	84 ± 16	106 ± 5	141

5.3 Atividade esquizotóxica sanguínea supressiva de tiazolidinonas contra o *P. berghei* (cepa NK65) em camundongos

As tiazolidinonas recebidas em massa suficiente foram avaliadas como esquizotóxica sanguínea contra o *P. berghei* (cepa NK65) em camundongos, usando o teste supressivo de Peters (1965). Entre oito tiazolidinonas testadas três foram ativas (N14A, N25B, e P92A) causando redução igual ou maior que 30% na parasitemia dos animais em relação aos controles não tratados (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Atividade antimalárica de tiazolidinonas derivadas de PQ, testadas na dose de 50mg/Kg, por via oral, em três dias consecutivos, em camundongos com o *P. berghei*, cepa NK65.

Composto	Parasitemia (Redução)		Atividade*
	5º dia	7º dia	
N14A	1,2 (42%)	4,0 (40%)	Ativo
N17A	1,7 (20%)	4,8 (26%)	Inativo
N25B	0,9 (58%)	3,1 (54%)	Ativo
N26A	1,6 (27%)	7,2 (0%)	Inativo
P92A	1,4 (36%)	4,2 (36%)	Ativo
Primaquina ^a	0 (100%)	0 (100%)	Ativo
Controle não tratado	2,1	6,6	Controle

a = testada na dose de 25mg/Kg.

Critério de atividade: Reduções $\geq 30\%$ = ativo; $<30\%$ = inativo.

No segundo teste, os compostos ativos, testados de novo tiveram sua atividade confirmada. Entre os compostos N78B, N79A e P89A, testados pela primeira vez, apenas P89A foi ativo, reduzindo a parasitemia em mais de 40% (**Tabela 5**).

A PQ curou os camundongos na dose de 25mg/Kg em um experimento enquanto, na dose de 15mg/Kg reduziu a parasitemia, sem induzir cura da malária; todos os animais foram a óbito, como os controles não tratados (dados não mostrados).

Tabela 5 - Atividade antimalárica de tiazolidinonas derivadas de PQ, testadas na dose de 50mg/Kg, por via oral, em três dias consecutivos, em camundongos com o *P. berghei*, cepa NK65.

Composto	Parasitemia (Redução)		Atividade*
	5º dia	7º dia	
N14A	0,6 (73%)	5,2 (31%)	Ativo
N17A	2,7 (0%)	7,0 (7%)	Inativo
N25B	0,8 (63%)	5,6 (26%)	Ativo
N26A	2,8 (0%)	4,9 (35%)	Inativo
N78B	1,9 (10%)	6,7 (11%)	Inativo
N79A	2,7 (0%)	5,9 (21%)	Inativo
P89A	1,1 (47%)	4,4 (42%)	Ativo
P92A	0,7 (67%)	4,6 (38%)	Ativo
Primaquina ^b	0 (100%)	0 (100%)	Ativo
Controle não tratado	2,1	7,5	Controle

*Critério de atividade: Reduções $\geq 30\%$ = ativo; $<30\%$ = inativo.

b = testada na dose de 15mg/Kg

5.4 Atividade gametocitocida das tiazolidinonas medida pela inibição da formação de oocistos do *P. gallinaceum* em *Aedes fluviatilis*

A atividade gametocitocida dos novos compostos foi avaliada através da sua capacidade de inibir a produção de oocistos em mosquitos *A. fluviatilis*. Os compostos foram administrados ao hospedeiro vertebrado (pintinhos de até duas semanas) na fase aguda da infecção pelo *P. gallinaceum*, sendo os mosquitos alimentados na mesma ave por duas vezes consecutivas, antes (tempo zero) e após (6h) o tratamento. Uma semana depois do repasto sanguíneos todos os mosquitos foram dissecados sendo examinados os estômagos ao microscópio para contagem do número de oocistos. Os mosquitos alimentados no tempo zero (antes do tratamento) foram controles do grupo de 6h, para cálculo do índice de inibição da formação dos oocistos. Esse índice foi utilizado como indicador da possível atividade esquizontocida tecidual dos compostos, como proposto por Gwadz *et al.* (1983). O mesmo protocolo, utilizado posteriormente no nosso laboratório por Carvalho *et al.* (1992) com algumas modificações, confirmou a capacidade da PQ em inibir 100% a esporogonia, nas condições do experimento. Os resultados estão nas **Tabelas 6-11** e nas **Figuras 3-9**.

Observou-se reprodutibilidade do ciclo esporogônico nos dois tempos diferentes, nas aves controles, sendo o número de oocistos nos mosquitos *Aedes fluviatilis* alimentados na mesma ave infectada com *P. gallinaceum*, semelhante nos dois tempos. Calculada a porcentagem de mosquitos infectados nos dois tempos de repasto (**Tabela 6**), ela foi elevada nos tempos zero e 6h após (mediana de 90% e 85%). No entanto, em dois (Exp. 3 e 5) dos sete experimentos controles realizados observou-se diferença significativa na porcentagem de mosquitos infectados. No experimento 4, a porcentagem de mosquitos infectados reduziu de 90% para 60%, entre os dois tempos, porém o número de oocistos no segundo repasto sanguíneo foi ainda maior que no tempo zero, portanto, sem redução da esporogonia. A **Figura 3** mostra a dispersão do número de oocistos nos estômagos dissecados nesses vários experimentos.

Tabela 6 - Número de oocistos em estômagos de *A. fluviatilis* controles, alimentados duas vezes em aves infectadas com *P. gallinaceum*, controles não tratadas, utilizadas como fonte do repasto sanguíneo no tempo zero (0h) e seis horas após (6h).

Experimento	% mosquitos Infectados* (n = 20)		Oocistos/estômago Média ± DP		Inibição do n° de oocistos**
	0h	6h	0h	6h	
1	95%	85%	38 ± 31	29 ± 21	26%
2	100%	100%	114 ± 62	119 ± 69	0%
3	65%	95%	76 ± 23	56 ± 55	26% [#]
4	90%	60%	26 ± 17	65 ± 17	0%
5	100%	85%	128 ± 40	73 ± 34	43% [#]
6	90%	85%	11 ± 6	8 ± 10	36%
7	90%	90%	15 ± 6	25 ± 11	0%
Mediana	90%	85%	38	56	-

* Mosquitos dissecados uma semana após o repasto sanguíneo infectante. ** Calculada como porcentagem de redução do número de oocistos no T6h em relação ao T0h. # Diferença significativa entre o T0h e T6h calculada pelo Teste de Mann-Whitney, Exp. 3 (p = 0,018) e Exp. 5 (p = 0, 0002).

O tratamento das aves usadas no repasto infectante com veículo (DMSO 5% em meio RPMI) utilizado para diluir os compostos não inibiu a esporogonia do *P. gallinaceum*. A proporção de mosquitos infectados nos T0h e T6h foi de, respectivamente, 85% e 100% (Tabela 7). A PQ inibiu 100% da esporogonia em todos os testes, confirmando sua utilidade como controle do modelo, como demonstrado na literatura. Os dados estão ilustrados na Figura 4 e na Tabela 7.

Tabela 7 - Efeito inibitório de primaquina (PQ, 15mg/Kg), em quatro diferentes experimentos, na esporogonia do *P. gallinaceum* em mosquitos *A. fluviatilis* alimentados antes (0h) e 6h após o tratamento da ave infectada, por via oral; DMSO (veículo) não causou inibição da esporogonia.

Composto	% mosquitos infectados* (n = 20)		Oocistos/estômago Média ± DP		Inibição do nº de oocistos**	Atividade***
	0h	6h	0h	6h		
DMSO	85%	100%	79 ± 45	70 ± 62	11%	Inativo
PQ	85%	0%	41 ± 17	0 ± 0	100%	Ativo
PQ	65%	0%	4 ± 2	0 ± 0	100%	Ativo
PQ	90%	0%	117 ± 72	0 ± 0	100%	Ativo
PQ	100%	0%	14 ± 11	0 ± 0	100%	Ativo
Mediana (PQ)	87%	0%	28	0	100%	Ativo

* Mosquitos dissecados uma semana após o repasto sanguíneo infectante. ** Calculada como porcentagem de redução do número de oocistos no T6h em relação ao T0h. *** Critério usado: Ativo = redução \geq 85%; Parcial = entre 60 a 84% de redução; Inativo = redução $<$ 60%.

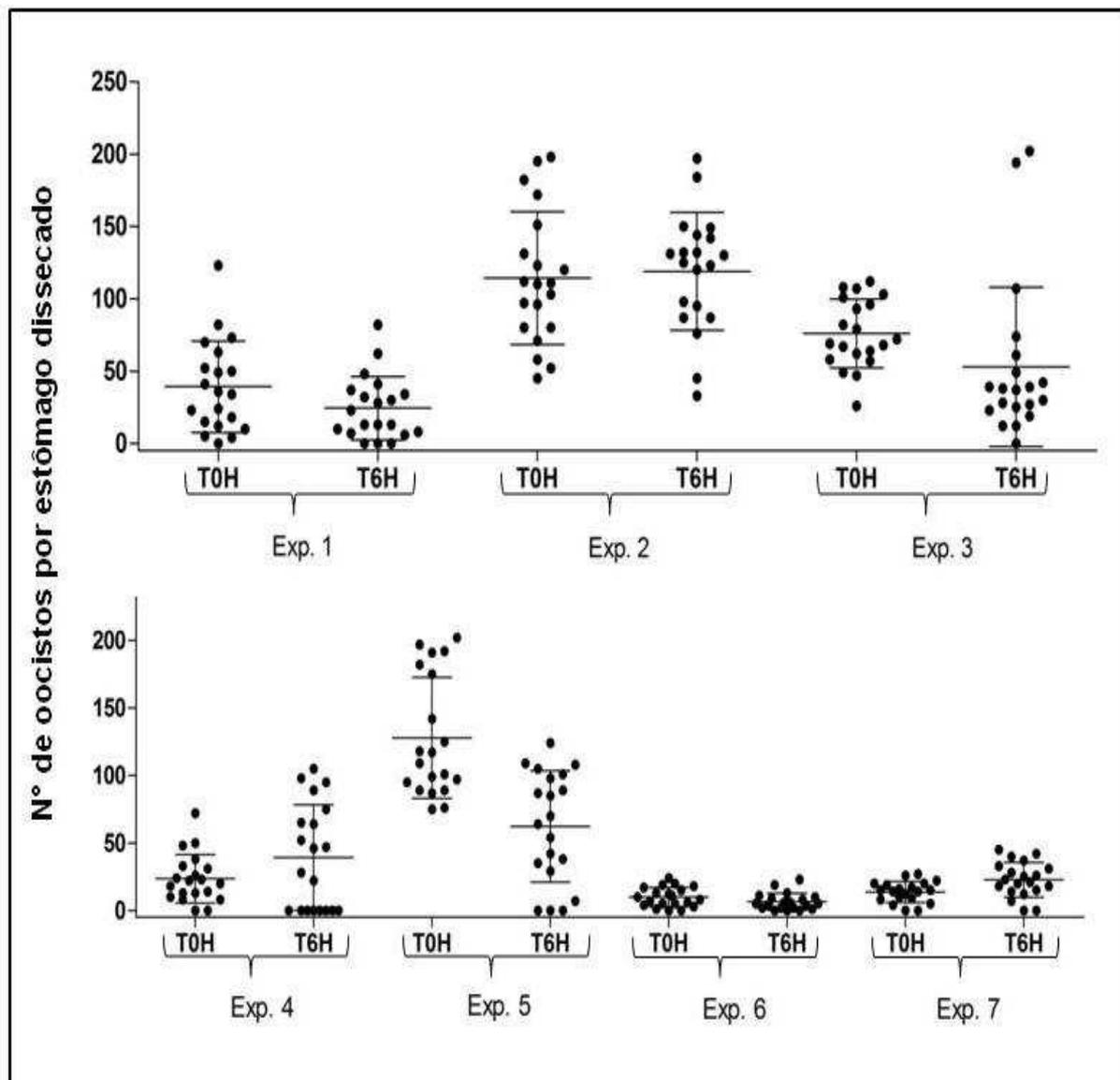


Figura 3 - Grupos controles, mostrando a dispersão do número de oocistos nos estômagos de *A. fluviatilis* dissecados no sétimo dias após repasto sanguíneo feito na mesma ave com *P. gallinaceum*, feitos no tempo zero (0h) e 6h depois. Teste estatístico de Mann-Whitney aplicado mostrou diferenças significantes apenas nos Exp. 3 ($p = 0,018$) Exp.5 ($p = 0,0002$).

