

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Farmacologia Bioquímica e Molecular

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E
ANTIMALÁRICA DE ANÁLOGOS DA CLOROQUINA

Anna Caroline Campos Aguiar

Belo Horizonte
Julho/ 2011

Anna Caroline Campos Aguiar

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIMALÁRICA DE ANÁLOGOS DA CLOROQUINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia Bioquímica e Molecular.

Orientadora: Professora Dra. Antoniana Ursine Krettli

Belo Horizonte

Julho/ 2011

Dedico este trabalho à minha família e ao
Pedro, pessoas fundamentais em minha vida.
Sem vocês nada disso seria possível!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre iluminar os meus caminhos e por ser fonte de paz em minha vida.

À querida professora Antoniana, pela excelente formação, não somente como futuros pesquisadores, mas também como pessoas. O amor com que a senhora realiza o seu trabalho e a sua paixão com a pesquisa é algo admirável e que nos motiva sempre. É um grande prazer trabalhar com a senhora e desfrutar do seu conhecimento ímpar.

À minha mãe e as queridas avós Inês (*in memorian*) e Irene, por cuidarem de mim com tanto amor e por serem o meu porto seguro. Sem vocês nada disso seria possível.

À família, fonte inesgotável de amor e paz, em especial ao meu irmão, as minhas tias e tios, e as minhas “priminhas”. Ver como vocês vibram com as minhas conquistas é muito bom. Amo vocês.

Ao Pedro, meu amor, essa conquista é tão minha quanto sua. Obrigado por tudo, por ser o meu melhor amigo, por entender todos os momentos de ausência, por admirar o meu trabalho, por se envolver tanto em tudo o que eu faço.

À minha “segunda família”, obrigado por me tratarem como filha, obrigada por me apoiarem sempre. Fazer parte de uma família tão especial é muito importante para mim.

À Clari, por ter aberto as portas da realização de um sonho, por ser sempre tão prestativa e carinhosa.

Aos amigos de faculdade e às amigas de infância, obrigada pela amizade de vocês e por fazerem a vida ser sempre tão alegre.

À Dra Isabela Cerávolo, obrigada por toda a sua dedicação, por ser sempre tão disposta e por todo o seu carinho. Você é muito especial para mim!

À Dra Eliana Rocha, obrigada por ter vindo fazer parte do nosso grupo e nos acrescentar com o seu conhecimento. Tenho certeza que ainda vou aprender muito com você.

Aos grandes amigos que eu conquistei durante esse período no laboratório, obrigada por serem tão prestativos e de uma convivência super agradável.

Ao Geraldo, por ser peça fundamental no nosso trabalho e por nos ajudar sempre com tanta boa vontade.

Às meninas da *In vitro* cells e a Professora Miriam Chaves, pelos grandes ensinamentos durante a minha iniciação científica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular, em especial ao Professor Luiz Armando.

Ao Professor Mário Meneghetti e a sua equipe de laboratório pela produção dos análogos da cloroquina.

Ao Professor Marcus Fernandes da Universidade Federal do Rio de Janeiro e a sua aluna Juliana, pelos ensinamentos e por me receberem tão bem em seu laboratório.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto e concessão da bolsa.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A malária no Brasil	2
1.2. Ciclo biológico dos parasitos da malária	2
1.3. Quimioterapia antimalárica.....	3
1.4. Mecanismos para a sobrevivência do parasito e atuação da cloroquina.....	6
2. JUSTIFICATIVA	9
3. OBJETIVOS	10
3.1. Objetivo Geral.....	10
3.2. Objetivos Específicos	10
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
4.1. Obtenção dos análogos metálicos da cloroquina	11
4.2. Solubilização dos compostos para testes de atividade biológica	11
4.3. Testes antimaláricos <i>in vitro</i> contra o <i>P. falciparum</i>	11
4.3.1. Cultivo contínuo da fase eritrocítica do parasito	11
4.3.2. Sincronização dos parasitos para utilização nos testes <i>in vitro</i>	12
4.3.3. Preparo das placas para os ensaios de quimioterapia	12
4.3.4. Teste de incorporação de hipoxantina tritiada.....	13
4.3.5. Teste imunoenzimático anti-HRP II.....	14
4.3.6. Determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento do parasito (IC ₅₀)	15
4.4. Ensaios <i>in vitro</i> de citotoxicidade	15
4.4.1. Cultivo de linhagens celulares.....	15
4.4.2. Preparo das placas	15
4.4.3. Ensaio de citotoxicidade utilizando o MTT	16
4.4.4. Ensaio de citotoxicidade utilizando o Vermelho Neutro	16
4.4.5. Índice de Seletividade	17

4.5.	Ensaio de hemólise	17
4.6.	Teste de inibição da formação de hemozoína	17
4.7.	Testes antimaláricos <i>in vivo</i> contra o <i>P. berghei</i>	18
4.7.1.	Comitê de ética para uso de animais	18
4.7.2.	Teste esquizotocida sanguíneo <i>in vivo</i> com <i>P. berghei</i>	18
4.7.3.	Determinação da parasitemia	19
4.8.	Modelo molecular de docking	19
4.9.	Análise estatística	19
5.	RESULTADOS	21
5.1.	Atividade antiplasmodial de análogos da cloroquina	21
5.2.	Atividade citotóxica de análogos da cloroquina	23
5.3.	Análise do Índice de seletividade	24
5.4.	Avaliação da atividade hemolítica de análogos da cloroquina	26
5.5.	Teste supressivo <i>in vivo</i> de análogos da cloroquina contra o <i>P. berghei</i>	26
5.6.	Avaliação da inibição da formação de hemozoína de análogos da cloroquina	28
5.7.	Estudo molecular de <i>docking</i>	31
6.	DISCUSSÃO	34
7.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	40
8.	REFERÊNCIAS	41

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura da quinina, um alcaloide presente nas plantas *Cinchona calisaya* e *C. succirubra*, e de antimaláricos sintetizados a partir do seu anel quinolínico.....05
- Figura 2.** Mecanismos de toxicidade do heme livre no *Plasmodium* sp.....08
- Figura 3.** Comparação entre os valores de IC₅₀ dos análogos da cloroquina em dois métodos distintos, HRPII (círculo) e Hipoxantina (quadrado), sendo significativas as diferenças representadas por asterisco ($p \leq 0,05$).....22
- Figura 4.** Dispersão dos valores de MDL₅₀ dos sete análogos da cloroquina nas duas linhagens celulares, BGM (círculo) e HepG2 (quadrado).....24
- Figura 5.** Parasitemia média em camundongos infectados pelo *P. berghei* (cepa NK65) tratados com análogos da cloroquina e com cloroquina, avaliada em diferentes dias após a infecção.....28
- Figura 6.** Inibição da formação de hemozoína pela cloroquina, utilizada como controle (H) e por seus análogos DETA (A), DETA Pt (C) , DETA Fe (E) , DETA Pd (G), DMA (B) , DMA Pt (D), DMA Fe (F).....30
- Figura 7.** Estrutura química da cloroquina e dos análogos da cloroquina na forma protonada.....31
- Figura 8.** Compostos ancorados à hematina dimérica sendo eles: (A) Cloroquina protonada, (B) DETA-1, (C) DETA-2, (D) DETA-3, (E) DMA-1 e (F) DMA.....33
- Figura 9.** Estrutura da ferroquina.....36
- Figura 10.** Ligação do complexo cloroquina-heme na enzima lactato desidrogenase.....39

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Atividade anti-*P. falciparum* (clone W2 cloroquina-resistente) de análogos da cloroquina, utilizando os ensaios imunoenzimático anti-HRP II e de hipoxantina.....22
- Tabela 2** - Atividade citotóxica de análogos da cloroquina utilizando o ensaio de MTT e vermelho neutro nas duas linhagens celulares, HepG2 e BGM.....23
- Tabela 3** - Índice de Seletividade dos análogos da cloroquina em diferentes ensaios de viabilidade celular nas linhagens celulares estudadas (HepG2 e BGM), calculados em relação ao ensaio de atividade antiplasmodial de hipoxantina.....25
- Tabela 4** - Índice de Seletividade dos análogos da cloroquina em diferentes ensaios de viabilidade celular nas linhagens celulares estudadas (HepG2 e BGM), calculados em relação ao ensaio de atividade antiplasmodial anti-HRP II.....26
- Tabela 5** - Atividade antimalárica *in vivo* de análogos da cloroquina e da cloroquina em camundongos infectados com o *Plasmodium berghei*.....27
- Tabela 6** - Energia de ancoramento entre os análogos da cloroquina e a hematina dimérica.....32

LISTA DE ABREVIATURAS

ACT – *Artemisinin-based combination therapy*

BGM – Linhagem celular de macaco verde Africano

CPqRR – Centro de Pesquisas René Rachou

CQ – cloroquina

DALYs – *Disability-adjusted life years*

DMSO – Dimetilsulfóxido

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

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%

rpm – Rotação por minuto

ROS – *Reactive Oxygen species*

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

SBF – Soro Bovino Fetal

SVS – Secretaria de Vigilância Sanitária

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

VD – Vacúolo digestivo

RESUMO

A malária humana, segundo a Organização Mundial da Saúde, é a doença parasitária mais importante e um dos maiores problemas de saúde pública do mundo. Seu controle é dificultado devido à resistência dos mosquitos aos inseticidas, à falta de uma vacina eficaz e, sobretudo, ao surgimento e disseminação de parasitos resistentes à maior parte dos fármacos disponíveis. O tratamento medicamentoso específico da malária permanece como principal estratégia na redução da morbidade e da mortalidade atribuídas à doença. No presente estudo, análogos da cloroquina e seus derivados metálicos foram avaliados, considerando que associar moléculas a metais parece uma estratégia promissora na busca de novos antimaláricos. Sete novos análogos da cloroquina foram avaliados quanto à: (i) sua atividade *in vitro* contra *P. falciparum*; (ii) sua toxicidade em duas linhagens celulares (hepatoma humano e célula renal de macaco) e contra hemácias humanas; (iii) sua atividade *in vivo* contra *P. berghei*; (iv) sua interação com a hematina dimérica (hemozoína sintética) *in vitro* e; (v) sua interação com a hematina dimérica no modelo molecular de *docking*. Todos os análogos da cloroquina apresentaram intensa atividade *in vitro* anti- *P. falciparum* (IC₅₀ entre 0,04 e 0,55nM) nos ensaios de HRPII e de hipoxantina. Alguns dos análogos foram mais ativos que a cloroquina e sem efeito citotóxico nas duas linhagens celulares avaliadas. Além disso, os compostos estudados não causaram hemólise de hemácias humanas normais. Os análogos da cloroquina atuaram inibindo a polimerização do heme, assim como atua a cloroquina. Dois dos compostos testados *in vivo* contra *P. berghei* foram também ativos causando intensa redução da parasitemia. Em conclusão, os análogos da cloroquina são moléculas promissoras, com atividade antimalárica e atuam em um alvo crucial para a sobrevivência do parasito, através da inibição da formação de hemozoína.

ABSTRACT

Human malaria, according to World Health Organization (WHO), remains the most important parasitic disease and a major public health problem. Their control remains difficult due to resistance of mosquitoes to insecticides, the lack of an effective vaccine, and, especially, the emergency and spread of resistant parasites to most available antimalarial drugs. The specific drug treatment remains a major strategy to reduce morbidity and mortality due to malaria. In this study, chloroquine-analogues in complex with metals were evaluated considering that such association to be believed to represent a promising strategy in the search for new drugs. Seven new analogues were evaluated: (i) *in vitro* for their activity against *P. falciparum*; (ii) for their toxicity against human erythrocytes and two cell lines, HepG2 (hepatoma) and BGM (a monkey basal kidney cells); (iii) *in vivo* against *P. berghei*; (iv) for possible interactions between the analogous and dimeric hemozoin *in vitro*; and, (v) through a molecular docking model, targeting the dimeric hemozoin. All chloroquine analogs showed intense *in vitro* anti-*P. falciparum* activity (IC_{50} between 0.04 and 0.55 nM) as measured in an immunoenzymatic test using monoclonals to a parasite histidine rich protein (HRPII) and through radiotopic hypoxanthine incorporation. Some of these analogues were more active than chloroquine and none of them were cytotoxic to HepG2 and BGM cells or caused haemolysis to normal human erythrocytes. Like chloroquine, the chloroquine analogs inhibited hemozoin polymerization in the *in vitro* as well as in the docking test. In addition, two of the compounds tested against *P. berghei* in experimentally infected mice caused a significant reduction of parasitemia. Taken together, the analogues evaluated in this study represent promising molecules and act on a crucial point for the parasite, by inhibition of hemozoin formation.

1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, e continua sendo um dos principais problemas de saúde do mundo. A doença ocorre em 109 países, sendo endêmica nas regiões tropicais e subtropicais da África, sudeste asiático e América Latina (WHO, 2010).

Metade da população mundial (3,3 bilhões de pessoas) está exposta à transmissão da malária em áreas de risco (Hay *et al.*, 2009). No ano de 2009 foram registrados no mundo 500 milhões de casos e 800.000 óbitos (WHO, 2010). Este número alarmante se deve principalmente a resistência dos parasitos aos antimaláricos disponíveis (Dondorp *et al.*, 2009; Enserink, 2010), a resistência dos mosquitos aos inseticidas (Hanafi-Bojd *et al.*, 2011) e a falta de política econômica e social para o controle e prevenção da doença.

Até o ano de 2008, quatro espécies de protozoários causadores da malária humana haviam sido descritas, *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*. Recentemente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu o *P. knowlesi*, anteriormente considerado infectante somente para primatas não-humanos em países do sudeste da Ásia, como a quinta espécie de plasmódio causadora da malária em seres humanos (Cox-Singh e Singh, 2008; Cox-Singh *et al.*, 2010).