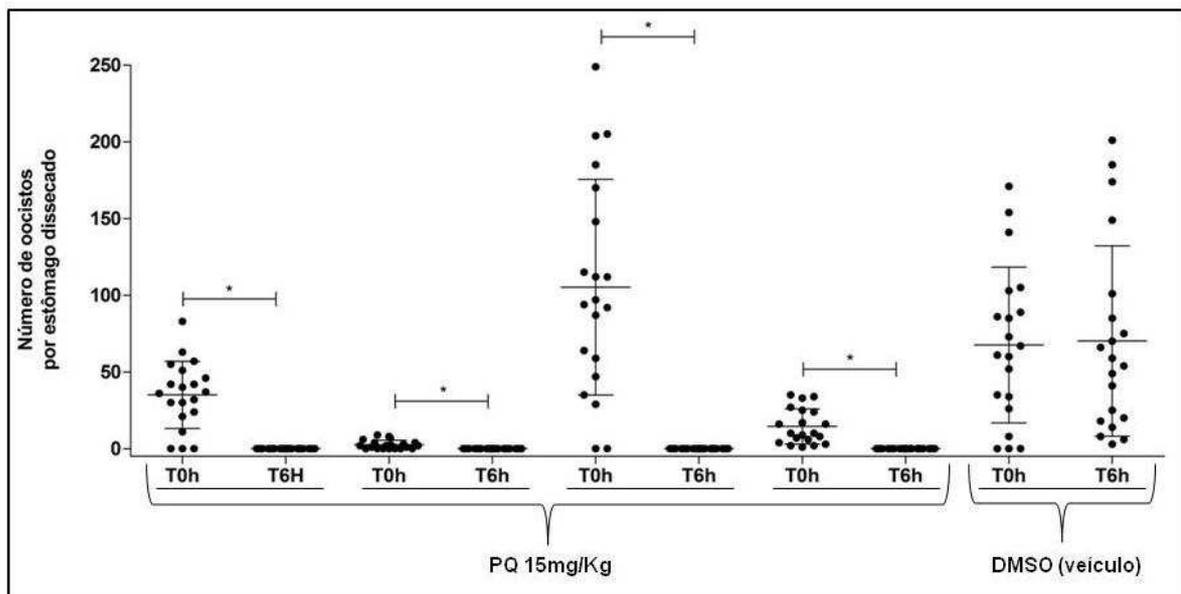


Figura 4 - Dispersão do número de oocistos nos estômagos de *A. fluviatilis* dissecados no sétimo dias após repasto sanguíneo em aves infectadas com *P. gallinaceum*, feito antes (0h) e 6h após tratamento com **PQ** (15mg/Kg) e **DMSO** (veículo) em dose única por via oral. * Grupos estatisticamente diferentes ($p = 0,0001$) pelo teste de Mann-Whitney.

Entre as 13 tiazolidinonas testadas, três (N14A, N17A e P91A) inibiram significativamente ($p < 0,05$) o número de oocistos, sendo consideradas ativas. Os dados dos diferentes experimentos são mostrados nas **Tabelas 8 a 11**. Alguns compostos foram testados uma vez, deles, cinco se mostraram inativos; P91A foi ativo e P97B parcialmente ativo (**Tabela 8**). Nos experimentos realizados com P91A e P97B, houve redução significativa ($p = 0,0001$) do número de oocistos no T6h em relação ao T0h (**Figura 5**); as porcentagens de mosquitos infectados de decaíram de 90-100% para 15% e 45%, respectivamente para P91A e P97B.

Tabela 8 - Efeito de tiazolidinonas derivadas de PQ, na esporogonia do *P. gallinaceum* em mosquitos *A. fluviatilis* alimentados antes (0h) ou 6h após tratamento da ave infectada, via oral, com os compostos em um único experimento realizado.

Composto (100mg/Kg)	% mosquitos infectados* (n = 20)		Oocistos/estômago Média ± DP		Inibição do n° de oocistos**	Atividade***
	0h	6h	0h	6h		
N26A	60%	75%	42 ± 38	38 ± 30	10%	Inativo
N78B	95%	95%	111 ± 72	83 ± 19	25%	Inativo
N79A	80%	70%	33 ± 26	34 ± 26	0%	Inativo
N86A	85%	80%	21 ± 4	26 ± 14	0%	Inativo
B81A	100%	95%	92 ± 13	91 ± 20	2%	Inativo
P91A	100%	15%	49 ± 5	4 ± 5	96%	Ativo
P97B	90%	45%	35 ± 15	2 ± 1	81%	Parcial

* Mosquitos dissecados uma semana após o repasto sanguíneo infectante. ** Calculada como porcentagem de redução do número de oocistos no T6h em relação ao T0h. ***Critério usado: Ativo = redução \geq 85%; Parcial = entre 60 a 84% de redução; Inativo = redução $<$ 60%.

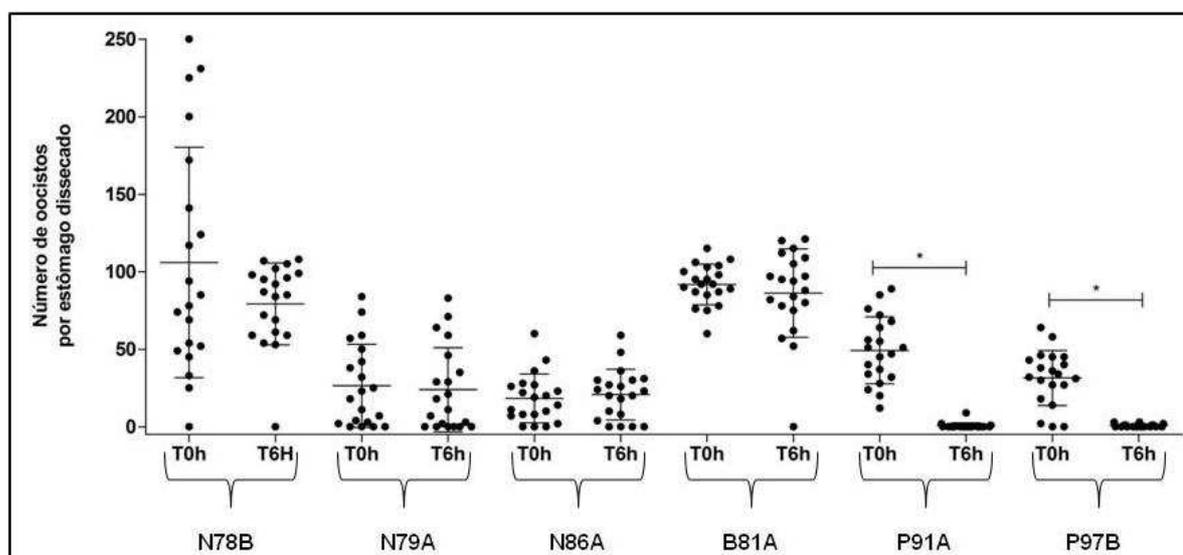


Figura 5 - Dispersão do número de oocistos nos estômagos de *A. fluviatilis* dissecados no sétimo dias após repasto sanguíneo em aves infectadas com *P. gallinaceum*, feito antes (0h) e 6h após tratamento com derivados de PQ em dose única de 100mg/Kg por via oral. *Grupos estatisticamente diferentes ($p = 0,0001$) pelo teste de Mann-Whitney.

Os compostos N25B, N87B, P89A e P92A, foram testados em dois ou mais experimentos (**Tabela 9**) sendo N87B parcialmente ativo, reduzindo em 63% e 81% o número de oocistos nas doses de 15 e 100mg/Kg, respectivamente. N25B foi inativo em um experimento (redução de 32%) e parcialmente ativo em outro (redução de 58%). P89A foi inativo; P92A inativo em dois experimentos foi parcialmente ativo em um. As discrepâncias foram atribuídas a baixa solubilidade dos compostos testados.

Tabela 9 - Efeito de tiazolidinonas derivadas de PQ, na esporogonia do *P. gallinaceum* em mosquitos *A. fluviatilis* alimentados antes (0h) e 6h após tratamento da ave infectada, via oral, com os compostos, em diferentes experimentos

Composto (100mg/Kg)	% mosquitos infectados* (n = 20)		Oocistos/estômago Média ± DP		Inibição do nº de oocistos**	Atividade***
	0h	6h	0h	6h		
N25B	80%	90%	44 ± 44	30 ± 22	32%	Inativo
N25B	80%	65%	18 ± 18	8 ± 7	58%	Parcial
N87B [#]	100%	85%	123 ± 23	45 ± 35	63%	Parcial
N87B	90%	80%	16 ± 10	3 ± 3	81%	Parcial
P89A	80%	30%	4 ± 2	2 ± 2	50%	Inativo
P89A	100%	95%	75 ± 16	60 ± 19	20%	Inativo
P92A	75%	65%	95 ± 74	25 ± 34	74%	Parcial
P92A	90%	65%	14 ± 7	7 ± 2	50%	Inativo
P92A	80%	75%	16 ± 11	13 ± 9	25%	Inativo

* Mosquitos dissecados uma semana após o repasto sanguíneo infectante. ** Calculada como porcentagem de redução do número de oocistos no T6h em relação ao T0h. ***Critério usado: Ativo = redução \geq 85%; Parcial = entre 60 a 84% de redução; Inativo = redução < 60%.
#Dose única de 15mg/Kg.

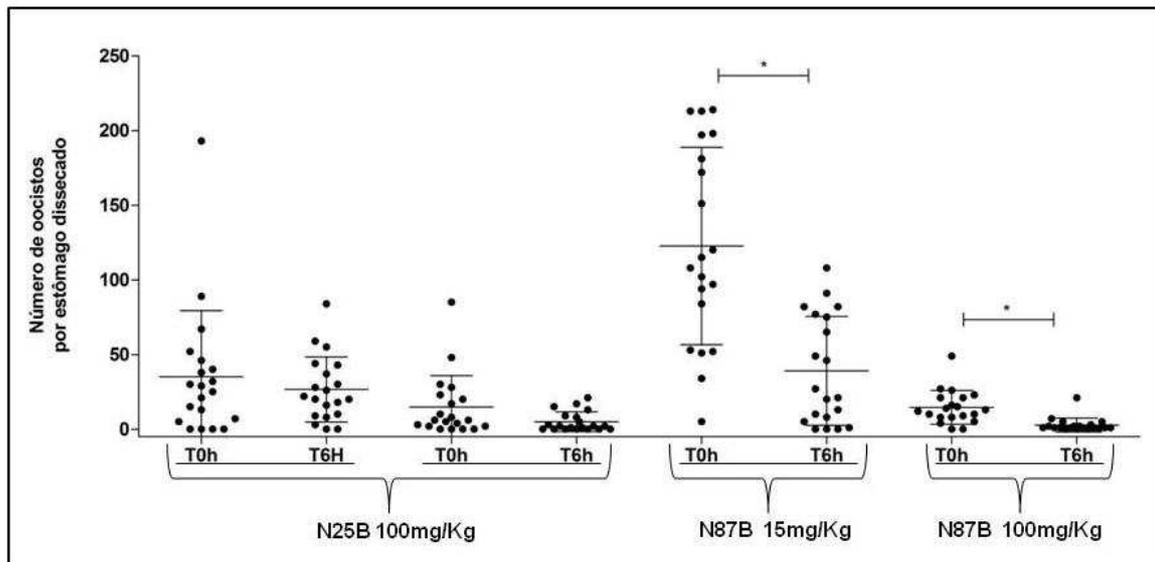


Figura 6 - Dispersão do número de oocistos nos estômagos de *A. fluviatilis* dissecados no sétimo dias após repasto sanguíneo em aves infectadas com *P. gallinaceum*, feito antes (0h) e 6h após tratamento com N25B e N87B em dose única por via oral. *Grupos estatisticamente diferentes ($p = 0,0001$) pelo teste de Mann-Whitney.

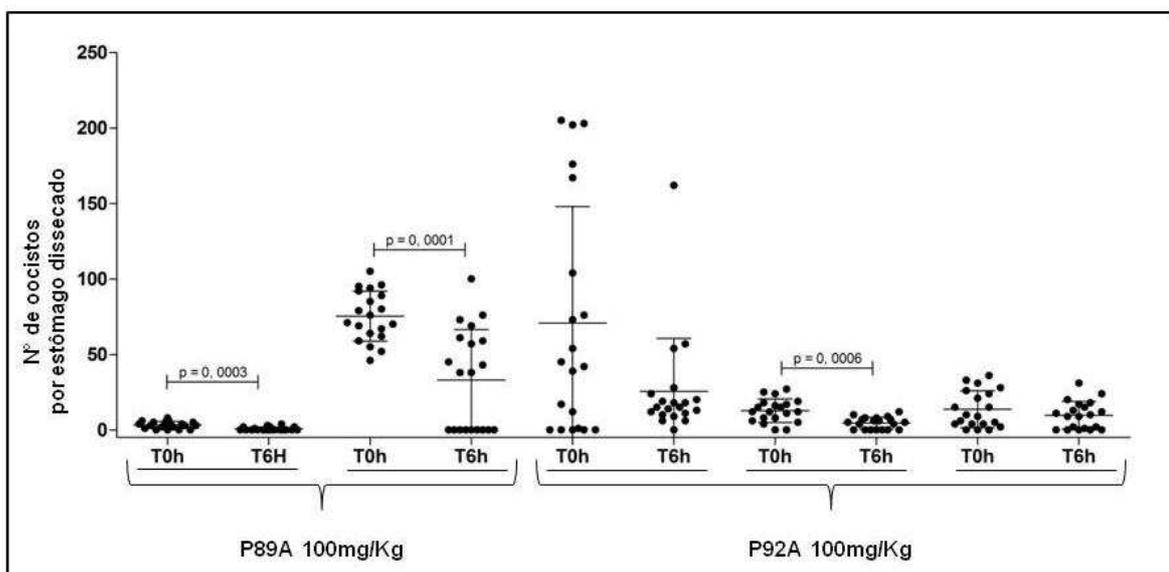


Figura 7 - Dispersão do número de oocistos nos estômagos de *A. fluviatilis* dissecados no sétimo dias após repasto sanguíneo em aves infectadas com *P. gallinaceum*, feito antes (0h) e 6h após tratamento com P89A e P92A em dose única por via oral; grupos estatisticamente diferentes pelo teste de Mann-Whitney.

Os compostos **N14A** e **N17A**, na dose de 100mg/Kg, inibiram a esporogonia do *P. gallinaceum* em *A. fluviatilis*, ocasionando reduções de 85 a 100% do número de oocistos em diferentes experimentos (**Tabelas 10 e 11**). Em outros experimentos os compostos foram ativos, sendo o número de oocistos encontrados nos controles e testes estatisticamente diferentes ($p = 0,0002$) (**Figuras 8 e 9**). Testado nas doses de 50 e 25mg/Kg **N17A** reduziu, respectivamente, 80% e 50% o número de oocistos, mas não alterou a proporção de mosquitos infectados. Na dose de 50mg/Kg, **N14A** não reduziu o número de oocistos, dado interpretado como reflexo da sua baixa solubilidade.

Nenhuma das tiazolidinonas testadas foi tão ativa quanto PQ, que mesmo na dose de 15mg/Kg, inibiu 100% da esporogonia do *P. gallinaceum*. De um modo geral, os desvios padrão foram elevados nos experimentos, mesmo entre mosquitos alimentados em aves não tratadas, dado atribuído a influência de diversos fatores que serão posteriormente discutidos.

A **Tabela 12** mostra os resultados obtidos com as tiazolidinonas, derivadas de PQ, em todos os modelos de testes de atividade anti-plasmodial *in vitro* e *in vivo*, bem como a citotoxicidade em células de hepatoma humano (HepG2).

Tabela 10 - Efeito de N14A, derivado de primaquina, na esporogonia do *P. gallinaceum* em mosquitos *A. fluviatilis* alimentados antes (0h) e 6h após tratamento da ave infectada, via oral, com os compostos, em diferentes experimentos.

Dose (mg/Kg)	% mosquitos infectados* (n = 20)		Oocistos/estômago Média ± DP		Inibição do n° de oocistos**	Atividade***
	0h	6h	0h	6h		
100	95%	0%	21 ± 17	0 ± 0	100%	Ativo
100	90%	10%	18 ± 8	2 ± 1	89%	Ativo
100	90%	75% [#]	26 ± 11	3 ± 1	89%	Ativo
100	100%	40%	67 ± 48	10 ± 6	85%	Ativo
50	85%	85%	46 ± 27	68 ± 36	0%	Parcial

* Mosquitos dissecados uma semana após o repasto sanguíneo infectante. ** Calculada como porcentagem de redução do número de oocistos no T6h em relação ao T0h. ***Critério usado: Ativo = redução \geq 85%; Parcial = entre 60 a 84% de redução; Inativo = redução $<$ 60%.
[#]Dose única de 15mg/Kg. # No grupo controle (ave não tratada) nesse experimento, 90% e 90% dos mosquitos se infectaram nos tempos 0h e 6h, respectivamente, com uma média de 15 (0h) e 25 (6h) oocistos/estômago dissecado.

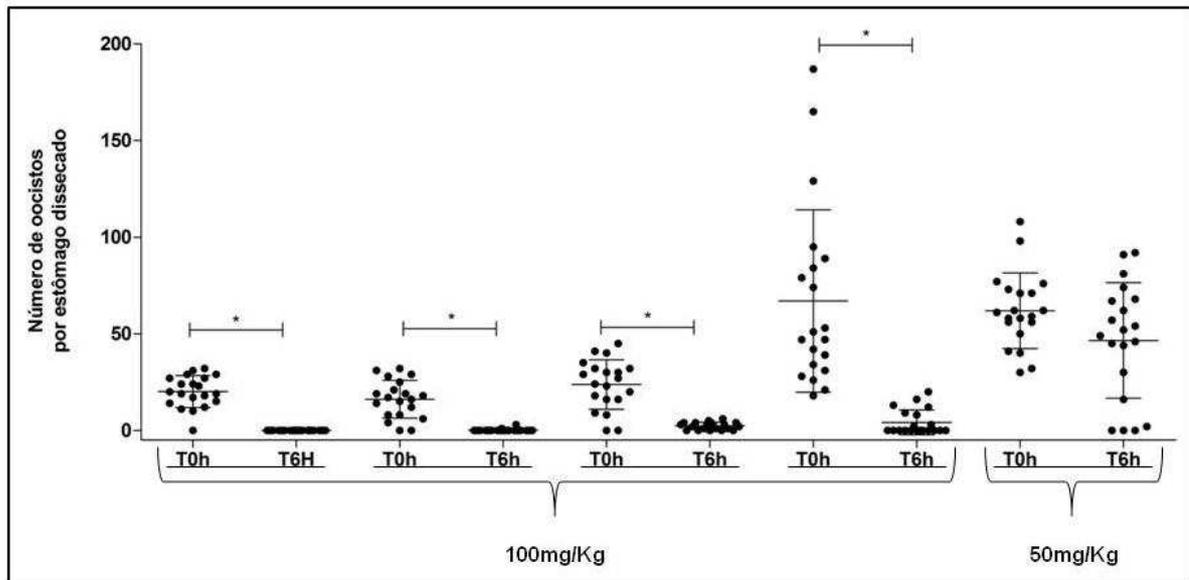


Figura 8 - Dispersão do número de oocistos nos estômagos de *A. fluviatilis* dissecados no sétimo dias após repasto sanguíneo em aves infectadas com *P. gallinaceum*, feito antes (0h) e 6h após tratamento com N14A em dose única por via oral. * Grupos estatisticamente diferentes ($p = 0,0001$) pelo teste de Mann-Whitney.

Tabela 11 - Efeito de N17A, derivado de primaquina, na esporogonia do *P. gallinaceum* em mosquitos *A. fluviatilis* alimentados antes (0h) e 6h após tratamento da ave infectada, via oral, com os compostos, em diferentes experimentos.

Dose (mg/Kg)	% mosquitos infectados* (n = 20)		Oocistos/estômago Média ± DP		Inibição do nº de oocistos**	Atividade***
	0h	6h	0h	6h		
100	100%	0%	18 ± 15	0 ± 0	100%	Ativo
100	90%	75% [#]	87 ± 37	6 ± 2	93%	Ativo
100	100%	45%	47 ± 15	5 ± 2	90%	Ativo
50	90%	45%	10 ± 5	1 ± 1	90%	Ativo
50	90%	80%	28 ± 10	7 ± 7	75%	Parcial
25	100%	95%	114 ± 67	73 ± 29	50%	Parcial

* Mosquitos dissecados uma semana após o repasto sanguíneo infectante. ** Calculada como porcentagem de redução do número de oocistos no T6h em relação ao T0h. *** Critério usado: Ativo = redução \geq 85%; Parcial = entre 60 a 84% de redução; Inativo = redução $<$ 60%. # No grupo controle (ave não tratada) nesse experimento, 100% e 85% dos mosquitos se infectaram nos tempos 0h e 6h, respectivamente, com uma média de 128 (0h) e 73 (6h) oocistos/estômago dissecado.

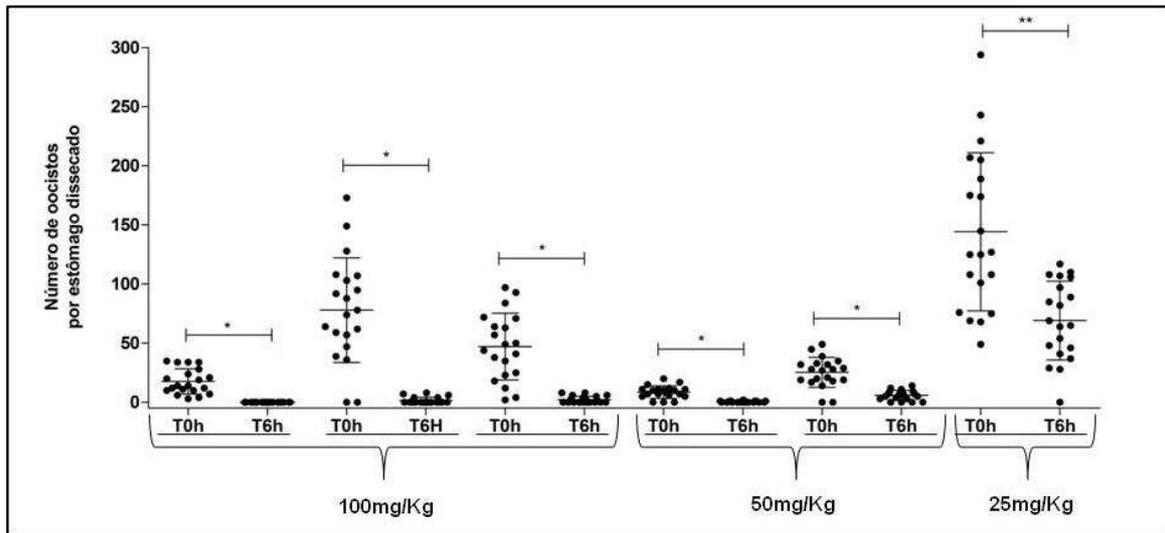


Figura 9 - Dispersão do número de oocistos nos estômagos de *A. fluviatilis* dissecados no sétimo dias após repasto sanguíneo em aves infectadas com *P. gallinaceum*, feito antes (0h) e 6h após tratamento com N17A em dose única por via oral. Grupos estatisticamente diferentes *($p = 0,0001$) e **($p = 0,0002$) pelo teste de Mann-Whitney.

Tabela 12 - Atividade de PQ e das tiazolidinonas contra *P. falciparum in vitro* (IC₅₀), contra *P. berghei* em camundongos, como gametocitocida no *P. gallinaceum* em mosquitos alimentos em aves tratadas, e sua citotoxicidade para células de hepatoma humano (HepG2).

Composto (Códigos)	Atividade <i>in vitro</i>			IS	Atividade <i>in vivo</i>	
	Hipoxantina (IC ₅₀)	Anti-HRP II (IC ₅₀)	HepG2 (MDL ₅₀)		<i>P.</i> <i>berghei</i> ^a	<i>P.</i> <i>gallinaceum</i> ^b
B42A/5l	7,7 ± 4,7	4,9 ± 1,7	> 1000	129	NT	NT
B46A/5e	2,5 ± 1,9	0,89 ± 0,27	>1000	400	NT	NT
N14A/5c	13,8 ± 2,9	8,5 ± 2,3	572 ± 108	41	Ativo	Ativo
N17A/5m	12,3 ± 0,6	4,7 ± 1,3	>1000	81	Inativo	Ativo
N25B/5h	20,7 ± 4,5	9,2 ± 6,9	682 ± 105	Inativo	Ativo	Inativo
N26A/5j	12,0 ± 4,0	8,4 ± 1,5	>1000	83	Inativo	Inativo
N78B/5o	7,9 ± 3,1	4,0 ± 2,6	>1000	127	Inativo	Inativo
N79A/5i	12,0 ± 0,7	7,5 ± 2,6	250 ± 17	21	Inativo	Inativo
N85A/5k	7,5 ± 2,5	3,0 ± 2,6	>1000	133	NT	NT
N86A/5d	11,5 ± 2,3	8,6 ± 2,3	>1000	87	NT	Inativo
N87B/5b	13,3 ± 0,6	7,0 ± 1,5	NT	NT	NT	Parcial
P89A/5f	17,0 ± 4,5	14,7 ± 1,6	292 ± 31	17	Ativo	Inativo
P91A/5p	9,6 ± 2,9	9,3 ± 2,6	>1000	104	NT	Ativo
P92A/5q	18,6 ± 8,3	15,0 ± 3,0	>1000	54	Ativo	Inativo
P97B/5g	9,45 ± 0,35	14,2 ± 0,8	>1000	106	NT	Parcial
Cloroquina	0,12 ± 0,001	0,01 ± 0,001	330 ± 28	2750	Ativo	NT
Primaquina	< 0,7 ± 0,0	< 0,7 ± 0,0	106 ± 5	141	Ativo	Ativo

IS = Índice de Seletividade (MDL₅₀/IC₅₀). NT = Não Testado.

a = Atividade esquizonticida sanguíneo. b = Atividade gametocitocida, avaliada pela inibição do ciclo esporogônico do *P. gallinaceum* em *Aedes fluviatilis*.