Dentre as duas principais espécies causadoras da malária humana, o *P. falciparum* foi por muito tempo considerado o responsável por causar a febre terçã maligna, enquanto o *P. vivax* causava apenas a febre terçã benigna. No entanto, vários casos de malária grave ocasionada por *P. vivax* tem sido descritos (Genton *et al.*, 2008; Poespoprodjo *et al.*, 2009) e parecem estar relacionados à multi-resistência a medicamentos (Tjitra *et al.*, 2008).

Segundo a OMS, em 2001 a malária foi classificada como a oitava causa da pobreza no mundo, responsável pela perda de anos de vida ajustado por incapacidade (“disability-adjusted life years” - DALY’s), comprometendo o desenvolvimento de países com alta transmissão (Gallup e Sachs, 2001).

1.1. A malária no Brasil

Aproximadamente 99% dos casos de malária no Brasil ocorrem na Amazônia Legal, que compreende os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Três espécies de plasmódio são responsáveis pelos casos de malária humana no Brasil: *P. falciparum*, *P. vivax*, e *P. malariae* (Secretaria de Vigilância Sanitária - SVS, 2009).

No ano de 2008 foram registrados 315.823 mil casos de malária, sendo 83% causados pelo *P. vivax*, 15% *P. falciparum*, 1% por infecções mistas e 0,02% por *P. malariae*. (Secretaria de Vigilância Sanitária - SVS, 2008). Na região extra-amazônica, mais de 80% dos casos registrados no Brasil são importados da área endêmica e do continente africano (MS, 2010).

As principais medidas de controle da doença são baseadas na proteção individual contra a picada do mosquito vetor com o uso de repelentes e mosquiteiros, diagnóstico específico e tratamento imediato com antimaláricos, e através de atividades de saneamento ambiental para controle do vetor (Secretaria de Vigilância Sanitária - SVS, 2009).

No ano de 2000 foi implantado no Brasil o “Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal”. Essa estratégia teve como objetivo priorizar a consolidação de redes de serviços capazes de ofertar diagnóstico precoce e um tratamento adequado imediato, (Tauil, 2006).

1.2. Ciclo biológico dos parasitos da malária

O ciclo de vida dos plasmódios compreende dois hospedeiros, o inseto vetor (fêmeas do mosquito *Anopheles* sp) onde ocorre à reprodução sexuada do parasito, e o hospedeiro vertebrado, no qual ocorre a reprodução assexuada.

A transmissão ao hospedeiro vertebrado inicia-se quando o inseto vetor, durante o repasto sanguíneo, inocula o parasito na forma evolutiva de esporozoítos na epiderme do hospedeiro. Krettli e Miller (2001) sugeriram que os mesmos poderiam ser transportados passivamente por linfócitos ou macrófagos, permanecendo íntegros até invadirem um vaso sanguíneo ativamente. Recentemente, foi proposto que cerca de

10% dos esporozoítos inoculados pela picada do inseto permanecem e evoluem na pele, no sítio de inoculação (Gueirard *et al.*, 2010).

Uma vez no sistema circulatório os esporozoítos atingem o fígado infectando os hepatócitos, e iniciando a fase exo-eritrocítica do ciclo. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, durante o ciclo exo-eritrocítico, formas latentes denominadas hipnozoítos, permanecem nos hepatócitos por tempo variável causando recaídas da doença (Krotoski, 1982). Os esporozoítos parecem invadir vários hepatócitos, migrando através deles antes de finalmente desenvolver em seu interior, em um vacúolo parasitóforo (Mota *et al.*, 2001). Nesse vacúolo, os parasitos se desenvolvem assexuadamente por esquizogonia dando origem aos esquizontes maduros que se rompem e liberam na corrente sanguínea os merozoítos, através de um processo de brotamento de vesículas denominadas merosomos (Sturm, *et al.*, 2006). Estima-se que cada hepatócito parasitado libere até 40.000 merozoítos no caso de *P. falciparum* (Nardin e Nussenzweig, 1993). Os merozoítos infectam os eritrócitos iniciando uma nova fase do ciclo de reprodução assexuada, que resultará na lise das células vermelhas a cada 48 a 72h (ciclo eritrocitário), conforme a espécie de plasmódio. O sincronismo, e consequente rompimento das hemácias infectadas pelo parasito no ciclo eritrocítico é o que causa as febres cíclicas nas infecções pelo *Plasmodium*.

Alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos masculino e feminino, que ao serem ingeridos por fêmeas dos mosquitos do gênero *Anopheles* iniciarão o ciclo esporogônico. Ainda não se sabe qual é o estímulo responsável pela produção de gametócitos, se a partir dos merozoítos ou dos esquizontes. Existem duas hipóteses: a primeira sugere que os merozoítos já estão predeterminados a evoluírem em formas assexuadas ou sexuadas antes de invadirem a hemácia; a segunda sugere que fatores ambientais ou estresse determinem a diferenciação dos merozoítos em gametócitos (Dyer e Day, 2000).

1.3. Quimioterapia antimalárica

A quinina foi o primeiro medicamento utilizado contra a malária, há mais de 300 anos. Ela foi encontrada na Amazônia peruana e isolada como um alcaloide do pó da planta *Cinchona* sp, em 1820, por Pelletier e Caventou, na França (revisto por Rosenthal e Miller, 2001). Até o século XX foi o único tratamento disponível contra a

malária, quando então foi substituída por fármacos sintéticos derivados do anel quinolínico. Apesar de sua toxicidade, a quinina continua sendo utilizada no tratamento da malária cerebral, causada pelo *P. falciparum*, inclusive em crianças menores que cinco anos na África (WHO, 2009).

A quinina foi o primeiro antimalárico a ser caracterizado. No entanto, em um trabalho recente, focalizado em estudos de Carl von Linné (1735), mostrou-se que extratos da planta *Fraxinus excelsior*, utilizada naquela época para tratar febre na Europa, provavelmente causada por malária, foram ativos contra *P. falciparum*. Este estudo sugere que algumas plantas já foram utilizadas no passado, porém o princípio ativo responsável pela atividade não chegou a ser caracterizado e identificado (Aydin-Schmidt *et al.*, 2010)

A quinina serviu de base para a síntese da cloroquina (CQ), uma 4-aminoquinolina, sintetizada durante a Segunda Guerra Mundial (Sweeney, 2000). A CQ foi utilizada durante décadas na terapêutica e profilaxia de todos os tipos de malária, devido a sua alta eficácia contra as formas sanguíneas do parasito, associada à sua baixa toxicidade e seu baixo custo (menos de U\$ 0,10 por tratamento) (Rosenthal, 2003; Martin *et al.*, 2009).

Outros medicamentos, também derivados do anel quinolínico (**Figura 1**) foram sintetizados para o tratamento da malária. Entre eles, a amodiaquina, com ação esquizotônica semelhante à CQ. No entanto, por ser rapidamente metabolizada, a amodiaquina apresenta menor atividade antimalárica (Churchill, 1985).

A mefloquina, um 4-quinolinometanol derivado da CQ, é mais ativa que a CQ sendo utilizada contra cepas de *P. falciparum* resistentes às 4-aminoquinolinas. No entanto, por possuir meia-vida prolongada, propiciou rápida seleção de parasitos resistentes. Atualmente é recomendada somente em combinação com outros compostos, sobretudo com derivados da artemisinina (WHO, 2006). Além disso, a mefloquina é tóxica, ocasionando efeitos colaterais graves, com sintomas neurológicos importantes durante sua administração (Patchen *et al.*, 1989).

A primaquina, uma 8-aminoquinolina é ativa contra os hipnozoítos hepáticos de *P. vivax* e *P. ovale* (Mueller *et al.*, 2009; Wells *et al.*, 2010), mas tem pouca ou nenhuma ação contra estágios eritrocíticos do parasito. Sua utilização é também recomendada em áreas endêmicas da malária por *P. falciparum*, uma vez que a mesma possui ação contra os gametócitos, inibindo a evolução do parasito no vetor suscetível e consequentemente interrompendo a transmissão da doença (WHO, 2009).

Atualmente, o tratamento da malária é feito por associação dos derivados da artemisinina, uma lactona sesquiterpênica isolada da planta *Artemisia annua*, por pesquisadores chineses (de Ridder *et al.*, 2008; WHO, 2009).

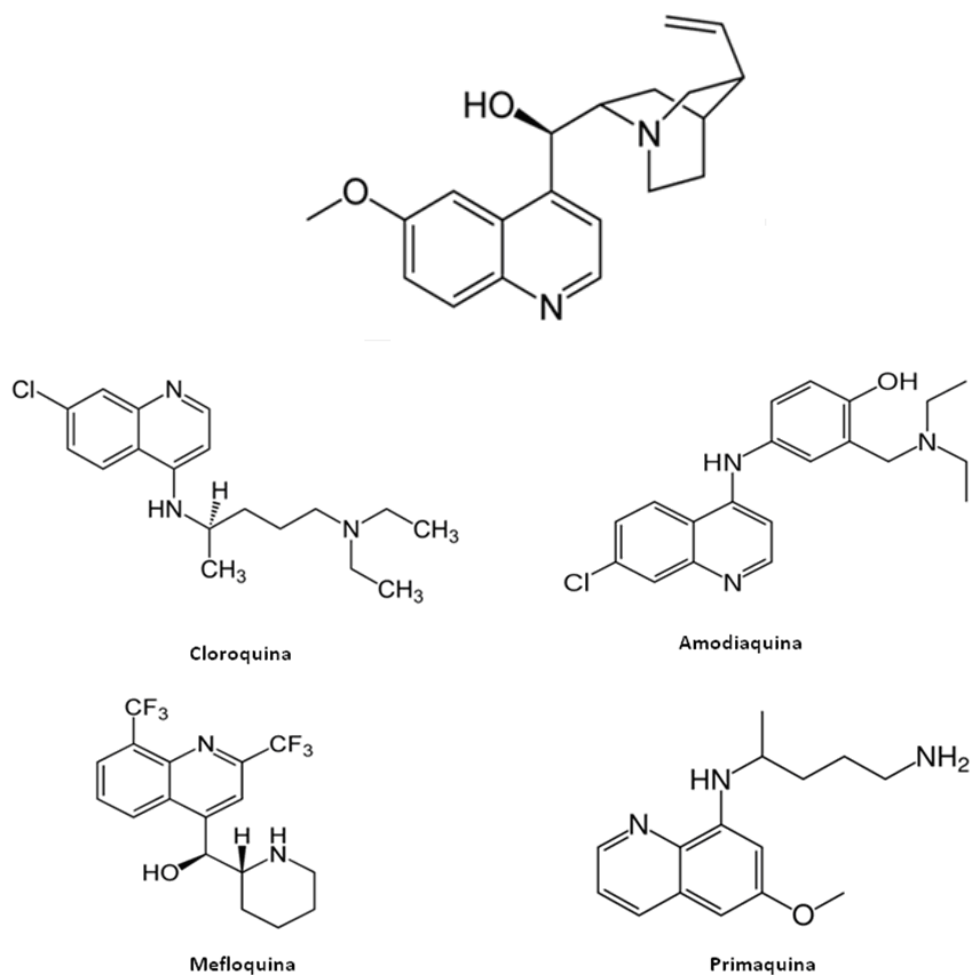


Figura 1. Estrutura da quinina, um alcaloide presente nas plantas *Cinchona calisaya* e *C. succirubra*, e de antimaláricos sintetizados a partir do seu anel quinolínico.

A OMS recomenda terapias de combinação “Artemisinin-based combination therapy” ou ACT, uma vez que derivados da artemisinina apresentam um excelente perfil de segurança, uma rápida ação, agem contra gametócitos e possuem meia vida curta, o que dificulta o desenvolvimento de resistência (Okell *et al.*, 2008; Stepniewska e White, 2008). A ACT se baseia na associação de derivados semi-sintéticos da artemisinina como, por exemplo, artemether, arteether e artesunato, com outro antimalárico, como os 4-aminoquinolínicos. Os derivados da artemisinina são obtidos por modificação química da artemisinina e foram sintetizados para melhorar suas características farmacocinéticas (Li e Wu, 2003). Apesar de se associar esses compostos, o surgimento de resistência à ACT foi relatado na literatura desde 2004, quando o primeiro caso de recrudescência foi descrito em Camboja (Dondorp *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2010).

1.4. Mecanismos para a sobrevivência do parasito e atuação da cloroquina

Após a invasão dos eritrócitos pelos merozoítos, a sobrevivência do parasito depende da digestão da hemoglobina, que se processa no interior do vacúolo digestivo (VD) do parasito. Esta digestão é mediada por uma série de proteases, entre elas as plasmepsinas e falcipainas (Olliaro e Goldberg, 1995). Durante o catabolismo da hemoglobina, sua porção protéica (globina) é utilizada como fonte de aminoácidos pelo parasito, e a fração heme, denomina ferriprotoporfirina IX, é liberada, sendo um grupo reativo, gerador de radicais livres (ROS) tóxicos para o parasito (Sullivan, 2002).

Um dos mecanismos de escape realizado pelo *Plasmodium* sp é a detoxificação, através da polimerização do heme, gerando um cristal conhecido como hemozoína (Ginsburg *et al.*, 1999). A formação de hemozoína é essencial para manter o equilíbrio e tornar disponível o espaço na hemácia para o crescimento do parasito (Egan, 2007). Esse processo, de formação de hemozoína, pode acontecer espontaneamente ou ser mediado pela enzima heme polimerase (Ginsburg *et al.*, 1999), pela proteína HRPII, ou por lipídeos (Kumar *et al.*, 2007). A glutatona reduzida também auxilia na detoxificação do heme, atuando como um quelante, diminuindo a afinidade do heme pela membrana do parasito, e por consequência tendo um efeito protetor (Eckman e Eaton, 1979).