6 DISCUSSÃO

Os antimaláricos representam a principal ferramenta em todas as etapas de eliminação da malária, incluindo nas medidas de controle, que visam reduzir e/ou interromper a transmissão da doença, bem como prevenir sua reintrodução em áreas onde já foi eliminada. Entretanto, o surgimento e a propagação de cepas do *Plasmodium* resistentes à maioria dos antimaláricos disponíveis tornaram o tratamento da malária complexo e uma das principais causas de preocupação dos programas de controle (Parija & Praharaj, 2011). Atualmente, é utilizada a combinação de artemisinina e seus derivados com outros antimaláricos para tratar a doença causada pelo *P. falciparum* resistente aos antimaláricos disponíveis (WHO, 2010a).

A agenda de prioridades para a erradicação da malária deve incluir a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos que sejam, preferencialmente, administrados por via oral, em dose única, acessíveis às populações mais pobres expostas a transmissão e que resultem na cura radical de todas as espécies dos parasitos causadores da malária humana (WHO, 2011; The malERA Consultative Group on Drugs, 2011).

A descoberta de novos antimaláricos passou por uma mudança de paradigma nos últimos 10 anos, segundo recente revisão de Burrows *et al.* (2011), principalmente devido: i) à crescente compreensão da importância da doença; ii) ao aumento do financiamento para o controle da doença por parte de alguns governos e de fundações privadas, como a Fundação Bill e Melinda Gates e o Wellcome Trust; iii) ao aumento de investimentos em doenças negligenciadas por parte de indústrias farmacêuticas como a GlaxoSmithKline e Novartis; iv) aos avanços na compreensão da biologia do parasito, sustentados pelos dados de sequência do genoma dos parasitos causadores da doença; e, v) ao desenvolvimento de novas tecnologias que favoreceram a triagem em larga escala e desenvolvimento de fármacos.

Entretanto, se por um lado observam-se avanços na pesquisa e controle da malária humana, por outro é contínua a multiplicação de cepas resistentes aos medicamentos, principalmente no caso do *P. falciparum*. Além disso, a limitação do uso de fármacos extremamente tóxicos, como a PQ, aliada à complexidade dos modelos experimentais para testes de compostos, sobretudo aqueles visando os hipnozoítos, formas residuais resultantes do desenvolvimento lento dos esporozoítos no fígado, característico das espécies *P. vivax* e *P. ovale*, os quais são responsáveis pelas recaídas tardias da doença, tornam o controle da malária ainda mais complexo (Mazier *et al.*, 2009).

A PQ é o principal antimalárico utilizado no controle das recaídas causadas pelo *P. vivax* por ser o único hipnozoiticida atualmente disponível. A PQ também é ativa contra os gametócitos, sendo indicada para bloquear a transmissão da malária em áreas hiper-endêmicas (Baird & Hoffman, 2004). O amplo espectro da atividade biológica da PQ, bem como suas

características químicas, tem atraído a atenção de diversos grupos de pesquisas que buscam compostos mais ativos e menos tóxicos que a PQ (Vale *et al.*, 2009). A ebulaquina, por exemplo, uma 8-aminoquinolina, derivada de PQ, aprovada na Índia para uso humano, é mais ativa que a PQ, significativamente menos tóxica e eficaz contra os hipnozoítos de *P. vivax*. No entanto, a mesma ainda se encontra em triagem clínica (Dutta *et al.*, 1989).

Nesse trabalho foram testadas as atividades biológicas de diversas tiazolidinonas inéditas, sintetizadas na Universidade Federal de Pelotas (UFPel), pelo grupo do Dr. Wilson Cunico (projeto financiado pelo CNPq – Projeto nº 555675/2009-2 Edital Doenças Negligenciadas) em colaboração com o nosso grupo. A caracterização química e estrutural desses compostos foi recentemente reportada (Neuenfeldt *et al.*, 2011). As tiazolidinonas são heterociclos complexos com ampla aplicação em química medicinal (Cunico *et al.*, 2008) com atividade anti-inflamatória (Sharma *et al.*, 2011), tuberculostática (Gomes *et al.*, 2010) e anti-HIV (Ravichandran *et al.*, 2009). No presente estudo, diversas delas apresentaram atividade anti-*P. falciparum* ($IC_{50} < 10\mu\text{g/mL}$).

Entre os métodos utilizados na avaliação da atividade *in vitro* anti-*P. falciparum*, o teste imunoenzimático anti-HRP-II se mostrou mais sensível, revelando 80% dos compostos ativos ($IC_{50} < 10\mu\text{g/mL}$); enquanto a incorporação de hipoxantina revelou 40%; diferença atribuída ao tempo de incubação dos parasitos com os compostos-testes, 72h e 48h, respectivamente. No entanto, com os derivados da cloroquina o método de hipoxantina foi mais sensível que anti-HRP-II na detecção da atividade, em testes recentes realizados em nosso laboratório (Aguiar, 2011). Segundo Solomon *et al.* (2007), diferenças nos valores de IC_{50} de tiazolidinonas derivadas de 4-aminoquinolinas, podem ser atribuídas ao número de átomos de carbono (-C) na cadeia lateral e ao tamanho do anel introduzido na estrutura; a introdução de anéis de oito membros, com substituição no carbono 2 por um grupo 2-clorofenil, pode aumentar a atividade antiplasmodial. Das tiazolidinonas testadas, B46A foi a mais ativa, sendo a única com dois átomos de cloro (-Cl) ligados ao anel aromático em ressonância. A presença desse grupo ligante possivelmente favoreceu sua maior atividade *in vitro*.

Atualmente, há mais de 10 milhões de novos compostos ativos contra as formas eritrocíticas do *P. falciparum*, a maioria detectada através de plataformas automatizadas (Ku *et al.*, 2011). Paralelo à atividade antiplasmodial, a citotoxicidade dos compostos testes deve ser avaliada para obtenção do índice de seletividade (IS), um importante critério de seleção de protótipos ideais. Nesse estudo, a toxicidade *in vitro* das novas tiazolidinonas foram avaliadas em duas linhagens celulares: células de hepatoma humano (HepG2) e células de rim de

macaco (BGM). Tais linhagens celulares foram utilizadas, pois é no fígado e nos rins dos mamíferos, que a maior parte dos fármacos é metabolizado. A linhagem celular HepG2 é a mais utilizada na literatura, no ensaio de MTT, para avaliação da toxicidade (Fotakis & Timbrell, 2006). Não houve diferenças na citotoxicidade dos compostos testados em ambas as linhagens celulares. As tiazolidinonas e a PQ mostraram baixa toxicidade *in vitro*, no entanto, a PQ foi mais tóxica que seus derivados. A PQ e seus metabólitos tem elevada toxicidade, que é agravada em indivíduos deficientes na enzima G6PD, o que representa um grande problema para o controle da malária no mundo (Beutler *et al.*, 2007).

O IS, razão entre o MDL₅₀ e o IC₅₀, é também conhecido como janela terapêutica. Na literatura, substâncias com IS acima de 10 são consideradas atóxicas (Bézivin *et al.*, 2003). No caso das tiazolidinonas derivadas de PQ, muitas tiveram IS acima de 100. Merece destaque a B46A, que foi o composto mais ativo contra o *P. falciparum in vitro*, e não apresentou toxicidade na dose máxima testada, o que resultou em um alto IS. Portanto, as tiazolidinonas podem representar futuros protótipos de antimaláricos. No entanto, esses compostos não puderam ser testados contra a malária murina, nem avaliados para sua toxicidade *in vivo*, devido à quantidade insuficiente de massa para os testes. Antes de selecionarmos a tiazolidinona mais promissora para desenvolvimento de um novo fármaco, é necessário avaliar sua toxicidade *in vivo*, inclusive, utilizando animais deficientes na enzima G6PD como proposto recentemente por Ko *et al.* (2011).

Nos testes *in vivo*, contra a malária causada por *P. berghei*, quatro tiazolidinonas foram ativas (N14A, N25B, P89A e P92A), sendo uma (N25B) inativa contra o *P. falciparum in vitro*. Outras tiazolidinonas ativas contra o *P. falciparum*, foram inativas na malária murina. Essa discrepância possivelmente se deve a problemas na absorção, no metabolismo, na excreção e/ou devido ao caráter hidrofílico desses compostos. Mesmo diluídas em DMSO 5% alguns compostos mostraram baixa solubilidade e foram administrados na forma de suspensão, o que pode ter interferido na absorção e na atividade farmacológica. Por outro lado, as diversas espécies de *Plasmodium* podem ter diferentes suscetibilidades aos fármacos.

Nenhuma das tiazolidinonas ativas contra o *P. berghei* foi tão ativa quanto a PQ, único composto capaz de suprimir a parasitemia dos animais tratados. A atividade esquizonticida sanguínea da PQ já foi demonstrada na literatura, inclusive em pacientes da Tailândia, infectados por *P. vivax*, tratados, em monoterapia, com 15mg/Kg por 14 dias (Pukrittayakamee *et al.*, 1994). No entanto, pela atividade hemolítica da PQ nos indivíduos G6PD negativos e, por problemas decorrentes da identificação de pacientes com tal distúrbio, a PQ não é empregada para essa finalidade (Baird, 2009).

Diversas espécies de *Plasmodium* podem ser utilizadas nos testes de antimaláricos em camundongos; cepas de parasitos resistentes aos antimaláricos disponíveis (Adebayo & Krettli, 2011), parasitos capazes de induzir malária cerebral grave (Clemmer *et al.*, 2011) e parasitos transgênicos expressando GFP (*Green Fluorescent Protein*) (Natarajan *et al.*, 2001; Tarun *et al.*, 2006). Camundongos são de fácil manutenção e baixo custo em relação, por exemplo, aos símios suscetíveis à malária humana. Além disso, testes em camundongos exigem menores massas de compostos quando comparado a outros modelos animais. O modelo de malária aviária, largamente utilizada no passado para seleção de novos candidatos a antimaláricos, foi substituído pela malária murina por razões práticas (Krettli *et al.*, 2009).

Segundo Burrows *et al.* (2011), os novos antimaláricos devem ser ativos contra as diversas formas do ciclo evolutivo dos plasmódios: contra as formas assexuadas sanguíneas e as hepáticas (tanto as exo-eritrocíticas primárias como as latentes, os hipnozoítos) e contra as formas sexuadas, os gametócitos. São raros os medicamentos ativos contra gametócitos e contra os hipnozoítos da malária pelo *P. vivax* (Derbyshire *et al.*, 2011). A principal finalidade deste trabalho foi investigar compostos que pudessem substituir a PQ. A busca de novos fármacos para prevenir as recaídas tardias, é considerado um importante objetivo (Mazier *et al.*, 2009), sobretudo considerando a meta atual de se erradicar a malária (The malERA Consultative Group on Drugs, 2011).

No Brasil, a pesquisa de compostos hipnozoiticidas e gametocitocidas para uso humano é ainda mais difícil e complexa, considerando a ausência de mosquitos anofelinos mantidos em laboratório, capazes de serem infectados com plasmódios de mamíferos. A busca de solução para tal problema deveria representar uma prioridade na pesquisa dos entomologistas brasileiros (Krettli *et al.*, 2009).

O *P. gallinaceum* utilizado em nosso laboratório, inclusive no atual trabalho, para pesquisa de compostos gametocitocidas, possui um ciclo evolutivo com diferenças importantes em relação ao de parasitos de malária de mamíferos, particularmente no hospedeiro vertebrado, uma vez que possui um ciclo exo-eritrocítico secundário nas células endoteliais ou em macrófagos (Krettli, 1994). Para obtenção do ciclo esporogônico do *P. gallinaceum* utilizamos mosquitos *Aedes fluviatilis* (Tasón de Camargo & Krettli, 1978), apesar dessa espécie de mosquito ser menos suscetível que o *Aedes aegypti*, largamente utilizado no hemisfério norte como vetor experimental por décadas (Terzian 1947, Terzian *et al.*, 1949). A vantagem do *A. fluviatilis* é não representar risco para a saúde pública por não ser vetor da dengue ou da febre amarela urbana (de Camargo *et al.*, 1983).

A capacidade da PQ em inibir o desenvolvimento de gametócitos e, portanto o ciclo esporogônico no mosquito vetor, proposto como modelo para testar hipnozoiticidas por Gwadz *et al.* (1983) na malária aviária, foi confirmado por Carvalho *et al.* (1992). No entanto, os autores alertam para a necessidade de melhor controle da parasitemia das aves utilizadas no repasto sanguíneo dos mosquitos, ao observarem diminuição do número de oocistos mesmo nos mosquitos alimentados em aves não tratadas, antes (tempo zero-T0h) ou depois (T6h) do repasto sanguíneo. O fato foi atribuído à presença de anticorpos anti-gametócitos, que inibem sua evolução, já demonstrado anteriormente (Carter & Chen, 1976). No atual trabalho, em aves não tratadas (com parasitemias de 6 a 9%) utilizadas para alimentar mosquitos, o número de oocistos foi menor no T6h, em dois dos sete experimentos realizados. Nos dados de Carvalho *et al.* (1992) as reduções foram de até 60% no número de oocistos ao utilizar aves com parasitemias semelhantes.

Outras variáveis como idade das aves e dos mosquitos, fase da infecção das aves doadoras do repasto sanguíneo, podem também influenciar a esporogonia, especialmente considerando que *A. fluviatilis* é um mosquito essencialmente antropofílico (Consoli & Williams, 1978). Utilizamos mosquitos adultos de três a sete dias, procedentes da linhagem mantida há décadas no laboratório, fazendo repasto sanguíneo em camundongos e aves, o que pode ter alterado sua suscetibilidade ao parasito. Enquanto nos trabalhos iniciais (de Camargo *et al.*, 1983) esta espécie mostrou uma refratariedade em torno de 20% ou mais, no atual estudo, até 100% de suscetibilidade foi observada, nos diversos experimentos. Fatores como, heterogeneidade genética das populações de mosquitos, resposta imune inata dos mesmos, o tempo de alimentação do mosquito no vertebrado e o número de gametócitos ingeridos podem afetar o número de insetos infectados. Outros fatores como temperatura e umidade no ambiente onde os mosquitos são mantidos, são também assinalados como causa de variações em trabalhos com o ciclo esporogônico (Vaughan *et al.*, 1992).

Foram utilizados mosquitos do mesmo lote em cada teste, com a mesma idade, criados e mantidos nas mesmas condições, nos diversos experimentos. Apesar disso, os desvios padrões no número de oocistos foram elevados, mesmo em mosquitos alimentados em aves não tratadas. No entanto, como o cálculo da porcentagem de infecção em cada experimento foi feito com base no número de oocistos nos mosquitos alimentados na mesma ave antes do tratamento (T0h), a fim de minimizar as possíveis variações inerentes ao modelo. Apenas a PQ inibiu completamente o ciclo esporogônico do *P. gallinaceum* (dose de 15mg/Kg). Portanto, essa reprodutibilidade na detecção de compostos gametocitocidas torna o modelo adequado para triagem de hipnozoiticidas eventuais substitutos da PQ.

Os critérios usados aqui foram, em parte, os mesmos propostos por Gwadz *et al.* (1983). No presente trabalho, utilizamos como indicador de atividade gametocitocida a redução percentual do número de oocistos por ser mais reprodutível. Na maioria dos testes, mesmo com os compostos considerados ativos, foram elevadas as proporções de mosquitos infectados. No entanto, os estômagos apresentavam poucos oocistos (cinco em média), como mostrado nas figuras de dispersão do número de oocistos. Não mensuramos o tamanho dos oocistos, mas em alguns experimentos esses eram visivelmente menores que nos estômagos de mosquitos controles alimentados na mesma ave, antes de seu tratamento. Algumas inconsistências foram observadas como, por exemplo, nos testes com N25B e P92A, inativos em um experimento e parcialmente ativos em outro, dado atribuído à baixa solubilidade desses compostos.

Quatro naftoquinonas sintéticas, cujas atividades *in vitro* contra o *P. falciparum* haviam sido anteriormente demonstradas (Carvalho *et al.*, 1988), foram testadas quanto à atividade gametocitocida na dose de 200mg/Kg, sendo todas inativas. Extratos de uma planta medicinal, *Ampelozizyphus amazonicus*, conhecida como “cerveja do índio” (Carvalho *et al.*, 1992), largamente utilizada para prevenir a malária em regiões endêmicas do Brasil (Oliveira *et al.*, 2011), foram também inativos no testes de inibição de esporogonia feitos em paralelo. Em estudos feitos com os extratos dessa planta, pelo grupo da Prof. Antoniana Krettli, em colaboração com o Dr. Virgílio do Rosário (Universidade Nova de Lisboa) foi demonstrada sua intensa atividade anti-esporozoíto *in vitro* e *in vivo* (Andrade-Neto *et al.*, 2008). O extrato etanólico da planta foi capaz de inibir o ciclo exo-eritrocítico *in vitro* de esporozoítos do *P. berghei in vivo*, utilizando camundongos pré-tratados e infectados posteriormente pela picada de mosquitos com *P. berghei*. Houve aumento do período pré-patente da doença, e na maior dose do extrato (dose diária de 400mg/Kg, via oral, por 12 dias) alguns animais não se infectaram. Esses dados confirmam a observação popular de que o uso de infusão preparada com a “cerveja do índio” pode induzir proteção contra malária. Mas a planta apesar de profilática, não pode ser usada para tratar a malária, nem para prevenir as recaídas tardias do *P. vivax*, a julgar pelos dados de que a mesma não é gametocitocida (Carvalho *et al.*, 1992). Compostos sintetizados no Walter Reed Army Institute of Research-EUA, como o RC-12 - um pirocatecol, apesar de inativos contra as formas sanguíneas e hepáticas da malária murina, possuem atividade hipnozoitocida em macacos *Rhesus* (Schmidt *et al.*, 1966). A utilidade do modelo proposto com a malária aviária foi confirmado com outro composto, o WR212293 (4-aminoprimaquina), ativo contra as formas teciduais primárias do *P. berghei*, mas inativo contra gametócitos do *P. gallinaceum* e contra hipnozoítos de *P. cynomolgi*. Tais exemplos

mostrando a relação entre a inibição da formação de oocistos no modelo descrito por Gwadz *et al.* (1983) e de testes de hipnozoitocidas em símios, serviu de base racional ao nosso trabalho.

Os compostos N14A, N17A e P91A, ativos contra gametócitos como demonstrado, podem representar novos substitutos da PQ, com as seguintes vantagens: baixa toxicidade e atividade esquizontocida sanguínea. Novos testes destas tiazolidinonas contra os hipnozoítos deverão ser realizados em macacos *Rhesus* infectados por *P. cynomolgi*, modelo adequado para tal avaliação.

Testes *in vitro* com hipnozoítos foram recentemente reportados e podem representar um passo importante para a busca de novos hipnozoitocidas (Rodrigues *et al.*, 2011). Em um trabalho feito pelo grupo do Dr. Stephen Hoffman (Chattopadhyay *et al.*, 2010), os autores observaram formas de desenvolvimento lento, nove dias após infecção *in vitro* de células de um hepatoma humano com esporozoítos do *P. vivax*. Segundo os autores é necessário confirmar se essas formas correspondem aos hipnozoítos. Em outro estudo, Demebele *et al.* (2011) infectaram hepatócitos de símios em cultivo com esporozoítos de *P. cynomolgi* e observaram o desenvolvimento de formas hepáticas com baixa sensibilidade aos esquizontocidas teciduais (atavaquona e pirimetamina), mas extremamente sensíveis à PQ. No entanto, esquizontes em hepatócitos humanos infectados, em paralelo, com esporozoítos de *P. falciparum*, se mostraram sensíveis aos esquizontocidas teciduais. Segundo os autores, esses parasitos obtidos na infecção com *P. cynomolgi* podem corresponder aos hipnozoítos hepáticos. Este teste *in vitro* também necessita ser melhor validado com relação ao estabelecimento de protocolos que permitam longos períodos de incubação (Rodrigues *et al.*, 2011).

Na Colômbia, esporozoítos das espécies de *P. vivax* e *P. falciparum* são produzidos em *Anopheles albimanus* (Zapata *et al.*, 2002; Solarte *et al.*, 2011). Infecções *in vivo* de macacos da espécie *Aotus lemurinus*, também com esporozoítos, permite a manutenção do ciclo completo do parasito (Herrera *et al.*, 2002). No entanto, não há referência de recaídas tardias neste modelo, que é extensivamente utilizado no estudo de vacinas (Arévalo-Herrera *et al.*, 2010). No Brasil, protocolos que requerem a utilização de esporozoítos dependem de colaborações internacionais, uma vez que não são produzidos esporozoítos de *P. vivax* na rotina.

Compostos gametocitocidas, que bloqueiem a transmissão da malária, vêm sendo considerados importantes nos programas do desenvolvimento de fármacos (Guttery *et al.*, 2012). Dois novos carbamatos derivados de PQ, recentemente estudados, reduziram

significativamente o número de oocistos do *P. berghei* em *An. stephensi* e o número de mosquitos infectados, após repasto sanguíneo em camundongos tratados por via oral com os novos carbamatos. No entanto, nenhum deles tão ativo quanto a PQ (Mata *et al.*, 2012). Utilizando a abordagem etnofarmacológica, um extrato padronizado de sementes da planta *Azadirachta indica*, empregada para tratar malária em áreas endêmicas, mostrou compostos da classe dos terpenóides, capazes de bloquear a transmissão da malária murina em *An. stephensi* (Soh & Benoit-Vical, 2007). Em 138 mosquitos alimentados em camundongos tratados com dose única de 50mg/Kg do extrato, por via oral, não foram encontrados oocistos, o que foi atribuído à inibição dos eventos iniciais do desenvolvimento esporogônico (Lucantoni *et al.*, 2010).

Estudos com bifosfonatos lipofílicos, desenvolvidos para o tratamento do câncer, demonstraram sua intensa atividade contra as formas do ciclo exo-eritrocítico do *P. berghei*, *in vitro* e *in vivo*, além de atividade esquizotocida sanguínea na malária murina por essa mesma espécie, e contra as formas de cultivo do *P. falciparum*. Os autores sugerem que esses fármacos representam potenciais alvos contra os estágios hepáticos da malária causada pelo *P. vivax*, uma vez que os mesmos também inibiram a atividade de proteínas características das formas hepáticas dessa espécie (Singh *et al.*, 2010). Capela *et al.* (2011), identificaram atividade em uma classe de híbridos de PQ com artesunato contra as formas hepáticas da malária murina. Recentemente, Dr. Rogério Amino, nosso colaborador no Instituto Pasteur (França), avaliou o efeito de N14A sobre o ciclo primário da malária murina, observando sua atividade contra formas do ciclo esquizogônico do *P. berghei* no fígado de camundongos, tratados com duas doses de 30mg/Kg/ip. No entanto, testadas em paralelo, N17A e N79A foram inativas. Mesmo inativas contra as formas hepáticas do ciclo primário do *P. berghei*, a N17A necessita ser avaliada contra os hipnozoítos do *P. vivax* ou *P. cynomolgi*.

Schmidt (1983) descreveu 34 compostos derivados da família das 8-aminoquinolinas (**Figura 10**), com atividade igual ou maior que a PQ contra o *P. cynomolgi* em macacos (revisto por Rodrigues *et al.*, 2011). A dose letal para 50% dos parasitos (ED₅₀) desses compostos variou entre 0,074 e 0,51mg/K, enquanto para a PQ esse valor foi igual a 0,38mg/Kg. Os autores concluíram que substituições nos carbonos 2 e 4 por grupos metilas (R¹ e R² = CH₃) e no carbono 5 por Flúor (R³ = F) pode resultar em melhora da atividade e diminuição da toxicidade.

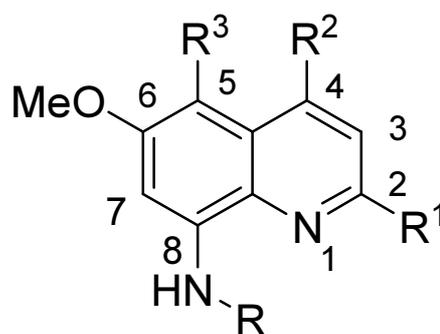


Figura 10 - Estrutura geral de uma 8-aminoquinolina mostrando os pontos (R) para modificações estruturais.