Diversos mecanismos de ação de fármacos, com diferentes alvos de atuação já foram descritos na literatura (Rosenthal, 2003). Como exemplo, inibidores de falcipainas que agem na hidrólise da hemoglobina, levando ao bloqueio do desenvolvimento do parasito, como demonstrado no modelo experimental da malária murina (Sijwali *et al.*, 2001; Batra *et al.*, 2003).

A CQ é um antimalárico padrão utilizado por mais de 50 anos; apesar disso, seu mecanismo de atuação ainda não foi completamente elucidado (Koncarevic *et al.*, 2007). Por ser uma base fraca a CQ é acumulada no VD. Em pH fisiológico a CQ encontra-se desprotonada, mas no VD, onde o pH é ácido, torna-se protonada, perdendo a capacidade de atravessar a membrana plasmática (Bray *et al.*, 2005).

O mecanismo de ação mais aceito para a CQ é a formação de uma ligação covalente com o heme, inibindo a geração dos cristais de hemozoína (Sullivan 2002; Fitch, 2004) e gerando uma alta produção de ROS. Esses radicais (**Figura 2**) causam danos oxidativos às biomoléculas, como as proteínas, o DNA e os lipídeos. Tais danos são responsáveis por gerar modificações estruturais irreversíveis, além da perda de função biológica (Radfar *et al.*, 2008). Além disso, parece que a CQ atua na inibição da enzima heme polimerase (Orjih, 1997; Agrawal *et al.*, 2002). Outros efeitos que parecem ser independentes do acúmulo da CQ no VD já foram descritos, tais como sua interação com a molécula de DNA, levando a alterações da sua estrutura e o bloqueio da sua síntese (Stephen *et al.*, 2000).

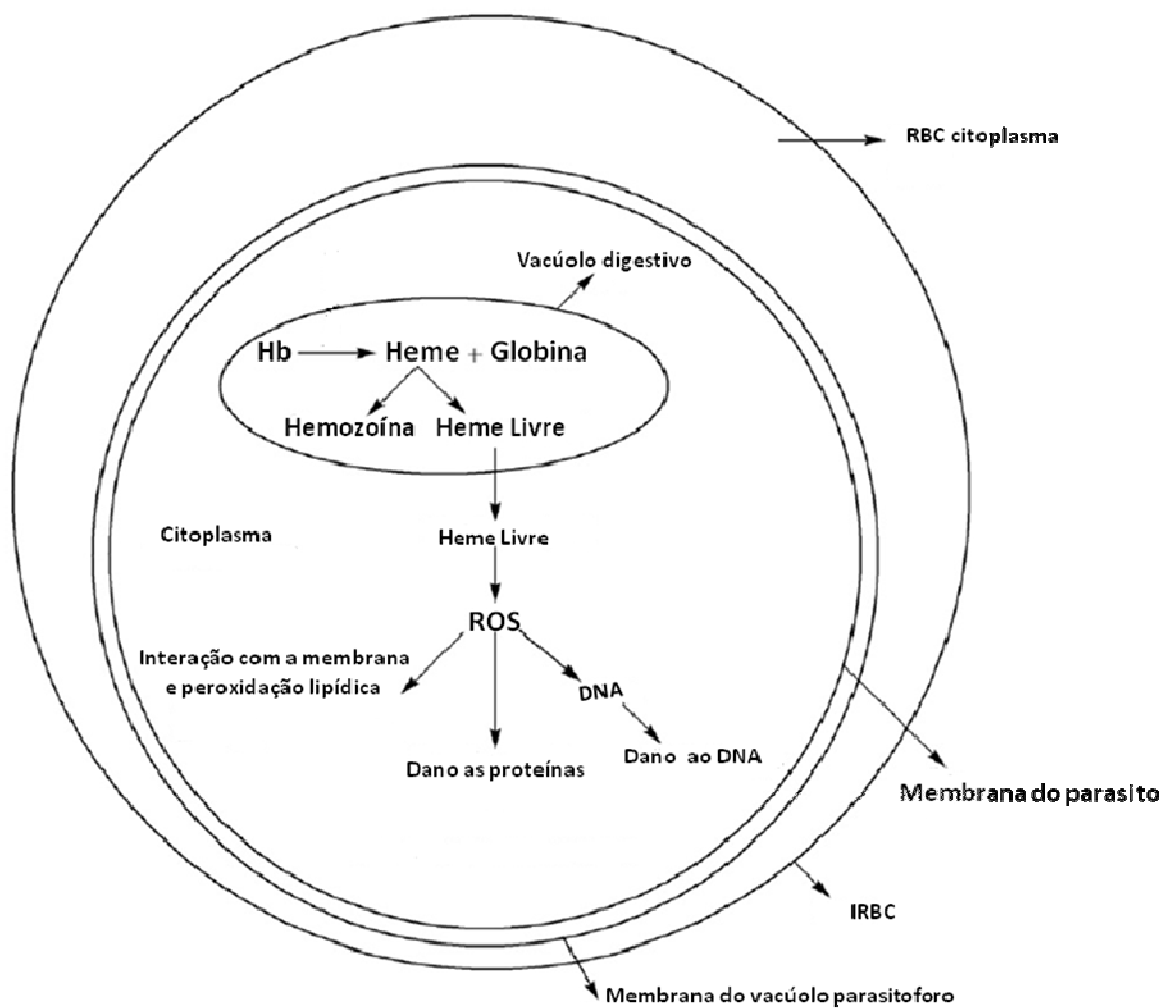


Figura 2. Mecanismos de toxicidade do heme livre no *Plasmodium* sp (adaptada de Kumar *et al.*, 2007).

2. JUSTIFICATIVA

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a malária é considerada a maior responsável por danos econômicos e sociais, comprometendo o desenvolvimento de países com alta transmissão (Gallup e Sachs, 2001). A falta de uma vacina eficaz (Kocken *et al.*, 1999; Wykes e Good, 2007), a dificuldade de controle do vetor (Hanafi-Bojd *et al.*, 2011) e o surgimento e disseminação de parasitos resistentes à maior parte dos fármacos disponíveis (Enserink, 2010; Dondorp *et al.*, 2009), são os principais problemas para seu controle, tornando essa doença um importante problema de saúde pública no mundo.

O diagnóstico precoce e o tratamento imediato dos indivíduos infectados são as principais estratégias utilizadas para o controle da malária. No entanto, a resistência aos medicamentos comercialmente disponíveis leva ao aumento da transmissão, reduzindo as opções terapêuticas (Price e Nosten, 2001). Há poucos fármacos em fase de triagem clínica, apesar dos numerosos testes desenvolvidos para se avaliar a atividade antiplasmodial de novos compostos. Antimaláricos eficazes, apropriados, e seguros, ainda são necessários para solucionar os problemas advindos do desenvolvimento da multirresistência dos parasitos aos medicamentos em uso (Ridley, 2002). Portanto a busca de compostos ativos contra alvos específicos do parasito é uma estratégia promissora no desenvolvimento de novos fármacos, sendo o objetivo central do presente estudo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a citotoxicidade e a atividade antimalárica de diferentes análogos da cloroquina.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade *in vitro* dos análogos da cloroquina contra *P. falciparum*;
- Avaliar a atividade citotóxica dos compostos nas linhagens celulares BGM e HepG2;
- Avaliar a atividade hemolítica dos compostos em hemácias normais não infectadas;
- Avaliar a atividade antiplasmodial dos análogos da cloroquina contra o *P. berghei* em camundongos experimentalmente infectados com formas sanguíneas;
- Determinar o possível mecanismo de ação dos análogos da cloroquina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção dos análogos metálicos da cloroquina

Os análogos da cloroquina foram sintetizados e enviados para os ensaios quimioterápicos pelo colaborador químico Dr. Mário Meneghetti, da Universidade Federal de Alagoas – UFAL. Esses compostos pertencem a duas classes: DETA, com apenas um anel quinolínico na sua estrutura, e DMA com dois anéis quinolínicos. Em seguida DETA foi complexado aos metais ferro, platina e paládio e DMA ao ferro e à platina.

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 0,005% para testes *in vitro* e 3% para testes *in vivo*. Todas as soluções foram preparadas no dia da realização dos experimentos.

4.3. Testes antimaláricos *in vitro* contra o *P. falciparum*

4.3.1. Cultivo contínuo da fase eritrocítica do parasito

Nos ensaios de atividade antimalárica foram utilizadas formas sanguíneas de um clone de *P. falciparum* CQ-resistente (W2). Os parasitos foram cultivados em hemácias humanas sob condições estabelecidas por Trager e 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. As placas foram mantidas em dessecadores à 37°C 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 dos parasitos 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 e 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 ressuspendido 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, foi ajustado 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, USA) 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 triada, ou (ii) 0,05% de

parasitemia e 1,5% de hematócrito para o teste de ELISA anti-HRP II. Anteriormente a adição da suspensão dos parasitos, 20µL dos compostos a serem testados foram adicionados a placa teste, em triplicata, e em diferentes concentrações 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, CQ, foi testado em paralelo em todos os experimentos realizados, em diluições seriadas de 500 à 7,8ng/mL. Os compostos testes foram inicialmente testados nas concentrações de 50 e 25µg/mL, posteriormente titulados, utilizando concentrações seriadas 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 parasito-compostos teste e controles foi incubada por 24h à 37°C. Após esse período, a cada poço foram adicionados 20µL de solução de [³H]-hipoxantina à 5µCi (PerkinElmer, 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. 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, 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. 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*. A placa foi novamente incubada por 48h nas condições ideais para o crescimento do parasito. Após 72h totais de incubação, as placas foram congeladas e descongeladas duas vezes à -70°C 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 absorbâncias 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. Foi utilizado o programa Origin (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 de HepG2 (derivada de um hepatoma humano) e BGM (célula renal basal de macaco verde africano) foram cultivadas como recomendado (Calvo-Calle *et al.*, 1994). As mesmas foram mantidas em garrafas de cultura de 75cm² (Corning) suplementadas em RPMI 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 repicada, ou utilizada na 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 das placas

Para o preparo das placas testes, as células foram lavadas com meio sem SBF, tratadas com 1mL de tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco/Invitrogen) e incubadas a 37°C por 3min, para que as células se descolassem da garrafa. Ao conteúdo resultante da tripsinização foram adicionados 9 mL 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% SBF. Após a contagem, em câmara de Neubauer, a suspensão foi ajustada para 5x10³/mL e 180µL 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 Madureira e colaboradores (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 e 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. Ensaio de citotoxicidade utilizando o Vermelho Neutro

O ensaio de vermelho neutro (Borenfreunda *et al.*, 1987) também foi realizado em triplicata. Após o preparo das microplacas, como descrito no item 4.4.2, o sobrenadante foi retirado e 200 µL de solução de vermelho neutro (40µg/mL) foram adicionados a cada poço. A microplaca foi incubada novamente em estufa a 37°C umidificada em ambiente com 5% de CO₂, por 3h. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e adicionaram-se 200 µL de solução de formaldeído (0,5%, v/v) em CaCl₂ (1%), a cada poço da placa teste. Após 5min o sobrenadante foi retirado novamente e 100µL de solução de álcool ácido (50% v/v de etanol em 1% v/v de ácido acético) foram adicionados a cada poço. As absorbâncias das microplacas foram lidas em um leitor de ELISA (Spectra Max340PC³⁸⁴, Molecular Devices), utilizando-se filtro de 540nm.

4.4.5. 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. Valores maiores que 10 foram considerados indicativos de ausência de toxicidade, enquanto substâncias com valores abaixo de 10 foram consideradas tóxicas (Bézivin *et al.*, 2003).

4.5. Ensaio de hemólise

O teste foi realizado como proposto por Wang e colaboradores (2010). Os compostos-testes foram diluídos em solução de DMSO a 0,005% (v/v), sendo os mesmos testados nas concentrações seriadas de 50 a 0,62 µg/mL. Após a diluição dos compostos, 20µL das amostras foram adicionados a 180µL de uma suspensão de eritrócitos humanos a 1%. Uma solução de saponina (Sigma-Aldrich) a 0,05% foi utilizada como controle positivo do teste, por gerar 100% de hemólise. A microplaca foi então incubada por 30min à 37°C em agitação constante, centrifugada a 1000g por 10min e o sobrenadante transferido para outra microplaca com fundo em U. A leitura foi realizada a 540nm em um leitor de ELISA (Spectra Max 340PC³⁸⁴, Molecular Devices). A taxa de hemólise das amostras foi calculada como abaixo:

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

4.6. Teste de inibição da formação de hemozóina

O ensaio de hemozóina foi realizado como descrito por Kanyile e Egan (2004). Resumidamente, 10,1µL dos compostos em diferentes concentrações seriadas (40-0,62mg/mL) em triplicata, foram adicionados a uma microplaca de 96 poços de fundo em “U” juntamente com 101,2µL da solução estoque de hematina a 1,680mM diluída em uma solução de NaOH a 0,1M. As suspensões foram então homogeneizadas e 58,7µL de uma solução de acetato de sódio (12,9M, pH 5,0) adicionados à cada poço. A

microplaca foi incubada a 60°C por 60min, em seguida adicionou 80µL de solução de piridina (30% (v/v) em 20 mM Hepes pH 7,5. A placa foi incubada a temperatura ambiente. Nessa solução os sólidos foram homogeneizados e deixados em repouso por 15min para que houvesse sua sedimentação. Posteriormente, 38µL do sobrenadante dos poços da placa foram transferidos para outra microplaca diluídos em 250µL de uma solução de piridina à 30% (v/v) (pH 7,5, 20mM Hepes). A microplaca foi lida a 405nm (SpectraMax340PC384, Molecular Devices). Os resultados, expressos em concentração de heme livre, foram calculados a partir da comparação da absorbância da curva padrão de solução de hemina.