Compostos de diversas classes químicas estão em teste quanto à atividade curativa radical em macacos *Rhesus* infectados com esporozoítos do *P. cynomolgi* (Rodrigues *et al.*, 2011). Em trabalhos realizados na Divisão de Terapias Experimentais do Walter Reed Army Institute of Research (EUA), líder em estudos da capacidade hipnozoitocida de novos compostos, foram obtidos compostos que induziram cura radical, como derivados de imidazolin-4-onas (Liu *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2011b), e derivados N-alquilimidazolidinedionas (Zhang *et al.*, 2011a). No presente estudo, três das tiazolidinonas testadas (N14A, N17A e P91A), inibiram o ciclo esporogônico na malária aviária, sendo candidatos para estes testes.

O Tinidazol, medicamento utilizado contra doenças parasitárias como tricomoníase, giardíase e amebíase, demonstrou atividade anti-recaída já demonstrada em macacos, e encontra-se em testes contra a malária humana pelo *P. vivax* (Miller, 2009; Burrows *et al.*, 2011). Essa abordagem visando a identificação de antimaláricos a partir de medicamentos já aprovados para uso em humanos, tem sido usada com sucesso, inclusive pelo nosso grupo, que demonstrou atividade *in vitro* contra as formas sanguíneas do *P. falciparum* dos fármacos artovastatina, itraconazol e pozaconazol (Penna-Coutinho *et al.*, 2011).

O desenvolvimento da resistência à PQ tem sido pouco documentado, diante da ausência de meios de diagnóstico que a comprovem. Não há, por exemplo, um bom marcador de resistência à PQ para as formas hepáticas do parasito (Baird, 2009). No entanto, falhas terapêuticas pela PQ já foram documentadas em diversas partes do mundo (Baird & Hoffman 2004), inclusive no Brasil (Duarte *et al.*, 2001). Em estudo realizado na Tailândia, de 81 pacientes tratados com a dose padrão de 15mg/Kg de PQ e não expostos a reinfeção, sete apresentaram recaídas seis meses após o tratamento. No entanto, apenas um de 86 pacientes

tratados com 22,5mg/Kg de PQ teve recaída (Bunnag *et al.*, 1994). Segundo Duarte *et al.* (2003) fatores relacionados à cepa de *P. vivax*, ao esquema terapêutico empregado e às particularidades de cada paciente, explicam as falhas terapêuticas.

Em um projeto recentemente aprovado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig/Edital Universal 2011) prosseguiremos a colaboração iniciada com Dr. Rogério Amino (Instituto Pasteur) e com o Dr. Wilson Cunico (químicos da UFPel), para síntese de maiores quantidades das tiazolidinonas, especialmente os compostos N14A, P91A e N17A. Testes serão conduzidos contra formas teciduais do ciclo hepático primário *in vivo* utilizando o modelo murino, em colaboração com pesquisadores no Instituto Pasteur. Uma vez identificadas, as tiazolidinonas ativas poderão ser utilizadas em ensaios clínicos em áreas endêmicas de *P. vivax*, visando o controle das recaídas tardias da malária.

7 CONCLUSÕES

Após testar um total de 15 novos compostos derivados de PQ, pertencentes a classe das tiazolidinonas, utilizando diferentes modelos de experimentação *in vitro* e *in vivo* para avaliar sua atividade antiplasmodial, foi possível concluir que:

- i) Treze tiazolidinonas foram ativas como esquizonticidas sanguíneos contra o *P. falciparum in vitro*;
- ii) O método de anti-HRPII se mostrou mais sensível na detecção de tiazolidinonas ativas; o que sugere que o alvo do teste empregado pode influenciar na pesquisa da atividade;
- iii) As tiazolidinonas foram consideradas atóxicas, na dose máxima testada, para células de mamíferos *in vitro*;
- iv) Apesar de ativas *in vivo*, suprimindo a parasitemia de camundongos com malária pelo *P. berghei*, na dose oral de 50mg/Kg, os compostos N14A, N25B, P89 e P92A, tiveram tal atividade significativamente menor que a PQ, utilizada como controle, ativa em doses menores que 25mg/Kg;
- v) a inibição da esporogonia do *P. gallinaceum* em mosquitos *A. fluviatilis* se mostrou reprodutível para triagem de compostos gametocitocidas, mas apenas a PQ foi capaz de inibir o ciclo esporogônico do parasito no hospedeiro, enquanto três dos novos compostos foram parcialmente ativos;
- vi) N14A, N17A e P91A podem representar compostos com potencial atividade hipnozoítica, no entanto, a atividade inequívoca anti-hipnozoítos desses compostos necessita ser ainda demonstrada em macacos *Rhesus* infectados com esporozoítos do *P. cynomolgi*, inexistentes no Brasil.

8 PERSPECTIVAS

Nesse trabalho foram testados compostos inéditos derivados de PQ, com a demonstração da atividade esquizotocida sanguínea *in vitro* contra o *P. falciparum*, e *in vivo* contra o *P. berghei*. Foi também investigada sua atividade gametocitocida. Será dada continuidade ao projeto visando a obtenção de um fármaco que possa substituir a PQ, único medicamento disponível para tratar as recaídas tardias da malária pelo *P. vivax*. Os objetivos futuros visam:

- i. Sintetizar novas tiazolidinonas, em colaboração com o químico responsável Dr. Wilson Cunico (UFPel), visando melhorar sua solubilidade em água, através de novas modificações na estrutura da PQ e dos seus derivados;
- ii. Estudar se as tiazolidinonas com atividade gametocitocida demonstrada nesse trabalho, são ativas contra as formas hepáticas da malária em camundongos infectados com esporozoítos de *P. berghei*; e, posteriormente avaliar a atividade hipnozoitocida das tiazolidinonas mais promissoras em macacos *Rhesus* infectados com *P. cynomolgi*;
- iii. Avaliar o possível mecanismo de ação de N14A e N17A, as tiazolidinonas ativas contra gametócitos, observando-se o papel desses compostos na sinalização por cálcio durante a exflagelação, evento dependente de proteínas-quinases e de sinalização de cálcio; a inibição dessa sinalização pode resultar na não formação dos gametas móveis (Billker *et al.*, 2004).

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adebayo JO, Krettli AU. Potential antimalarials from Nigerian plants: a review. *J Ethnopharmacol*, 2011; 133: 289-302.
- Agnandji ST, Lell B, Soulanoudjingar SS, Fernandes JF, Abossolo BP, Conzelmann C, et al. First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N Engl J Med*, 2011; 365: 1863-75.
- Aguiar ACC. Avaliação da atividade citotóxica e antimalárica de análogos da cloroquina [dissertação]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2010.
- Alecrim M, Alecrim W, Macedo V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop*, 1999; 32: 67-8.
- Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MP, Lacerda MV, Alecrim MG. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*, 2010; 16: 1611-4.
- Alonso PL, Brown G, Arevalo-Herrera M, Binka F, Chitnis C, Collins F, et al. A research agenda to underpin malaria eradication. *PLoS Med*, 2011; 8: e1000406.
- Andrade-Neto V, Brandão M, Nogueira F, Rosário V, Krettli AU. *Ampeloziziphus amazonicus* Ducke (Rhamnaceae), a medicinal plant used to prevent malaria in the Amazon Region, hampers the development of *Plasmodium berghei* sporozoites. *Int J Parasitol*, 2008; 38: 1505-11.
- Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol*, 2009; 25: 220-7.
- Arévalo-Herrera M, Chitnis C, Herrera S. Current status of *Plasmodium vivax* vaccine. *Hum Vaccin*, 2010; 6: 124-32.
- Baird JK. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004; 48: 4075-83.

Baird JK. Resistance to therapies for infection by *Plasmodium vivax*. Clin Microbiol Rev, 2009; 22: 508-34.

Baird JK, Hoffman SL. Primaquine therapy for malaria. Clin Infect Dis, 2004; 39: 1336-45.

Baird JK, Surjadjaja C. Consideration of ethics in primaquine therapy against malaria transmission. Trends Parasitol, 2011; 27: 11-6.

Baker DA. Malaria gametocytogenesis. Mol Biochem Parasitol, 2010; 172: 57-65.

Barreau C, Conrad J, Fischer E, Lujan HD, Vernick KD. Identification of surface molecules on salivary glands of the mosquito, *Aedes aegypti*, by a panel of monoclonal antibodies. Insect Biochem Mol Biol, 1999; 29: 515-26.

Baton LA, Ranford-Cartwright LC. *Plasmodium falciparum* ookinete invasion of the midgut epithelium of *Anopheles stephensi* is consistent with the Time Bomb model. Parasitology, 2004; 129: 663-76.

Beutler E, Duparc S, Group GCPD. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and antimalarial drug development. Am J Trop Med Hyg, 2007; 77: 779-89.

Billker O, Lindo V, Panico M, Etienne AE, Paxton T, Dell A, Rogers M, Sinden RE, Morris HR. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. Nature, 1998; 392: 289-92.

Billker O, Dechamps S, Tewari R, Wenig G, Franke-Fayard B, Brinkmann V. Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. Cell, 2004; 117(4): 503-14.

Bolchoz LJ, Budinsky RA, McMillan DC, Jollow DJ. Primaquine-induced hemolytic anemia: formation and hemotoxicity of the arylhydroxylamine metabolite 6-methoxy-8-hydroxylaminoquinoline. J Pharmacol Exp Ther, 2001; 297: 509-15.

Bolchoz LJ, Morrow JD, Jollow DJ, McMillan DC. Primaquine-induced hemolytic anemia: effect of 6-methoxy-8-hydroxylaminoquinoline on rat erythrocyte sulfhydryl status, membrane lipids, cytoskeletal proteins, and morphology. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002; 303: 141-8.

Brumpt E. Paludisme aviaire: *Plasmodium gallinaceum* n sp de la poule domestique. *Compt Rend Acad Sci Paris*, 1935; 200: 783-85.

Bunnag D, Karbwang J, Thanavibul A, Chittamas S, Ratanapongse Y, Chalermrut K, Bangchang KN, Harinasuta T. High dose of primaquine in primaquine resistant vivax malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1994; 88: 218-9.

Bézivin C, Tomasi S, Lohézic-Le Dévéhat F, Boustie J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*, 2003; 10: 499-503.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009. 816 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos) ISBN 978-85-334-1632-1. Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia_vigilancia_epidemiologia_2010_web.pdf>.

Acesso em 23 jan 2012.

Brasil. Ministério da Saúde, 2010. Secretaria de Vigilância em Saúde. Dados epidemiológicos de malária, por estado. Amazônia Legal, janeiro a maio de 2009 e 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/avaliacao_malaria_jan_mai_19_07_2010.pdf

>. Acesso em 23 jan 2012.

Burrows JN, Chibale K, Wells TN. The state of the art in anti-malarial drug discovery and development. *Curr Top Med Chem*, 2011; 11: 1226-54.

Butcher GA. Antimalarial drugs and the mosquito transmission of *Plasmodium*. *Int J Parasitol*, 1997; 27: 975-87.

Calvo-Calle J, Moreno A, Eling W, Nardin E. *In vitro* development of infectious liver stages of *P. yoelii* and *P. berghei* malaria in human cell lines. *Exp Parasitol*, 1994; 79: 362-73.

Capela R, Cabal GG, Rosenthal PJ, Gut J, Mota MM, Moreira R, Lopes F, Prudêncio M. Design and evaluation of primaquine-artemisinin hybrids as a multistage antimalarial strategy. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011; 55: 4698-706.

Carmona-Fonseca J, Alvarez G, Maestre A. Methemoglobinemia and adverse events in *Plasmodium vivax* malaria patients associated with high doses of primaquine treatment. *Am J Trop Med Hyg*, 2009; 80: 188-93.

Carter R, Chen DH. Malaria transmission blocked by immunisation with gametes of the malaria parasite. *Nature*, 1976; 263: 57-60.

Carvalho L, Brandão M, Santos-Filho D, Lopes J, Krettli AU. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied *in vivo* in *Plasmodium berghei*-infected mice and *in vitro* against *Plasmodium falciparum* in culture. *Braz J Med Biol Res*, 1991; 24: 1113-23.

Carvalho L, Ferrari W, Krettli AU. A method for screening drugs against the liver stages of malaria using *Plasmodium gallinaceum* and *Aedes* mosquitos. *Braz J Med Biol Res*, 1992; 25: 247-55.