4.7. Testes antimaláricos *in vivo* contra o *P. berghei*

4.7.1. 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).

4.7.2. Teste esquizonticida sanguíneo *in vivo* com *P. berghei*

Camundongos suíços Webster, fêmeas, pesando 20 ± 2 g, 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. 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 CQ, utilizando 3 a 5 animais por grupo. Nos 2º, 3º e 4º dias após a inoculação, os camundongos foram tratados por via oral com os compostos testes e com o controle (CQ), em diferentes concentrações. A parasitemia foi avaliada nos 5º, 8º e 10º 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 percentagem de redução da parasitemia dos animais tratados em relação aos controles. Inibição de 30% do crescimento dos parasitos, quando comparado o grupo controle com o grupo teste, foi considerada como indicador de uma amostra ativa (Andrade-Neto *et al.* 2003).

4.7.3. Determinação da parasitemia

Para avaliação da parasitemia os esfregaços sanguíneos 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 50 a 100 campos. A parasitemia foi expressa em percentagem de hemácias parasitadas.

4.8. Modelo molecular de *docking*

A capacidade de inibição da formação de hemozoína foi também avaliada através de testes computacionais, feitos por colaboradores no Instituto Militar de Engenharia do Rio de Janeiro (IME-RJ).

4.9. Análise estatística

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Inc, EUA). Para caracterizar a distribuição dos dados, foram utilizados os testes de Kolmogorov-Smirnov e o de Shapiro-Wilk. Para determinar a diferença entre as médias de pelo menos três grupos analisados, os testes ANOVA seguido do de

Bonferroni (dados paramétricos) e os testes de Kruskal Wallis seguido do de Dunns (dados não-paramétricos) foram utilizados.

Na análise de correlação foram utilizados os testes de Pearson (dados paramétricos) e Spearman (dados não paramétricos). Todos os testes foram considerados significativos quando apresentaram um valor de $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Atividade antiplasmodial de análogos da cloroquina

Inicialmente, os compostos foram testados quanto a sua atividade antiplasmodial contra o *P. falciparum*, utilizando o clone W2, cloroquina resistente e mefloquina-sensível, para avaliação de sua atividade *in vitro* através: (i) de um ensaio imunoenzimático com anticorpos monoclonais dirigidos contra a proteína rica em histidina e alanina (HRPII) específica do parasito, essencial à sua sobrevivência; (ii) do teste hipoxantina tritiada, incorporada pelo DNA dos parasitos viáveis. Os compostos foram sempre testados três ou quatro vezes em cada ensaio, utilizando triplicata para cada concentração do composto, em paralelo com a CQ. Após a realização desses ensaios os valores de IC₅₀ foram determinados em curvas de dose-resposta como descrito no item 4.3.6.

Os análogos da cloroquina, complexados ou não com metais, apresentaram intensa atividade anti-*P. falciparum*, em escala nanomolar, nos ensaios de HRPII e de hipoxantina (**Tabela 1**). O composto DMA e seus derivados apresentaram valores de IC₅₀ (0,05 à 0,32nM) menores quando comparados a DETA e seus derivados (0,32 à 0,49nM) no ensaio de hipoxantina tritiada. A análise estatística dos valores de IC₅₀ dos novos compostos em comparação com a CQ, nos dois métodos, mostrou que não houve diferença estatística entre os mesmos. No entanto, a análise estatística dos valores de IC₅₀ obtidos pelas duas técnicas de testes *in vitro* mostrou diferenças significativas entre os análogos DMA, DMA Pt, DETA Pt e DETA Fe. Essas moléculas foram mais ativas no ensaio de HRPII, exceto DMA, que foi mais ativa no ensaio de hipoxantina (**Figura 3**). O análogo DMA Fe apresentou valor de IC₅₀ semelhante nos dois ensaios, ambos menores que a CQ, no entanto, DETA complexado com o Fe foi menos ativo, provavelmente devido ao menor número de anéis quinolínicos. Os valores de IC₅₀ da CQ e de DETA Pd foram semelhantes nos dois ensaios.

Tabela 1 - Atividade anti-*P. falciparum* (clone W2 cloroquina-resistente) de análogos da cloroquina, utilizando os ensaios imunoenzimático anti-HRP II e de hipoxantina.

Análogos da cloroquina	IC ₅₀ (nM) (média ± DP)	
	HRP II	Hipoxantina
DMA	0,55 ± 0,000	0,06 ± 0,020
DMA Fe	0,06 ± 0,000	0,05 ± 0,004
DMA Pt	0,07 ± 0,004	0,32 ± 0,020
DETA	0,26 ± 0,020	0,32 ± 0,070
DETA Fe	0,17 ± 0,005	0,49 ± 0,030
DETA Pt	0,04 ± 0,010	0,40 ± 0,060
DETA Pd	0,51 ± 0,060	0,40 ± 0,020
Cloroquina	0,12 ± 0,002	0,18 ± 0,006

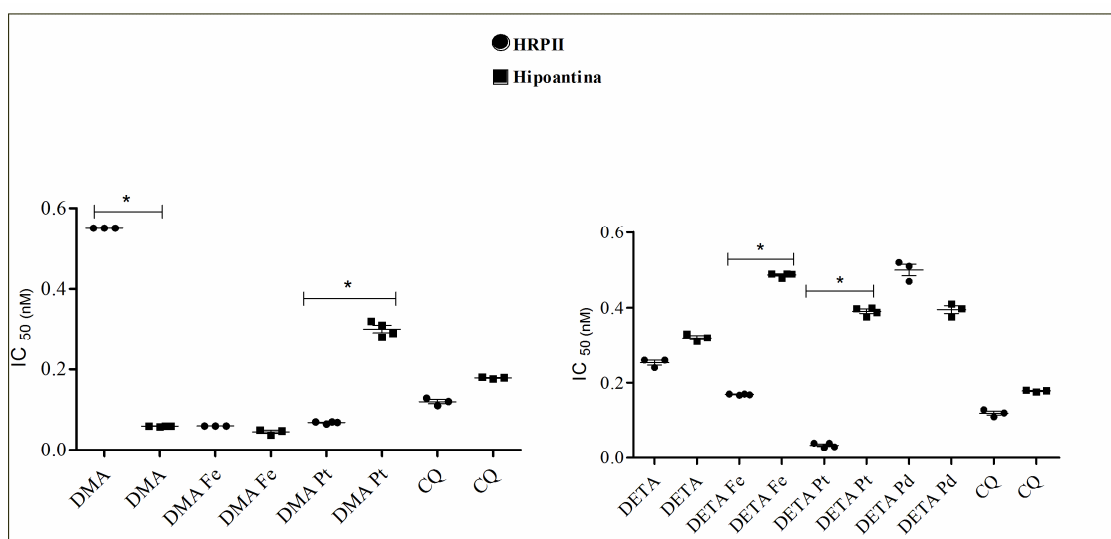


Figura 3. Comparação entre os valores de IC₅₀ dos análogos da cloroquina em dois métodos distintos, HRP II (círculo) e Hipoxantina (quadrado), sendo significativas as diferenças representadas por asterisco ($p \leq 0,05$).

5.2. Atividade citotóxica de análogos da cloroquina

Para avaliar a atividade citotóxica dos análogos da cloroquina, foram realizados dois ensaios, o ensaio de MTT e o de vermelho neutro, em duas linhagens celulares, HepG2 (hepatoma humano) e BGM (célula basal de macaco verde africano).

As doses letais mínimas para 50% das células (MDL_{50}), nos diferentes testes, foram aparentemente semelhantes para a maioria dos análogos da cloroquina (**Tabela 2**). Entretanto, quando realizada a análise de dispersão (**Figura 4**), o composto DETA Pd apresentou valor de MDL_{50} maior em todos os ensaios e linhagens celulares avaliadas, sendo, portanto, o composto menos tóxico. No ensaio de vermelho neutro e na linhagem celular HepG2, o composto DETA Fe também apresentou valor de MDL_{50} elevado, enquanto DMA Fe apresentou valor inferior quando comparado aos demais. A CQ apresentou um menor valor de MDL_{50} no ensaio de vermelho neutro nas duas linhagens celulares quando comparado ao valor de MDL_{50} obtido no ensaio de MTT.

Tabela 2 - Atividade citotóxica de análogos da cloroquina utilizando o ensaio de MTT e vermelho neutro nas duas linhagens celulares, HepG2 e BGM.

Análogos da cloroquina	MDL_{50} (μ M) (média \pm DP)			
	MTT		Vermelho Neutro	
	BGM	HepG2	BGM	HepG2
DMA	0,05 \pm 0,03	0,05 \pm 0,00	0,04 \pm 0,02	0,10 \pm 0,03
DMA Fe	0,06 \pm 0,00	0,09 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01	0,04 \pm 0,00
DMA Pt	0,02 \pm 0,01	0,02 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00	0,06 \pm 0,02
DETA	0,10 \pm 0,00	0,27 \pm 0,01	0,24 \pm 0,06	0,16 \pm 0,05
DETA Fe	0,12 \pm 0,07	0,97 \pm 0,03	0,23 \pm 0,00	0,31 \pm 0,05
DETA Pt	0,10 \pm 0,01	0,15 \pm 0,08	0,09 \pm 0,00	0,13 \pm 0,00
DETA Pd	>1,95	>1,95	>0,40	>0,40
Cloroquina	0,37 \pm 0,00	0,49 \pm 0,00	0,18 \pm 0,18	0,21 \pm 0,02

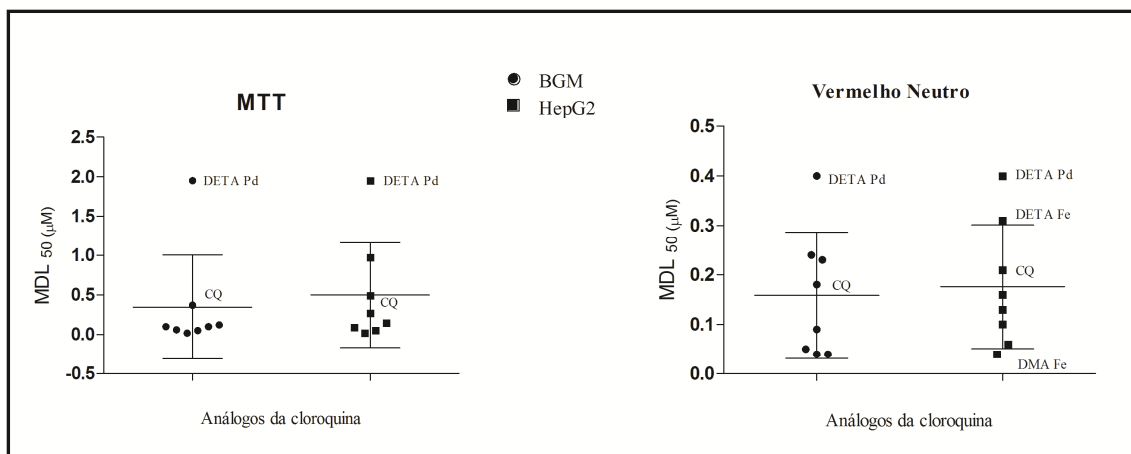


Figura 4. Dispersão dos valores de MDL₅₀ dos sete análogos da cloroquina nas duas linhagens celulares, BGM (círculo) e HepG2 (quadrado).

5.3. Análise do Índice de seletividade

O cálculo do índice de seletividade (IS) de cada análogo da cloroquina foi feito a partir da razão entre a dose tóxica para 50% das células e sua atividade anti-*P. falciparum* (IC₅₀). Essa análise mostrou que todos os compostos são seguros uma vez que a relação entre a dose tóxica e a dose efetiva, avaliada pelo IS (> 10), apresenta uma ampla janela terapêutica (**Tabelas 3 e 4**). A comparação dos IS em função do ensaio de hipoxantina tritiada e MTT na linhagem celular HepG2, mostrou valores variando entre 62 (DMA Pt) até 4875 (DETA Pd), sendo o IS de DETA Pd maior do que o observado para a CQ (IS = 2722).

Tabela 3 - Índice de Seletividade dos análogos da cloroquina em diferentes ensaios de viabilidade celular nas linhagens celulares estudadas (HepG2 e BGM), calculados em relação ao ensaio de atividade antiplasmodial de hipoxantina.

Análogos da cloroquina	Hipoxantina			
	MTT		Vermelho Neutro	
	BGM	HepG2	BGM	HepG2
DMA	833	833	666	1666
DMA Fe	1200	1800	800	800
DMA Pt	62	62	156	187
DETA	312	844	750	500
DETA Fe	244	1979	469	632
DETA Pt	250	375	225	325
DETA Pd	>4875	>4875	>1000	>1000
Cloroquina	2055	2722	1000	1166

Tabela 4 - Índice de Seletividade dos análogos da cloroquina em diferentes ensaios de viabilidade celular nas linhagens celulares estudadas (HepG2 e BGM), calculados em relação ao ensaio de atividade antiplasmodial anti-HRP2.

Análogos da cloroquina	Anti-HRP2			
	MTT		Vermelho Neutro	
	BGM	HepG2	BGM	HepG2
DMA	90	90	72	181
DMA Fe	1000	1500	666	666
DMA Pt	285	285	714	857
DETA	384	1038	932	615
DETA Fe	705	5705	1352	1823
DETA Pt	2500	3750	2250	3250
DETA Pd	>3823	>3823	>784	>784
Cloroquina	3083	4083	1500	1750

5.4. Avaliação da atividade hemolítica de análogos da cloroquina

Como medida de citotoxicidade *in vitro* foi avaliada também a taxa de hemólise causada pelos compostos às hemácias humanas não-infectadas, usando diluições seriadas entre 1,5 a 50µg/mL, o que representa 100 vezes o valor testado para a obtenção do IC₅₀. Nenhum dos análogos da cloroquina causou hemólise nas doses testadas.

5.5. Teste supressivo *in vivo* de análogos da cloroquina contra o *P. berghei*

A atividade antimalárica de DETA e DMA foi avaliada *in vivo*, em camundongos infectados com *P. berghei*, em três experimentos independentes. O percentual de redução da parasitemia foi calculado em relação ao grupo controle não

tratado, nos dias 5, 8 e 10 após a infecção nas doses de 25 e 50mg/Kg (**Tabela 5**). Foram consideradas ativas as substâncias capazes de reduzir 30% ou mais da parasitemia, sendo a CQ a molécula mais ativa, seguida de DETA, com redução máxima de 95%, no 5º dia e de DMA, que na dose de 50 mg/Kg causou 81% de redução no 5º dia. A **Figura 5** apresenta a evolução da parasitemia dos animais tratados e dos controles.

Tabela 5: Atividade antimalárica *in vivo* de análogos da cloroquina e da cloroquina em camundongos infectados com o *Plasmodium berghei*.

Análogos da cloroquina	Dose (mg/kg)	% Redução			Sobrevida (tempo em dias) ±DP
		5º	8º	10º	
DMA	25	64	26	37	25 ± 2
	50	81	75	43	24 ± 1
DETA	25	91	61	70	24 ± 1
	50	95	71	76	25 ± 1
Cloroquina	20	100	100	100	>30
Controle	-	-	-	-	19 ± 7

A sobrevida média dos animais foi maior nos grupos tratados com os análogos da cloroquina em relação ao controle não tratado, no entanto, as diferenças não foram significativas ($p > 0,05$), provavelmente devido ao pequeno número de animais por grupo. Apenas a CQ foi curativa, eliminando 100% da parasitemia.

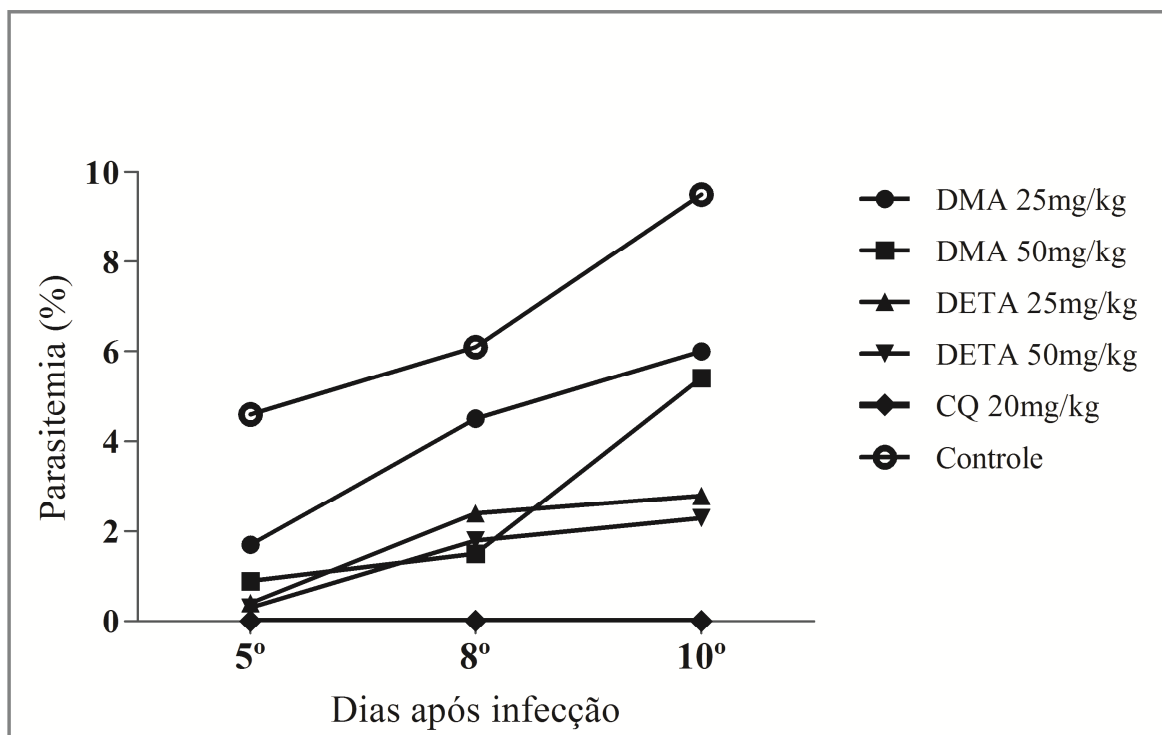


Figura 5. Parasitemia média em camundongos infectados pelo *P. berghei* (cepa NK65) tratados com análogos da cloroquina e com cloroquina, avaliada em diferentes dias após a infecção.

5.6. Avaliação da inibição da formação de hemozoína de análogos da cloroquina

Com o objetivo de se avaliar um possível mecanismo de ação dos análogos da cloroquina, foi avaliada sua capacidade de inibição da formação de hemozoína. Foi utilizado um protocolo *in vitro* que mimetiza o ambiente *in vivo* no VD do parasito, onde o produto da digestão da hemoglobina é depositado na forma polimerizada. Neste protocolo, quanto maior a formação de heme livre, menor a concentração de hemozoína, portanto, mais ativa a substância avaliada (Kanyile e Egan, 2004).

O ponto de corte (*cut-off*) foi determinado pela quantidade de heme livre em relação ao controle negativo (sem a substância teste). Foram realizados dois experimentos, representados como média \pm desvio-padrão (DP) de triplicatas. As concentrações testadas pelos análogos da cloroquina e pela CQ variaram entre 0,62 a 40mg/mL, sendo as diferenças significativas em relação ao controle negativo indicadas por asterisco ($p \leq 0,05$).

Os dados mostram que todos os compostos inibiram significativamente a formação de hemozoína (**Figura 6**). A CQ causou inibição a partir da concentração de 2,5mg/mL, com um perfil dose-resposta ($p = 0,004$; $r = 1,000$). Tanto DETA como seus derivados inibiram significativamente a formação de hemozoína, com um perfil de dose-resposta, com valores de r entre 1,000 à 0,964 e $p \leq 0,05$. O análogo DETA e seus derivados com platina e ferro (**Figura 6A, 6C e 6E**) inibiram a formação de hemozoína em doses menores do que a observada para a CQ. No entanto, o DETA Pd somente inibiu a formação de hemozoína em doses elevadas, ou seja, a partir de 5mg/mL (**Figura 6G**). O análogo DMA (**Figura 6B**) inibiu a formação de hemozoína a partir da concentração de 2,5mg/mL e não apresentou perfil dose-dependente ($p = 0,1095$; $r = 0,6785$). Os seus derivados (**Figura 6D e 6F**) foram mais ativos, inibindo significativamente a formação de hemozoína em todas as concentrações avaliadas, apresentando também um perfil dose-resposta.

Em resumo, a CQ e seus sete novos análogos avaliados inibiram significativamente a formação de hemozoína *in vitro*.

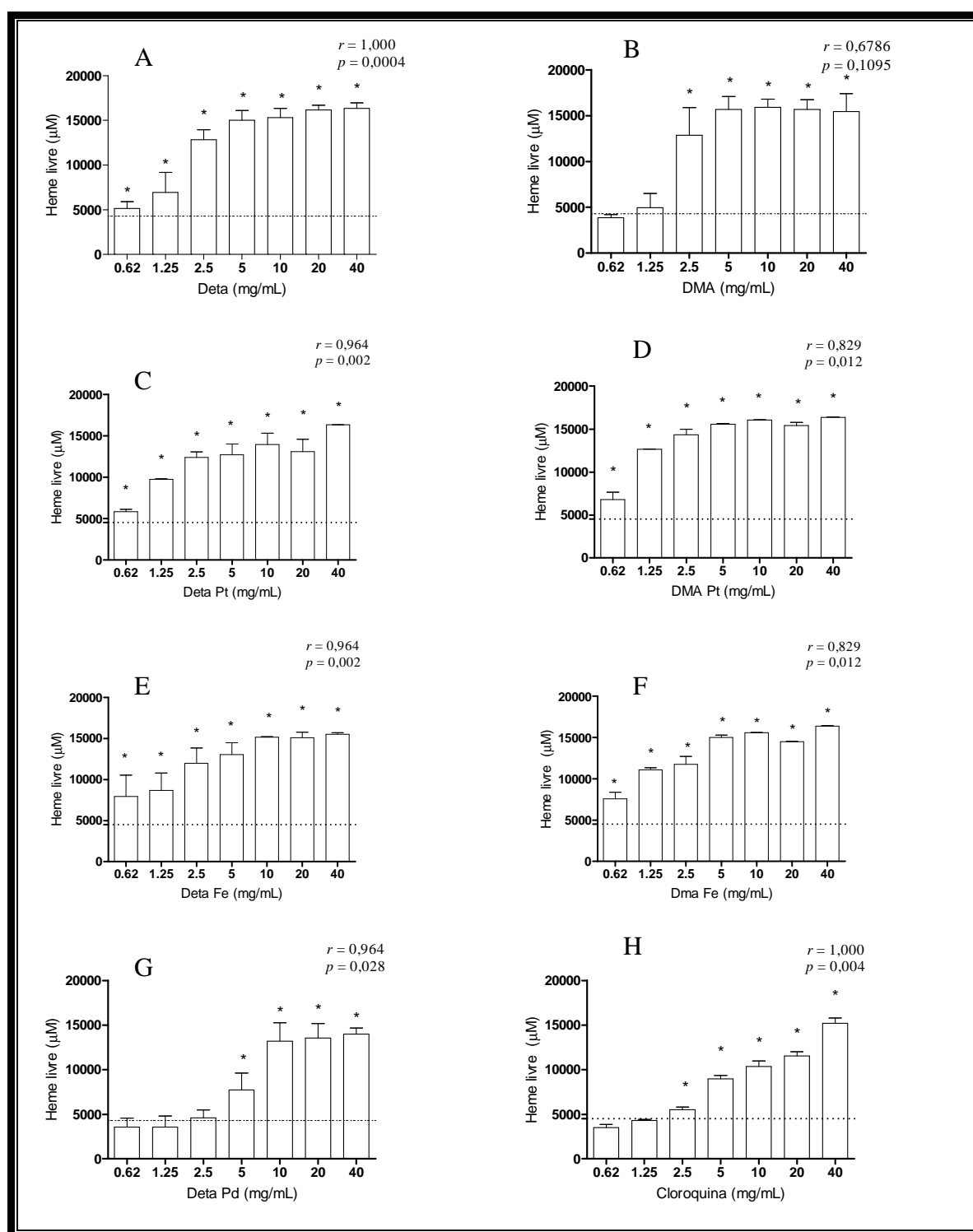


Figura 6. Inibição da formação de hemozoína pela cloroquina (H), utilizada como controle e por seus análogos DETA (A), DETA Pt (C), DETA Fe (E), DETA Pd (G), DMA (B), DMA Pt (D) e DMA Fe (F).

5.7. Estudo molecular de *docking*

Foi utilizado o modelo molecular de *docking*, que avalia a força de ligação entre um ligante na região do sítio ativo de um alvo molecular do parasito, e consiste em se quantificar essa interação ligante-alvo. O alvo molecular pode um ser receptor protéico, enzima, ácido nucléico ou canal iônico, todos relacionados ao agente causador de doenças ou do processo fisiológico, contra os quais se deseja desenvolver um tratamento quimioterápico (Gehlhaar, 1995; Yang e Chen, 2004; Da Silva, 2010).

A possível interação da CQ e dos análogos DETA e DMA com a hematina dimérica foi avaliada, sendo consideradas as protonações mais favoráveis no meio biológico das substâncias (**Figura 7**). Sabe-se que a CQ no VD do parasito torna-se protonada e perde assim a capacidade de atravessar a membrana plasmática do parasito (Sullivan 2002; Fitch 2004). Três possíveis protonações foram estudadas para o análogo DETA (DETA-1, DETA-2, DETA-3) e duas protonações para o análogo DMA (DMA-1 e DMA-2), ilustrados na figura abaixo.

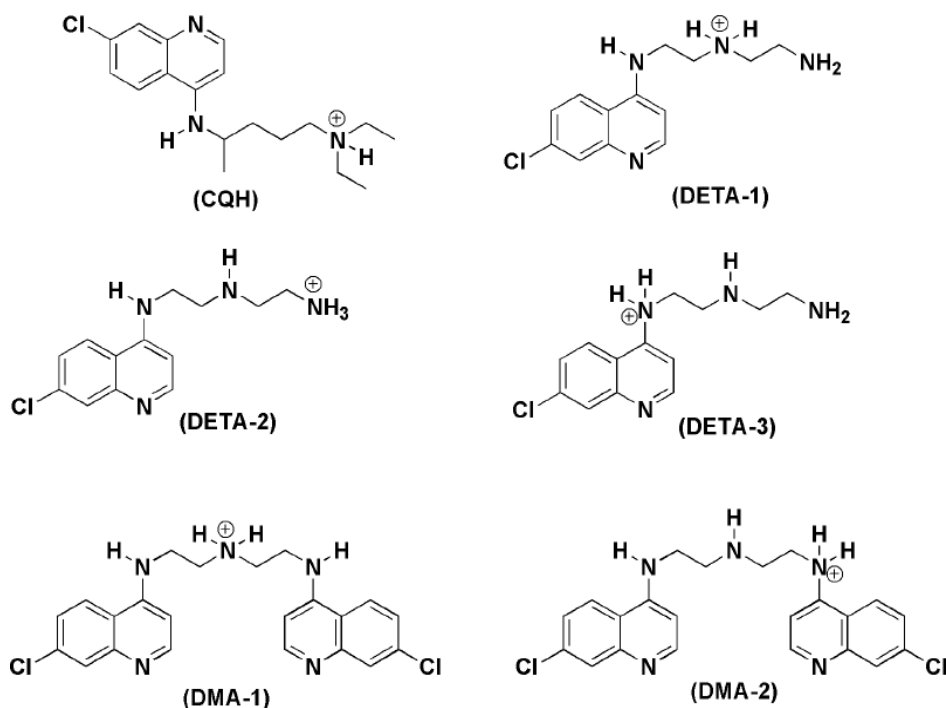


Figura 7. Estrutura química da cloroquina e dos análogos da cloroquina na forma protonada.