Carvalho L, Rocha E, Raslan D, Oliveira A, Krettli AU. *In vitro* activity of natural and synthetic naphthoquinones against erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Braz J Med Biol Res*, 1988; 21: 485-7.

Chattopadhyay R, Velmurugan S, Chakiath C, Andrews Donkor L, Milhous W, Barnwell JW, Collins WE, Hoffman SL. Establishment of an *in vitro* assay for assessing the effects of drugs on the liver stages of *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS One*, 2010; 5: e14275.

Clemmer L, Martins YC, Zanini GM, Frangos JA, Carvalho LJ. Artemether and artesunate show the highest efficacies in rescuing mice with late-stage cerebral malaria and rapidly decrease leukocyte accumulation in the brain. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011; 55: 1383-90.

Consoli RAGB, Williams P. Laboratory observations on the bionomics of *Aedes fluviatilis* (Lutz) (Diptera: Culicidae). Bull Entomol Res, 1978; 68: 123-36.

Cox-Singh J. *Knowlesi* malaria in Vietnam. Malar J, 2009; 8: 269.

Cunico W, Gomes, CRB, Vellasco Júnior WT, Chemistry and biological activities of 1,3-thiazolidinon-4-ones, Mini-Rev Org Chem, 2008; 5: 336-344.

da Silva-Nunes M, Moreno M, Conn JE, Gamboa D, Abeles S, Vinetz JM, Ferreira MU. Amazonian malaria: Asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. Acta Trop, 2011.

de Andrade-Neto V, Goulart M, da Silva Filho J, da Silva M, Pinto MC, Pinto A, Zalis M, Carvalho L, Krettli AU. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, beta-lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum in vitro* and *Plasmodium berghei in vivo*. Bioorg Med Chem Lett, 2004; 14: 1145-9.

de Camargo MV, Consoli RA, Williams P, Krettli AU. Factors influencing the development of *Plasmodium gallinaceum* in *Aedes fluviatilis*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1983; 78: 83-94.

de Ridder S, van der Kooy F, Verpoorte R. *Artemisia annua* as a self-reliant treatment for malaria in developing countries. J Ethnopharmacol, 2008; 120: 302-14.

de Santana Filho FS, Arcanjo AR, Chehuan YM, Costa MR, Martinez-Espinosa FE, Vieira JL, Barbosa MG, Alecrim WD, Alecrim MG. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. Emerg Infect Dis, 2007; 13: 1125-6.

Dembele L, Gego A, Zeeman AM, Franetich JF, Silvie O, Rametti A, et al. Towards an *in vitro* model of *Plasmodium* hypnozoites suitable for drug discovery. PLoS One, 2011; 6: e18162.

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: 271-7.

Derbyshire ER, Mota MM, Clardy J. The next opportunity in anti-malaria drug discovery: the liver stage. *PLoS Pathog*, 2011; 7: e1002178.

Desjardins R, Canfield C, Haynes J, Chulay J. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother*, 1979; 16: 710-8.

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: 23-9.

Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyto AP, Tarning J, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*, 2011; 361: 455-67.

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

Duarte EC, Pang L, Fontes CJ. Internal validity of clinical trials for *Plasmodium vivax* malaria treatment: analysis of evaluation study of *in vivo Plasmodium vivax* emergence of resistance to standard doses of primaquine. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2003; 36: 383-6.

Duarte EC, Pang LW, Ribeiro LC, Fontes CJ. Association of subtherapeutic dosages of a standard drug regimen with failures in preventing relapses of *vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 2001; 65: 471-6.

Dutta GP, Puri SK, Bhaduri AP, Seth M. Radical curative activity of a new 8-aminoquinoline derivative (CDRI 80/53) against *Plasmodium cynomolgi* B in monkeys. *Am J Trop Med Hyg*, 1989; 41: 635-7.

Fotakis G, Timbrell JA. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett*, 2006; 160: 171-7.

Frevert U, Späth GF, Yee H. Exoerythrocytic development of *Plasmodium gallinaceum* in the White Leghorn chicken. *Int J Parasitol*, 2008; 38: 655-72.

Gaur D, Mayer DC, Miller LH. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *Int J Parasitol*, 2004; 34: 1413-29.

Ghosh A, Edwards MJ, Jacobs-Lorena M. The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century. *Parasitol Today*, 2000; 16: 196-201.

Gomes CRB, Moreth M, Fachinetti V, de Souza MVN, Vellasco Junior WT, Lourenço MCS, Cunico W. Synthesis and antimycobacterial activity of 2-aryl-3-(arylmethyl)-1,3-thiazolidin-4-ones, *Lett Drug Des Discov*, 2010; 7: 353-358.

Good MF. Our impasse in developing a malaria vaccine. *Cell Mol Life Sci*, 2011; 68: 1105-13.

Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SH, Alonso PL, Collins FH, Duffy PE. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest*, 2008; 118: 1266-76.

Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, Franke-Fayard B, Janse CJ, Ménard R, Amino R. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010; 107: 18640-5.

Gupta L, Kumar S, Han YS, Pimenta PF, Barillas-Mury C. Midgut epithelial responses of different mosquito-*Plasmodium* combinations: the actin cone zipper repair mechanism in *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005; 102: 4010-5.

Guttery DS, Holder AA, Tewari R. Sexual development in *Plasmodium*: lessons from functional analyses. *PLoS Pathog*, 2012; 8: e1002404.

Gwadz RW, Koontz LC, Miller LH, Davidson DE. *Plasmodium gallinaceum*: avian screen for drugs with radical curative properties. *Exp Parasitol*, 1983; 55: 188-96.

Han YS, Thompson J, Kafatos FC, Barillas-Mury C. Molecular interactions between *Anopheles stephensi* midgut cells and *Plasmodium berghei*: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes. *EMBO J*, 2000; 19: 6030-40.

Hay S, Guerra C, Gething P, Patil A, Tatem A, Noor A, Kabaria C, Manh B, Elyazar I, Brooker S, Smith D, Moyeed R, Snow R. A world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2007. *PLoS Med*, 2009; 6: e1000048.

Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis*, 2004; 4: 327-36.

Herrera S, Perlaza BL, Bonelo A, Arévalo-Herrera M. *Aotus* monkeys: their great value for anti-malaria vaccines and drug testing. *Int J Parasitol*, 2002; 32: 1625-35.

Hill DR, Baird JK, Parise ME, Lewis LS, Ryan ET, Magill AJ. Primaquine: report from CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis I. *Am J Trop Med Hyg*, 2006; 75: 402-15.

Hotta CT, Gazarini ML, Beraldo FH, Varotti FP, Lopes C, Markus RP, Pozzan T, Garcia CR. Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites. *Nat Cell Biol*, 2000; 2: 466-8.

Huff CC, Coulston F. The developmental of *Plasmodium gallinaceum* from sporozoite to erythrocytic trophozoite. *J Infect Dis*, 1944; 75(3): 231-49.

Hulden L, Hulden L. Activation of the hypnozoite: a part of *Plasmodium vivax* life cycle and survival. *Malar J*, 2011; 10: 90.

Imwong M, Snounou G, Pukrittayakamee S, Tanomsing N, Kim JR, Nandy A, Guthmann JP, Nosten F, Carlton J, Looareesuwan S, Nair S, Sudimack D, Day NP, Anderson TJ, White NJ. Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually result from activation of heterologous hypnozoites. *J Infect Dis*, 2007; 195: 927-33.

Ko CH, Li K, Li CL, Ng PC, Fung KP, James AE, Wong RP, Gu GJ, Fok TF. Development of a novel mouse model of severe glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficiency for *in vitro* and *in vivo* assessment of hemolytic toxicity to red blood cells. *Blood Cells Mol Dis*, 2011; 47: 176-81.

Kochar DK, Das A, Kochar SK, Saxena V, Sirohi P, Garg S, Kochar A, Khatri MP, Gupta V. Severe *Plasmodium vivax* malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India. *Am J Trop Med Hyg*, 2009; 80: 194-8.

Krettli AU. Antimalarial drug discovery screening of Brazilian medicinal plants and purified compounds. *Expert Opin Drug Discov*, 2009b; 4 (2): 95-108.

Krettli AU. The Immune Response To Malaria Sporozoite Antigens In Animal Models And Humans: A Retrospective Overview And Present Goals. *Cienc Cult*, 1994; 46 (5/6): 446-54.

Krettli AU, Adebayo J, Krettli L. Testing of natural products and synthetic molecules aiming at new antimalarials. *Curr Drug Targets*, 2009a; 10: 261-70.

Krettli AU, Dantas LA. Which routes do *Plasmodium* sporozoites use for successful infections of vertebrates? *Infect Immun*, 2000; 68: 3064-5.

Krettli AU, Miller LH. Malaria: a sporozoite runs through it. *Curr Biol*, 2001; 11: R409-12.

Krotoski WA, Collins WE, Bray RS, Garnham PC, Cogswell FB, Gwadz RW, Killick-Kendrick R, Wolf R, Sinden R, Koontz LC, Stanfill PS. Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. *Am J Trop Med Hyg*, 1982a; 31: 1291-3.

Krotoski WA, Garnham PC, Bray RS, Krotoski DM, Killick-Kendrick R, Draper CC, Targett GA, Guy MW. Observations on early and late post-sporozoite tissue stages in primate malaria. I. Discovery of a new latent form of *Plasmodium cynomolgi* (the hypnozoite), and failure to detect hepatic forms within the first 24 hours after infection. *Am J Trop Med Hyg*, 1982b; 31: 24-35.

Ku MJ, Dossin FM, Choi Y, Moraes CB, Ryu J, Song R, Freitas-Junior LH. Quantum dots: a new tool for anti-malarial drug assays. *Malar J*, 2011; 10: 118.

Lambros C, Vanderberg J. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*, 1979; 65: 418-20.

Li XQ, Björkman A, Andersson TB, Gustafsson LL, Masimirembwa CM. 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*, 2003; 59: 429-42.

Li Y, Wu LY. An over four millennium story behind qinghaosu (artemisinin)--a fantastic antimalarial drug from a traditional chinese herb. *Curr Med Chem*, 2003; 10: 2197-230.

Liu X, Wang X, Li Q, Kozar MP, Melendez V, O'Neil MT, Lin AJ. Synthesis and antimalarial activity of 2-guanidino-4-oxoimidazoline derivatives. *J Med Chem*, 2011; 54: 4523-35.

Lucantoni L, Yerbanga RS, Lupidi G, Pasqualini L, Esposito F, Habluetzel A. Transmission blocking activity of a standardized neem (*Azadirachta indica*) seed extract on the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* in its vector *Anopheles stephensi*. *Malar J*, 2010; 9: 66.

Mata G, do Rosário VE, Iley J, Constantino L, Moreira R. A carbamate-based approach to primaquine prodrugs: Antimalarial activity, chemical stability and enzymatic activation. *Bioorg Med Chem*, 2012; 20: 886-92.

Mazier D, Rénia L, Snounou G. A pre-emptive strike against malaria's stealthy hepatic forms. *Nat Rev Drug Discov*, 2009; 8: 854-64.

Meis JF, Wismans PG, Jap PH, Lensen AH, Ponnudurai T. A scanning electron microscopic study of the sporogonic development of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles stephensi*. *Acta Trop*, 1992; 50: 227-36.

Miller S. Pilot Human Study of Tinidazole Efficacy For Radical Cure Of *Plasmodium vivax*. Bethesda: U.S. National Institutes of Health (NIH); 17 dez 2008. Atualizada em: 7 julho

2009. Acesso em 5 fev 2012. Disponível em:
<<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00811096>>

Morel CM, Acharya T, Broun D, Dangi A, Elias C, Ganguly NK, et al. Health innovation networks to help developing countries address neglected diseases. *Science*, 2005; 309: 401-4.

Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Rodríguez A. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science*, 2001; 291: 141-4.

Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, del Portillo HA. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis*, 2009; 9: 555-66.

Natarajan R, Thathy V, Mota MM, Hafalla JC, Ménard R, Vernick KD. Fluorescent *Plasmodium berghei* sporozoites and pre-erythrocytic stages: a new tool to study mosquito and mammalian host interactions with malaria parasites. *Cell Microbiol*, 2001; 3: 371-9.

Neuenfeldt PD, Drawanz BB, Aguiar ACC, Figueiredo F, Krettli AU, Cunico, W. Multicomponent synthesis of new primaquine thiazolidinone derivatives. *Synthesis*, 2011; 23: 3866-70.

Noedl H, Wongsrichanalai C, Miller R, Myint K, Looareesuwan S, Sukthana Y, Wongchotigul V, Kollaritsch H, Wiedermann G, Wernsdorfer W. *Plasmodium falciparum*: effect of anti-malarial drugs on the production and secretion characteristics of histidine-rich protein II. *Exp Parasitol*, 2002; 102: 157-63.