As energias obtidas utilizando-se o algoritmo MolDock Score (Molegro Virtual Docker) para os análogos da cloroquina e para a CQ estão representadas na **Tabela 6**. Os resultados mostram que DETA e DMA, em todas as possíveis protonações, se ligaram a hematina dimérica (hemozoína sintética), sugerindo uma possível interação com consequente inibição da formação de hemozoína. Esses dados, como esperado, foram semelhantes aos dados encontrados *in vitro* e descritos no **Item 5.5**. As energias de interação de hidrogênio possuem uma contribuição significativa para manter a interação entre os compostos estudados e a hematina dimérica. Somente a forma protonada DMA-1 apresentou energia de interação de hidrogênio igual a zero. Os outros compostos apresentaram energias de interação de hidrogênio próximas de -3 Kcal mol^{-1} , evidenciando a importância de tais interações para a formação do complexo fármaco-hematina. A **Figura 8** ilustra a interação da hematina com os análogos estudados e a CQ.

Tabela 6 - Energia de ancoramento entre os análogos da cloroquina e a hematina dimérica.

Ligante	Energia interação H (Kcal mol ⁻¹)	MolDock Score (Kcal mol ⁻¹)
Cloroquina protonada	-3, 428	-105, 966
DETA-1	-1, 954	-100, 567
DETA-2	-5, 000	-92, 157
DETA-3	-3, 500	-76, 500
DMA_1	0, 000	-116, 037
DMA_2	-2, 198	-124, 915

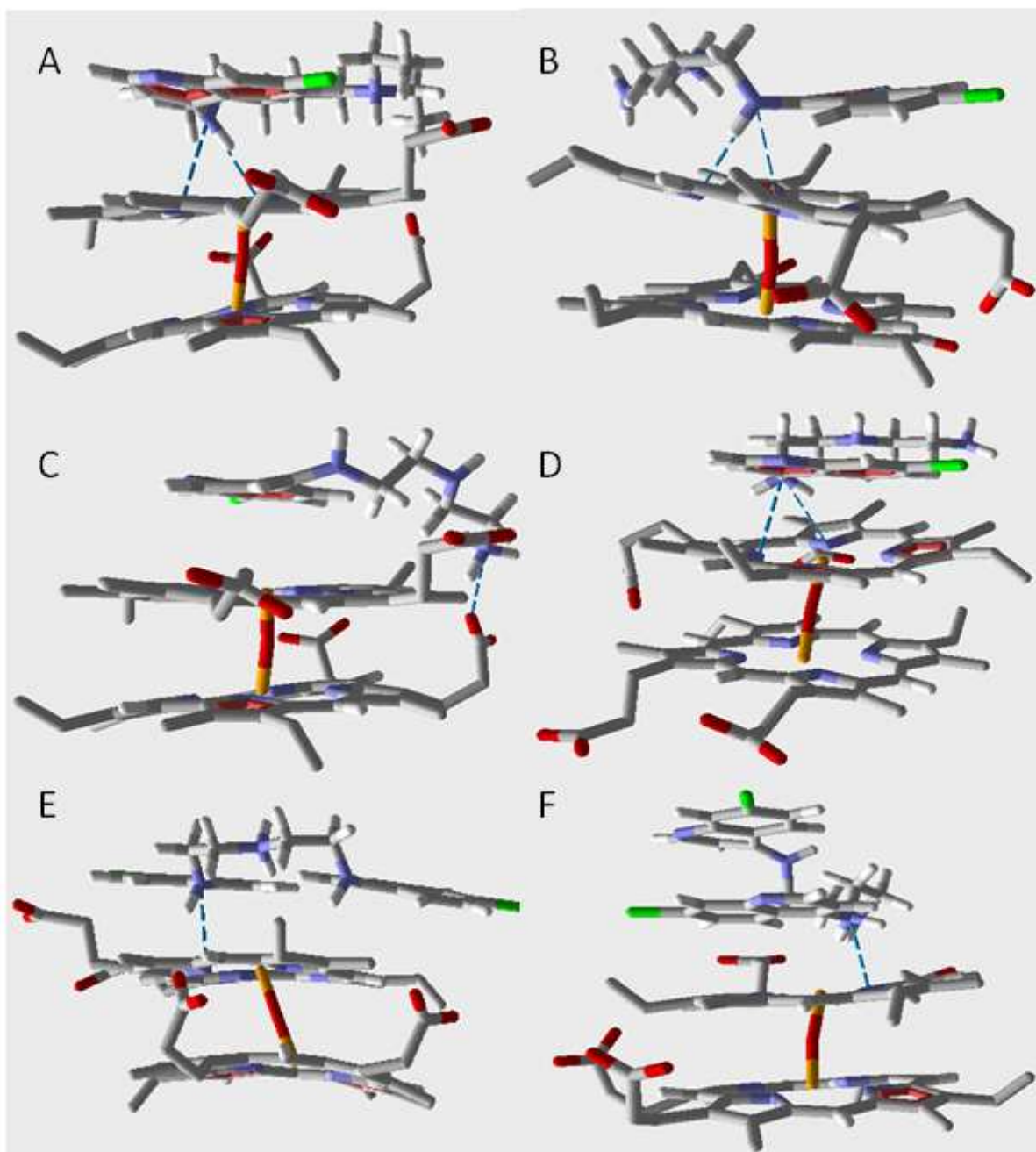


Figura 8. Compostos ancorados à hematina dimérica sendo eles: (A) Cloroquina protonada, (B) DETA-1, (C) DETA-2, (D) DETA-3, (E) DMA-1 e (F) DMA.

6. DISCUSSÃO

A luta no controle na malária começou há muitos anos, inclusive no Brasil. Segundo revisão do Professor Leônidas M. Deane (1988), entre os fatos marcantes na história da luta contra a doença destacam-se: (i) designação de Carlos Chagas, em 1905, ao porto de Santos, SP, para controlar um surto da doença, e em 1907 para combater uma epidemia de malária em Minas Gerais, na região do rio das Velhas, durante as obras de prolongamento da Estrada de Ferro Central do Brasil; (ii) início, em 1940, de uma intensa campanha, coordenada por Fred Soper, visando a erradicação do mosquito *Anopheles gambiae*, acidentalmente importado em navios vindos da África, responsável por uma grande epidemia da malária no nordeste do Brasil; (iii) chegada em 1945, do DDT e novos fármacos no Brasil. A partir desse momento, a campanha de erradicação da doença foi iniciada, liderada pela OMS em conjunto com serviços de saúde no Brasil. Milhares de casas eram borrifadas semestralmente, inclusive no sul e sudeste do país. Essa política diminuiu substancialmente o número de casos nessas regiões no entanto, somente o uso de DDT não estava sendo o suficiente para controlar a doença, principalmente no norte do Brasil. Assim, iniciou a campanha de erradicação da malária na década de 50, com o tratamento em massa dos doentes e o uso de profilaxia medicamentosa.

Esse programa começou quando o serviço Nacional de Malária tornou responsabilidade do Estado o controle da doença no Brasil. Em 1953, Mario Pinotti estabeleceu o uso do sal cloroquinado para a profilaxia da malária na região Amazônica (Deane, 1988). Como a CQ é muito higroscópica, em áreas com intensa umidade, o fármaco se hidratava, sendo depositado no fundo do saco de sal (Oliveira-Ferreira et al., 2010). Concentrações ineficazes de CQ foram assim consumidas pela população, expondo o parasito a dosagens subterapêuticas. Acredita-se que essa medida aliada ao uso da cloroquina como profilático, tenham colaborado para a seleção de cepas resistentes à CQ e outras aminoquinolinas nessa região.

A detecção de casos de pacientes infectados com parasitos resistentes ao tratamento com CQ no mundo ocorreu inicialmente na década de 60 (Wongsrichanalai et al., 2002), sendo atribuído, sobretudo, ao extenso uso desse fármaco em campanhas de erradicação da malária. O primeiro relato de *P. falciparum* CQ-resistente ocorreu nos

anos 60 na Colômbia, no vale do Rio Magdalena, seguido de outros relatos no sudeste da Ásia (Wongsrichanalai *et al.*, 2002).

A resistência à CQ está associada a mutações no gene *Pfcr*, que pertence a uma superfamília de transportadores e que está localizado no cromossomo 7. Este gene é responsável por codificar uma proteína, com 10 domínios transmembrânicos, expressa na membrana do vacúolo digestivo do parasito (Wellems e Plowe, 2001). O gene *Pfcr* foi identificado por análises de DNA através da comparação de sequências entre linhagens de *P. falciparum* CQ sensível e resistente (Djimé *et al.*, 2001; Durand *et al.*, 2001; Vieira *et al.*, 2004). Várias mutações foram observadas e associadas com a resistência a CQ em amostras de *P. falciparum* coletados de pacientes da África, da América do Sul e do sudoeste asiático. No entanto, uma mutação de substituição de uma treonina (T76) para uma lisina (K76) na posição 76 (K76T) mostrou-se presente em todas as cepas resistentes e ausentes em todos os isolados sensíveis testados *in vitro* (Carlton *et al.*, 2001). A alteração na expressão dessa proteína faz com que a CQ se torne incapaz de acumular no interior do VD e de agir contra o parasito. Alguns estudos também sugerem que esta mutação é capaz de interferir no pH do VD reduzindo, assim, a ligação da CQ ao heme (Sanchez *et al.*, 1997).

Atualmente a resistência à CQ e à maioria dos antimaláricos encontra-se disseminada por todo o mundo, inclusive na África, onde foi relatada inicialmente nos anos 80 (Winstanley *et al.*, 2004). Ocorreu a dispersão de cepas de *P. falciparum* multirresistente à maioria dos antimaláricos disponíveis, inclusive no continente africano, tornando necessária a busca de substâncias mais eficazes e com preços acessíveis (Dondorp *et al.*, 2009; Enserink, 2010).

A busca por um novo tratamento da malária deve levar em conta que as áreas malarígenas endêmicas e hiperendêmicas concentram populações de menor poder aquisitivo, sendo a transmissão da malária concentrada nos países ditos “periféricos” (Rosenthal, 2003). Apesar da resistência a CQ, a busca por análogos desse fármaco é de grande relevância, uma vez que a CQ foi o fármaco mais eficaz, menos tóxico e de menor custo para uso humano até hoje em uso, principalmente para o tratamento de malárias não *falciparum* (Yearick *et al.*, 2008; Ekoue-Kovi *et al.*, 2009; Andrews *et al.*, 2010). Além disso, tem sido sugerido que se descontinuada a pressão da CQ ocorre reversão da sensibilidade dos parasitos ao fármaco (Pereira *et al.*, 2011).

No presente trabalho, a CQ serviu de base para a síntese de dois novos análogos, DETA com um anel quinolínico e DMA com dois anéis quinolínicos. Ambas as

moléculas foram complexadas com metais, considerando que a associação a metais é uma estratégia promissora na busca de novos fármacos, devido ao seu efeito sinérgico com os compostos a ele associados, aumentando a sua eficácia (Sánchez-Delgado *et al.*, 1996; Navarro *et al.*, 1997; Navarro, 2009; Chellan *et al.*, 2010).

Os complexos metálicos são utilizados na pesquisa por medicamentos contra várias doenças, especialmente contra o câncer (Gasser *et al.*, 2011; Galanski *et al.*, 2005) bem com no desenvolvimento de novos agentes antiparasitários (Sanchez-Delgado *et al.*, 1993; Goldberg *et al.*, 1997; Delhaes *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2009; Snow *et al.*, 2005; Ajibade *et al.*, 2006; Gabbiani *et al.*, 2009). Apesar do seu potencial, há poucos exemplos de complexos metálicos eficazes contra as doenças citadas. A ferroquina (**Figura 9**) é um exemplo de sucesso na busca de antimaláricos complexados com metais, sendo sua atividade comparável a da CQ (Kreidenweiss *et al.*, 2006). Ainda não ocorreu sua resistência cruzada com a CQ. Este fato foi confirmado em experimentos para avaliar a sensibilidade antimalárica da ferroquina em cepas de *P. falciparum*, isoladas de pacientes de Camboja, resistentes a CQ e em camundongos após a indução de resistência por pressão de fármacos (Biot *et al.*, 2005; Dubar *et al.*, 2008; Biot *et al.*, 2009).

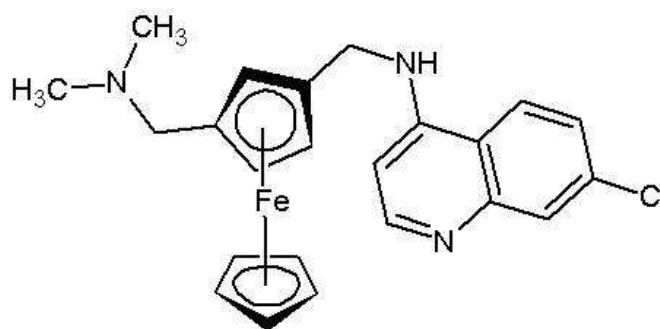


Figura 9. Estrutura da ferroquina (Biot *et al.*, 2009).

As substâncias avaliadas nesse trabalho apresentaram intensa atividade *in vitro* contra o *P. falciparum* nos métodos hipoxantina e HRPII. Em geral, no teste de incorporação de hipoxantina tritiada, DMA e seus derivados foram mais ativos que os derivados de DETA. Essa maior atividade se deve provavelmente a presença de dois anéis quinólicos na estrutura de DMA, em relação à DETA. A presença dos metais platina e paládio não aumentou a atividade dos compostos complexados. No entanto, quando DMA foi associada ao Fe sua atividade aumentou nos ensaios de hipoxantina e

HRPII, sendo maior do que a da CQ. Esse efeito se deve, provavelmente, a existência de dois anéis quinolínicos juntamente a do Fe.

Os análogos DMA Pt, DETA Pt e DETA Fe apresentaram valores de IC₅₀ menores no ensaio de HRPII, provavelmente devido ao maior tempo de incubação (72h) em relação ao ensaio de hipoxantina feito em 42h, como se observou em um estudo concluído recentemente no laboratório por Isabela Oliveira de Freitas (Dissertação mestrado, UFMG, 2011). Assim, ao testar extratos e substâncias puras de plantas contra o *P. falciparum*, ajustados para o mesmo tempo nos testes de hipoxantina e o tradicional, a mudança resultou em IC₅₀ semelhantes.

A avaliação da citotoxicidade nos programas de busca de novos fármacos é essencial e a atividade das substâncias contra o *P. falciparum* necessita ser específica e não tóxica. Para a avaliação da atividade citotóxica dos compostos foram utilizadas duas linhagens celulares de mamíferos, HepG2, procedente de um hepatoma humano e BGM, procedente do rim de macaco verde africano. O fígado e o rim são os principais órgãos envolvidos no metabolismo de fármacos e alguns estudos sugerem que o uso prolongado da CQ pode afetar a função renal de ratos (Musabayane *et al.*, 1996). Portanto, essas células foram incluídas nos testes *in vitro*.

O método de MTT avalia indiretamente a viabilidade celular através do dano na mitocôndria, uma vez que a enzima succinato desidrogenase, presente nessa organela, é responsável pela clivagem do sal tetrazólico (MTT). Essa clivagem resulta na formação de cristais de formazan, responsáveis pela coloração roxa, presente nas células vivas.

O método de vermelho neutro avalia a viabilidade celular a partir de lisossomos, pois essa organela acumula o corante. Esse se mostrou o método mais sensível na análise da toxicidade da CQ, pois esse antimalárico atua nessa organela especificamente. Expressa em MDL₅₀, a toxicidade da CQ foi duas vezes maior no ensaio de VN em relação ao de MTT.

A partir da razão entre o IC₅₀ e o MDL₅₀ calculou-se o índice de seletividade de cada composto, o que representa a relação entre a dose ativa e a dose tóxica. A literatura considera IS de pelo menos dez para que o composto seja considerado seguro (Bézivin *et al.*, 2003). É importante ressaltar que a linhagem celular HepG2 e o ensaio de MTT são os mais utilizados na literatura para avaliação da toxicidade (Fotakis e Timbrell 2006). Os sete análogos da cloroquina apresentaram altos valores de seletividade, especialmente DETA Pd com índice de seletividade de >4875, portanto, maior do que o

da CQ. Esse dado é muito promissor, uma vez que a CQ foi considerada por muito tempo como o fármaco ideal principalmente devido a sua baixa toxicidade.

Somente os compostos DETA e DMA puderam ser avaliados quanto a sua atividade antimalárica *in vivo*, pois foram os únicos produzidos em quantidades suficientes para a realização do experimento. Os dados dos testes em camundongos infectados com *P. berghei*, corroboraram com os resultados obtidos *in vitro*. Houve uma intensa redução da parasitemia nos animais tratados, além disso, a sobrevivência dos animais tratados com DETA, DMA e CQ foi aumentada em até 11 dias em relação ao grupo controle não tratado. Entretanto, a presença de dois anéis quinolínicos em DMA não resultou em sua maior atividade *in vivo* e apenas o tratamento com CQ curou os animais.

Na tentativa de elucidar possíveis mecanismos de ação dos análogos da cloroquina, foi avaliada *in vitro* a capacidade de inibição da formação de hemozoína. Utilizou-se para isso, um protocolo indireto, descrito por Kanyile e Egan (2004), o qual mimetiza o ambiente *in vivo* do vacúolo digestivo. Este teste somente é possível devido à existência de um produto químico e estruturalmente idêntico a hemozoína, a hematina sintética, conhecida como β -hematina (Blauer e Akkawi, 1995).

Após a diluição da β -hematina sintética em NaOH a mesma se dissocia em heme. Essa solução é incubada com os compostos testes em um tampão de acetato, que induz a formação de hemozoína. A quantidade de heme livre é então dosada. Quanto mais ativa a substância testada, maior a formação de heme livre, e conseqüentemente, menor a formação de hemozoína. Todos os compostos inibiram a formação de hemozoína e alguns atuaram em doses menores que a CQ (DETA, DETA Pt, DMA Pt, DETA Fe, DMA Fe). Em geral, esse dado corrobora com a atividade *in vitro*. Se analisarmos o teste de HRPII, as moléculas menos ativas *in vitro* (DMA e DETA Pd) foram as únicas que não inibiram a formação de hemozoína em todas as concentrações avaliadas.

Os resultados de inibição da formação de hemozoína *in vitro* pelos análogos da cloroquina DETA e DMA, foram confirmados através do modelo molecular de *docking*. O composto DMA apresentou maior energia de ancoramento do que CQ e DETA, possivelmente devido à presença de dois anéis quinolínicos na sua estrutura, uma vez que a atividade está relacionada com a presença do anel quinolínico, responsável por impedir a polimerização do heme (Fitch, 2004).

Baseados nos resultados do teste *in vitro* de inibição da formação de hemozoína e no teste molecular de *docking*, podemos sugerir que os análogos de CQ avaliados atuam no processo de inibição da formação de hemozoína, assim como a CQ. Além do mais, compostos que atuam por esse processo são promissores antimaláricos (Bazararte *et al.*, 2009).

Alguns estudos recentes de *docking* sugerem que a CQ e outras quinolíνας se complexam com o produto de digestão da hemozoína ligando-se no sítio ativo da enzima lactato desidrogenase do *P. falciparum* (PfLDH), inibindo essa enzima e levando a morte do parasito (**Figura 10**) (Cortopassi *et al.*, 2011). Essa rota de atuação ainda não foi estudada para os análogos metálicos de CQ, cuja atividade antiparasitária foi avaliada nesse trabalho. Seria interessante também estudar se os novos análogos da cloroquina atuam na proteína HRPII, uma vez que a mesma auxilia no processo de detoxificação do heme (Kumar *et al.*, 2007).

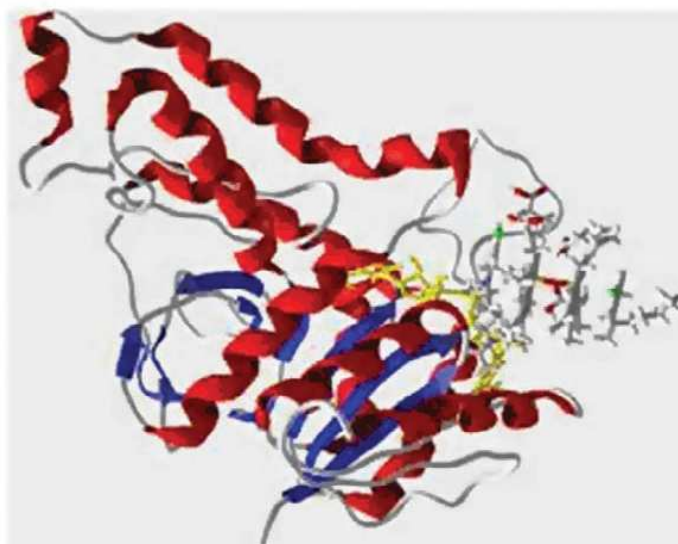


Figura 10. Ligação do complexo cloroquina-heme na enzima lactato desidrogenase (Cortopassi *et al.*, 2011).

Também não foi estudada uma possível resistência cruzada do *P. falciparum* à CQ e os novos complexos metálicos, ponto fundamental, tendo em vista a semelhança nos novos compostos com a CQ. Estudar a associação dos análogos da cloroquina com outros antimaláricos também é importante, uma vez que associação de medicamentos com diferentes mecanismos de ação diminui o surgimento da resistência (Andrade *et al.*, 2006).

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A resistência do *P. falciparum* aos antimaláricos disponíveis tem sido amplamente documentada (WHO, 2010), inclusive contra derivados da artemisinina, usados na ACT, tornando essencial a busca por fármacos ativos contra alvos específicos do parasito. Com base nos resultados obtidos com esse fim, podemos concluir que:

- ✓ Sete novos análogos da cloroquina testados apresentaram atividade contra *P. falciparum* em escala nanomolar, sendo DETA Pt; DMA Pt; DMA Fe mais ativos do que a CQ.
- ✓ Nenhum dos análogos da cloroquina apresentou toxicidade nas duas linhagens celulares testadas, sendo os valores de IS maiores para DETA Pd, com este maior do que o da CQ.
- ✓ Os análogos DETA e DMA foram ativos contra *P. berghei* em camundongos, sendo o DETA o mais promissor.
- ✓ O mecanismo de ação dos compostos testados depende, pelo menos em parte, da sua capacidade de inibir a formação de hemozoína, hipótese confirmada pelo ensaio *in vitro* e pelo estudo molecular de *docking*.
- ✓ As perspectivas são as seguintes: (i) Avaliar *in vitro* a atividade dos análogos da cloroquina em outras cepas do *P.falciparum*, sensíveis ou resistentes a CQ; (ii) testar a atividade dos análogos da cloroquina em isolados de parasitos de pacientes; (iii) selecionar os compostos mais ativos para estudar mecanismos de resistência, com *P. falciparum* submetido à pressão de fármacos, avaliando-se os genes envolvidos na resistência dos parasitos aos compostos; (iv) avaliar a atividade antiplasmodial dos análogos da cloroquina complexados com metais, em camundongos infectados com *P. berghei*; (v) avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão envolvidas na malária grave, em camundongos infectados com a cepa ANKA de *P. berghei*, antes e após a administração dos compostos.

8. REFERÊNCIAS

- Agrawal R., Tripathi R., Tekwani B. L., S. K. Jain S. K., Dutta G.P., Shukla P. 2002. Haem polymerase as a novel target of antimalarial action of cyproheptadine. *Biochemical Pharmacology* 64: 1399-1406.
- Ajibade P. A., Kolawole G. A., Brien P. O., Helliwell M. 2006. Synthesis and characterization of Ni(II), Pd(II) and Pt(II) complexes of 2,4-diamino-5-(3, 4, 5-trimethoxybenzyl) pyrimidine complexes. *J Coord Chem* 59:1621-1628.
- Andrade A. A., de Pilla Varotti F., de Freitas I. O., de Souza M. V., Vasconcelos T. R., Boechat N., Krettli A.U. 2006. Enhanced activity of mefloquine and artesunic acid against *Plasmodium falciparum* *in vitro* and *P. berghei* in mice by combination with ciprofloxacin. *Eur J Pharmacol* 588:194-198.
- Andrade-Neto V. F., Brandão M. G, Stehmann J. R., Oliveira L. A., Krettli A. U. 2003. Antimalarial activity of Cinchona-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. *J Ethnopharmacol* 87:253-256.
- Andrews S., Burgess S. J., Skaalrud D., Kelly J. X., Peyton D. H. 2010. Reversal agent and linker variants of reversed chloroquines: activities against *Plasmodium falciparum*. *J Med Chem* 53: 916–919.
- Aydin-Schmidt B., Thorsell W., Wahlgren M. 2010. Carolus Linnaeus, the ash, worm-wood and other anti-malarial plants. *Scand J Infect Dis.* 42:941-942.
- Barazarte A., Lobo G., Gamboa N., Rodrigues J. R., Capparelli M. V., Alvarez-Larena A., López S. E., Charris J. E. 2009. Synthesis and antimalarial activity of pyrazolo and pyrimido benzothiazine dioxide derivatives. *Eur J Med Chem.*44:1303-1310
- Batra S., Sabnis Y. A., Rosenthal P. J., Avery M. A. 2003. Structure-based approach to falcipain-2 inhibitors: synthesis and biological evaluation of 1,6,7-trisubstituted dihydroisoquinolines and isoquinolines. *Bioorg. Med Chem* 11:2293-2299.
- Bézivin C., Tomasi S., Lohézic-Le F.D., Boustie J. 2003. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine* 10:499-503.
- Biot C., Chavain N., Dubar F., Pradines B., Trivelli X., Brocard J., Forfar I., Dive D. 2009. Structure–activity relationships of 4-N-substituted ferroquine analogues: Time to re-evaluate the mechanism of action of ferroquine. *J Organomet Chem* 694: 854-854.
- Biot C., Taramelli D., Forfar-Bares I., Maciejewski L. A., Boyce M., Nowogrocki G., Brocard J. S., Basilico N., Olliaro P., Egan T. J. 2005. Insights into the mechanism of action of ferroquine. Relationship between physicochemical properties and antiplasmodial activity. *Mol. Pharmaceutics* 2: 185–193.