Oduola AM, Weatherly NF, Bowdre JH, Desjardins RE. *Plasmodium falciparum*: cloning by single-erythrocyte micromanipulation and heterogeneity *in vitro*. *Exp Parasitol*, 1988; 66: 86-95.

Oliveira DR, Costa ALMA, Leitão GG, Castro NG, Santos JP, Leitão SG. Ethnopharmacology Study of Saracuramirá (*Ampelozizyphus amazonicus* Ducke) in the "Quilombola" communities of Oriximiná, Pará State, Brazil. *Acta Amaz*. In press 2011.

Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J*, 2010; 9: 115.

Parija SC, Praharaj I. Drug resistance in malaria. *Indian J Med Microbiol*, 2011; 29: 243-8.

Paraense WL. Aspectos parasitários observados no local inoculado com esporozoítos de *Plasmodium gallinaceum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1943; 38 (3):353-9.

Penna-Coutinho J, Cortopassi WA, Oliveira AA, França TC, Krettli AU. Antimalarial activity of potential inhibitors of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase enzyme selected by docking studies. *PLoS One*, 2011; 6: e21237.

Pereira EA, Ishikawa EA, Fontes CJ. Adherence to *Plasmodium vivax* malaria treatment in the Brazilian Amazon Region. *Malar J*, 2011; 13 (10): 355.

Peters W. Drug resistance in *Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948. I. Chloroquine resistance. *Exp Parasitol*, 1965; 17: 80-9.

Pukrittayakamee S, Vanijanonta S, Chantira A, Clemens R, White NJ. Blood stage antimalarial efficacy of primaquine in *Plasmodium vivax* malaria. *J Infect Dis*, 1994; 169: 932-5.

Puri SK, Dutta GP. *Plasmodium cynomolgi*: gametocytocidal activity of the anti-malarial compound CDRI 80/53 (elubaquine) in rhesus monkeys. *Exp Parasitol*, 2005; 111: 8-13.

Puri SK, Srivastava R, Pandey VC, Sethi N, Dutta GP. Methemoglobin toxicity and hematological studies on malaria anti-relapse compound CDRI 80/53 in dogs. *Am J Trop Med Hyg*, 1989; 41: 638-42.

Rathore D, McCutchan TF, Sullivan M, Kumar S. Antimalarial drugs: current status and new developments. *Expert Opin Investig Drugs*, 2005; 14: 871-83.

Ravichandran V, Prashantha Kumar BR, Sankar S, Agrawal RK. Predicting anti-HIV activity of 1,3,4-thiazolidinone derivatives: 3D-QSAR approach. *Eur J Med Chem*, 2009; 44: 1180-7.

Richter J, Franken G, Mehlhorn H, Labisch A, Häussinger D. What is the evidence for the existence of *Plasmodium ovale* hypnozoites? Parasitol Res, 2010; 107: 1285-90.

Ridley RG. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. Nature, 2002; 415: 686-93.

Rieckmann KH, Davis DR, Hutton DC. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? Lancet, 1989; 2: 1183-4.

Rodrigues T, Prudêncio M, Moreira R, Mota MM, Lopes F. Targeting the Liver Stage of Malaria Parasites: A Yet Unmet Goal. J Med Chem, 2011.

Rosenberg R, Rungsiwongse J. The number of sporozoites produced by individual malaria oocysts. Am J Trop Med Hyg, 1991; 45: 574-7.

Rosenthal PJ. Antimalarial drug discovery: old and new approaches. J Exp Biol, 2003; 206: 3735-44.

Rosenthal PJ, Miller LH. The need for new approaches to antimalarial chemotherapy. In Rosenthal PJ, editors. Antimalarial chemotherapy: mechanisms of action, resistance, and new directions in drug discovery. Totowa: Humana Press; 2001. P. 3-13.

Sachs J, Malaney P. The economic and social burden of malaria. Nature, 2002; 415: 680-5.

Sattabongkot J, Tsuboi T, Zollner GE, Sirichaisinthop J, Cui L. *Plasmodium vivax* transmission: chances for control? Trends Parasitol, 2004; 20: 192-8.

Schall JJ. Virulence of lizard malaria: the evolutionary ecology of an ancient parasite-host association. Parasitology, 1990; 100: 35-52.

Schmidt LH. Relationships between chemical structures of 8-aminoquinolines and their capacities for radical cure of infections with *Plasmodium cynomolgi* in rhesus monkeys. Antimicrob Agents Chemother, 1983; 24:615-52.

Schmidt LH, Fradkin CS, Genter RN, Rossan W, Squires HB, Hughes. *Plasmodium cynomolgi* infections in the rhesus monkey. Am J Trop Med Hyg, 1982; 31: 609-703.

Schmidt LH, Rossan RN, Fradkin R, Woods J, Schulemann W, Kratz L. Studies on the antimalarial activity of 1,2-dimethoxy-4-(bis-diethylaminoethyl)-amino-5-bromobenzene. Bull World Health Org, 1966; 34: 783-88.

Schwartz L, Brown GV, Genton B, Moorthy VS. A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. Malar J, 2012; 11: 11.

Shahabuddin M, Pimenta PF. *Plasmodium gallinaceum* preferentially invades vesicular ATPase-expressing cells in *Aedes aegypti* midgut. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998; 95: 3385-9.

Sharma A, Kumar V, Jain S, Sharma PC. Thiazolidin-4-one and hydrazone derivatives of capric acid as possible anti-inflammatory, analgesic and hydrogen peroxide-scavenging agents. J Enzyme Inhib Med Chem, 2011; 26:546-52.

Shekalaghe SA, Braak R, Daou M, Kavishe R W, van den Bijllaardt S, van den Bosch JB et al. In Tanzania, hemolysis after a single dose of primaquine coadministered with an artemisinin is not restricted to glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient (G6PD A-) individuals. Antimicrob Agents Chemother, 2010; 54:1762-8.

Shiraki H, Kozar MP, Melendez V, Hudson TH, Ohrt C, Magill AJ et al. Antimalarial activity of novel 5-aryl-8-aminoquinoline derivatives. J Med Chem, 2011; 54: 131-42.

Singh AP, Zhang Y, No JH, Docampo R, Nussenzweig V, Oldfield E. Lipophilic bisphosphonates are potent inhibitors of *Plasmodium* liver-stage growth. Antimicrob Agents Chemother, 2010; 54, 2987-93.

Soh PN, Benoit-Vical F. Are West African plants a source of future antimalarial drugs? J Ethnopharmacol, 2007; 114:130-40.

Solarte Y, Manzano MR, Rocha L, Hurtado H, James MA, Arévalo-Herrera M, Herrera S. *Plasmodium vivax* sporozoite production in *Anopheles albimanus* mosquitoes for vaccine clinical trials. *Am J Trop Med Hyg*, 2011; 84(2 Suppl):28-34.

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; 50:394-8.

Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*, 2006; 313:1287-90.

Sweeney AW. Wartime research on malaria chemotherapy. *Parassitologia*, 2000; 42:33-45.

Tarun AS, Baer K, Dumpit RF, Gray S, Lejarcegui N, Frevert U, Kappe SH. Quantitative isolation and in vivo imaging of malaria parasite liver stages. *Int J Parasitol*, 2006; 36(12):1283-93.

Tasón de Camargo M, Krettli AU. *Aedes fluviatilis* (Lutz), a new experimental host for *Plasmodium gallinaceum* brumpt. *J Parasitol*, 1978; 64:924-5.

Terzian LA. A Method for Screening Antimalarial Compounds in the Mosquito Host. *Science*, 1947 106:449-50.

Terzian LA, Stahler N, Weathersby AB. The action of antimalarial drugs in mosquitoes infected with *Plasmodium gallinaceum*. *J Infect Dis*, 1949; 84:47-55.

The malERA Consultative Group on Drugs. A research agenda for malaria eradication: drugs. *PLoS Med*, 2011; 8(1): e1000402.

Tilley L, Loria P, Foley M. Chloroquine and other quinoline antimalarials. In Rosenthal PJ, editors. *Antimalarial chemotherapy: mechanisms of action, resistance, and new directions in drug discovery*. Totowa: Humana Press; 2001. P. 87-122.

Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, et al. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. PLoS Med, 2008; 5: e128.

Tonmunphean S, Kokpol S, Parasuk V, Wolschann P, Winger RH, Liedl KR et al. Comparative molecular field analysis of artemisinin derivatives: ab initio versus semiempirical optimized structures. J Comput Aided Mol Des, 1998; 12:397-409.

Touray MG, Warburg A, Laughinghouse A, Krettli AU, Miller LH. Developmentally regulated infectivity of malaria sporozoites for mosquito salivary glands and the vertebrate host. J Exp Med, 1992; 175:1607-12.

Trager W, Jensen J. Human malaria parasites in continuous culture. Science, 1976; 193:673-5.

Vale N, Moreira R, Gomes P. Primaquine revisited six decades after its discovery. Eur J Med Chem, 2009; 44:937-53.

Valecha N, Adak T, Bagga AT, Asthana OP, Srivastava P, Joshi, H, Sharma, VP, Comparative antirelapse efficacy of CDRI compound 80/53 (Bulaquine) vs. primaquine in double blind clinical trial. Curr Sci, 2001; 80: 561-563.

Vanderberg JP, Frevort U. Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilisation of *Plasmodium berghei* sporozoites injected into skin by mosquitoes. Int J Parasitol, 2004; 34: 991-6.

Vaughan JA, Noden BH, Beier JC. Population dynamics of *Plasmodium falciparum* sporogony in laboratory-infected *Anopheles gambiae*. J Parasitol, 1992; 78:716-24.

Vincke IH, Lips MAH. Un nouveau plasmodium d'un rongeur sauvage du Congon, *Plasmodium berghei* n sp. Ann Soc Belge Méd Trop, 1948; 28: 97-104.

Vlachou D, Schlegelmilch T, Runn E, Mendes A, Kafatos FC. The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. Curr Opin Genet Dev, 2006; 16:

384-91.

Walsh DS, Eamsila C, Sasiprapha T, Sangkharomya S, Khaewsathien P, Supakalin P, et al. Efficacy of monthly tafenoquine for prophylaxis of *Plasmodium vivax* and multidrug-resistant *P. falciparum* malaria. *J Infect Dis*, 2004; 190:1456-63.

Walsh DS, Looareesuwan S, Wilairatana P, Heppner DG, Tang DB, Brewer TG, et al. Randomized dose-ranging study of the safety and efficacy of WR 238605 (Tafenoquine) in the prevention of relapse of *Plasmodium vivax* malaria in Thailand. *J Infect Dis*, 1999; 180: 1282-7.

Warburg A, Touray M, Krettli AU, Miller LH. *Plasmodium gallinaceum*: antibodies to circumsporozoite protein prevent sporozoites from invading the salivary glands of *Aedes aegypti*. *Exp Parasitol*, 1992; 75: 303-7.

Wells TN, Burrows JN, Baird JK. Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. *Trends Parasitol*, 2010; 26: 145-51.

White NJ. A vaccine for malaria. *N Engl J Med*, 2011a; 365:1926-7.

White NJ. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J*, 2011b; 10:297.

World Health Organization. World Malaria Report 2010. Geneva: WHO, 2010a. 137 p. ISBN 978 92 415641061. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564106_eng.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2012.

World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria -- 2nd edition. Geneva: WHO, 2010b. 188 p. ISBN 9789241547925. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547925_eng.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2012.

World Health Organization. World Malaria Report 2011. Geneva: WHO, 2011. 183 p. ISBN 9789241564403. Disponível em: <
http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/9789241564403_eng.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2012.

Zalis MG, Pang L, Silveira MS, Milhous WK, Wirth DF. Characterization of *Plasmodium falciparum* isolated from the Amazon region of Brazil: evidence for quinine resistance. Am J Trop Med Hyg, 1998; 58:630-7.

Zapata JC, Perlaza BL, Hurtado S, Quintero GE, Jurado D, González I, et al. Reproducible infection of intact *Aotus lemurinus griseimembra* monkeys by *Plasmodium falciparum* sporozoite inoculation. J Parasitol, 2002; 88:723-9.

Zhang L, Sathunuru R, Caridha D, Pybus B, O'Neil MT, Kozar MP et al. Antimalarial activities of new guanidylimidazole and guanidylimidazoline derivatives. J Med Chem, 2011a; 54:6634-46.

Zhang L, Sathunuru R, Luong T, Melendez V, Kozar MP, Lin AJ. New imidazolidinedione derivatives as antimalarial agents. Bioorg Med Chem, 2011b; 19:1541-9.