- Blauer G e Akkawi M. 1995. B-hematin. *Biochem Mol Biol Int.* 35:231-235.
- Borenfreund E., Babicha H., Martin-Alguacila N. 1987. Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays—The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicology in vitro.* 2:1-6
- Bray P. G., Ward S. A., O'Neill P. M. 2005. Quinolines and artemisinin: chemistry, biology and history. *Curr Top Microbiol Immunol* 295:33-38.
- Calvo-Calle J., Moreno A., Eling W., Nardin E. 1994. *In vitro* development of infectious liver stages of *P. yoelii* and *P. berghei* malaria in human cell lines. *Exp Parasitol* 79:362-373.
- Carlton J. M., Fidock D. A., Djimdé A. C., Plowe V., Wellems T. E. 2001. Conservation of a novel vacuolar transporter in *Plasmodium* species and its central role in chloroquine resistance of *P. falciparum*. *Curr Opin Microbiol* 4:415-420.
- Chellan, P., Nasser, S., Vivas, L., Chibale, K., Smith G. S. 2010. Cyclopalladated complexes containing tridentate thiosemicarbazone ligands of biological significance: Synthesis, structure and antimalarial activity. *J. Organomet. Chem.* 695:2225-2232.
- Churchill P. 1985. Second messengers in renin secretion. *Am J Physiol* 249:F175-184.
- Cortopassi WA, Oliveira AA, Guimaraes AP, Renno MN, Krettli AU, Franca TC. 2011. Docking studies on the binding of quinoline derivatives and hematin to *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase. *J Biomol Struct Dyn.* 29: 207:218
- Cox-Singh J., Hiu J., Lucas S. B., Divis P. C., Zulkarnaen M., Chandran P., Wong K. T., Adem P., Zaki S. R., B. Singh., Krishna S. 2010. Severe malaria - a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: a case report. *Malar J* 9:10.
- Cox-Singh J and Singh B. 2008. *Knowlesi* malaria: newly emergent and of public health importance? *Trends Parasitol* 24:406-410.
- Da Silva M. L., da Silva A. G., Batista P. R., Figueroa-Villar J. D., Pascutti P. G. França T. C. C. 2010. Design, Docking Studies and Molecular Dynamics of new Potential Selective Inhibitors of *Plasmodium Falciparum* Serine Hydroxymethyltransferase. *Mol. Sim.* 36: 5-14.
- de Andrade-Neto V. F., Goulart M. O., da Silva Filho J.F., da Silva M. J., Pinto C., Pinto A.V., Zalis M., Carvalho L. H., Krettli A. U. 2004. 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* 14:1145-1149.
- Deane L. M. 1988. Malaria studies and control in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 38: 223-30.

Delhaes L., Abessolo H., Biot C., Berry L., Delcourt P., Maciejewski L., Brocard J., D. Camus., D. Dive. 2001. *In vitro* and *in vivo* antimalarial activity of ferrochloroquine, a ferrocenyl analogue of chloroquine against chloroquine-resistant malaria parasites. *Parasitol Res* 87: 239-244.

Denizot F and Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89:271-277.

Djimé A., Doumbo O. K., Cortese J. F., Kayentao K., Doumbo S., Diourté Y., Dicko A., Su X. Z., Nomura T., Fidock D. A., Wellems T. E., Plowe C. V., Coulibaly D. 2001. A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *N Engl J Med* 344:257-263.

de Ridder S., Van der Kooy F., Verpoorte R. 2008. *Artemisia annua* as a self-reliant treatment for malaria in developing countries. *J Ethnopharmacol* 120:302-314.

Desjardins R., Canfield C. J. Haynes J. D, Chulay J. D. 1979. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother* 16:710-718.

Dondorp A. M., Nosten F., Yi P., Das D., Phyto A. P., Tarning J., Lwin K. M., Ariey F., Hanpithakpong W., Lee S. J., Ringwald P., Silamut K., Imwong M., Chotivanich K., Lim P., Herdman T., An S. S., Yeung S., Singhasivanon P., Day N. P., Lindegardh N., Socheat D., White N. J. 2009. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 361:455-467.

Durand R., Jafari S., Vauzelle J., Delabre J. F, Jesic Z., Le Bras J. 2001. Analysis of pfcrt point mutations and chloroquine susceptibility in isolates of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 114:95-102.

Dubar F., Khalife J., Brocard J., Dive D., Biot C. 2008. Ferroquine, an ingenious antimalarial drug – thoughts on the mechanism of action. *Molecules* 13: 2900.

Dyer M e Day K. P. 2000. Commitment to gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today*. 16:102-107.

Eckman J. R e Eaton J.W. 1979. Dependence of plasmodial glutathione metabolism on the host cell. *Nature*. 278:754-756.

Egan T. J 2007. Hemozoin formation. *Mol Biochem Parasitol*. 157:127-136.

Ekoue-Kovi K., Yearick K., Iwaniuk D. P., Natarajan J. K., Alumasa J., de Dios A. C., Roepe P. D., Wolf C. 2009. Synthesis and antimalarial activity of new 4-amino-7-chloroquinolyl amides, sulfonamides, ureas and thioureas. *Bioorg Med Chem* 17: 270–283.

- Enserink M. Global public health. What's next for disease eradication? 2010. *Science*. 330:1736-1739
- Fitch C. D. 2004. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life Sci* 74:1957-1972.
- Fotakis G e Timbrell J. A. 2006. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 160:171-177.
- Freita I. O. 2011. Atividade antimalárica de bioprodutos de plantas medicinais Brasileiras ou moléculas sintetizadas avaliadas contra *P.falciparum in vivo* e contra *P. berghei in vivo*. Dissertação- Farmacologia Bioquímica e molecular.
- Gabbiani C., Messori L., Cinellu M. A., Casini A., Mura P., Sannella A. R., Severini C., Majori G., Bilia A. R., Vincieri F. F. 2009. Outstanding plasmodicidal properties within a small panel of metallic compounds: Hints for the development of new metal-based antimalarials. *J Inorg Biochem* 103: 310-312.
- Galanski M., Michael A., Jakupec., Keppler B. K. 2005. Update of the Preclinical Situation of Anticancer Platinum Complexes: Novel Design Strategies and Innovative Analytical Approaches. *Curr Med Chem* 12: 2075-2094.
- Gallup J. L e Sachs J. D. 2001. The economic burden of malaria. *Am J Trop Med Hyg* 64:85-96.
- Gasser G., Ott, I., Metzler-Nolte N. 2011. Organometallic Anticancer Compounds. *J. Med. Chem.* 54: 3-25.
- Gehlhaar D. K., Verkhivker G., Rejto P. A., Fogel D. B., Fogel L.J., Freer S. T. 1995. Docking Conformationally Flexible Small Molecules into a Protein Binding Site through Evolutionary Programming. *Proceedings of the Fourth International Conference on Evolutionary Programming* 615-627.
- Genton B., Acremont V. D., Rare L., Baea K., Reeder J. C., Alpers M. P., Müller I. 2008. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Med* 5:126-127.
- Ginsburg H., Ward S. A., Bray P. G. 1999. An integrated model of chloroquine action. *Parasitol Today* 15:357-360.
- Goldberg D. E., Sharma V., Oksman A., Gluzman I.Y., Wellems T.E., Piwnicka-Worms D., 1997. Probing the chloroquine resistance locus of *Plasmodium falciparum* with a novel class of multidentate metal (III) coordination complexes. *J Biol Chem* 272:6567-6572.
- Gueirard P., J. Tavares S., Thiberge F., Bernex T., Ishino G., Milon B., Franke-Fayard C. J., Janse R., Ménard R., AminoR. 2010. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:18640-18645.

Hanafi-Bojd A. A., Vatandoost H., Oshaghi M. A., Haghdoost A. A., Shahi M., Sedaghat M. M., Abedi F., Yeryan M., Pakari A. 2011. Entomological and epidemiological attributes for malaria transmission and implementation of vector control in southern Iran. *Acta Tropica*

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. 2009. A world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2007. *PLoS Med* 6:e1000048.

Kanyile K e Egan T. J. 2004. A colorimetric high-throughput b-hematin inhibition screening assay for use in the search for antimalarial compounds. *Analytical Biochemistry* 338:306–319

Kocken C. H., Dubbeld M. A., Van Der Wel A., Pronk J. T., Waters A. P., Langermans J. A., Thomas A.W. 1999. High-level expression of *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1) in *Pichia pastoris*: strong immunogenicity in *Macaca mulatta* immunized with *P. vivax* AMA-1 and adjuvant SBAS2. *Infect Immun.* 67:43-49.

Koncarevic S., Bogumil R., Becker K. 2007. SELDI-TOF-MS analysis of chloroquine resistant and sensitive *Plasmodium falciparum* strains. *Proteomics* 7:711-721.

Kreidenweiss A., Kremsner P. G., Dietz K., Mordmuller B. 2006. *In vitro* activity of ferroquine (SAR97193) is independent of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 75:1178–1181.

Krettli A.U. e Miller L. 2001. Malaria: a sporozoite runs through it. *Curr Biol* 11:409-412.

Krotoski W. A., Garnham P. C. C., Bray R. S., Krotoski D. M., Kiillick- Kendrick R., Draper C. C., Targett G. A. T., Guy M. W. 1982. 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. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 31:24–35.

Kumar S., Guhaa M., Choubeya V., Maitya P., Bandyopadhyay U., Antimalarial drugs inhibiting hemozoin (β -hematin) formation: A mechanistic update. 2007. *Life Sciences* 80:813-828.

Lambros C. e Vanderberg J. 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* 65:418-420.

Li, Y. e Wu Y. L. 2003. An over four millennium story behind qinghaosu (artemisinin)-a fantastic antimalarial drug from a traditional chinese herb. *Curr Med Chem* 10:2197-2230.

Lin J. T., Juliano J. J., Wongsrichanalai C. 2010. Drug-Resistant Malaria: The Era of ACT. *Curr Infect Dis Rep.* 12:165-173.

Madureira M. C., Martins A. P., Gomes M., Paiva J., Proença da Cunha A., Rosário V. 2002. Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S Tomé and Príncipe islands. *J. Ethnopharmacol* 8:23–29.

Martin R. E., Marchetti R. V., Cowan A. I., Howitt S. M., Bröer S., Kirk K. 2009. Chloroquine transport via the malaria parasite's chloroquine resistance transporter. *Science* 325:1680-1682.

Ministério da Saúde, 2010. 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. Acessado em: 03/nov/2010.

Mota M., Pradel G., Vanderberg J., Hafalla J., Frevort U., Nussenzweig R., Nussenzweig V., Rodríguez A. 2001. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science* 291:141-144.

Mueller I., Galinski M. R., Baird J. K., Carlton J. M., Kochar D. K., Alonso P. L., del Portillo H. A. 2009. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis* 9:555-566.

Musabayane C. T., Windle R. J., Forsling, M. L., Balment R. J. 1996. Arginine vasopressin mediates the chloroquine induced increase in renal sodium excretion. *Trop Med Int Health* 1:542-550.

Nardin E.H. e Nussenzweig R.S. 1993. T cell responses to pre-erythrocytic stages of malaria: role in protection and vaccine development against pre-erythrocytic stages. *Annu Rev Immunol.* 11:687-727

Navarro M. 2009. Gold complexes as potential anti-parasitic agents. *Coordination Chemistry Reviews* 253:619–1626

Navarro, M., Pérez, H., Sánchez-Delgado R. A.1997. Toward a Novel Metal-Based Chemotherapy against Tropical Diseases. 3.Synthesis and Antimalarial Activity *in vitro* and *in Vivo* of the New Gold-Chloroquine Complex [Au(PPh₃)(CQ)]PF₆. *J. Med. Chem.* 40: 1937-1939.

Noedl H. C., Wongsrichanalai R., Miller K., Myint S., Looareesuwan Y., Sukthana V., Wongchotigul H., Kollaritsch G., Wiedermann W., Wernsdorfer. 2002. *Plasmodium falciparum*: effect of anti-malarial drugs on the production and secretion characteristics of histidine-rich protein II. *Exp Parasitol* 102:157-163.

Okell L. C., Drakeley C. J., Bousema T., Whitty C. J., Ghani. A. C. 2008. Modelling the impact of artemisinin combination therapy and long-acting treatments on malaria transmission intensity. *PLoS Med* 5:226

Olliaro P. L., Goldberg D. E. 1995. The *Plasmodium* digestive vacuole: metabolic headquarters and choice drug target. *Parasitol Today.* 11: 294-297.

Oliveira-Ferreira J., Lacerda M. V., Brasil P., Ladislau J. L., Tauil P. L., Daniel-Ribeiro C. T. 2010. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J.* 2010 109-115.

Orjih A.U. 1997. Heme polymerase activity and the stage specificity of antimalarial action of chloroquine. *J Pharmacol Exp Ther* 282:108-112

Patchen L. C., Campbell C. C., Williams S. B. 1989. Neurologic reactions after a therapeutic dose of mefloquine. *N Engl J Med* 321:1415-1416.

Pereira M. R., Henrich P. P., Sidhu A. B., Johnson D., Hardink J., Van Deusen J., Lin J., Gore K., O'Brien C., Wele M., Djimde A., Chandra R., Fidock D. A. 2011. *In vivo* and *in vitro* antimalarial properties of azithromycin-chloroquine combinations that include the resistance reversal agent amlodipine. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:3115-24.

Poespoprodjo J. R., Fobia W., Kenangalem E., Lampah D. A., Hasanuddin A., Warikar N., Sugiarto P., Tjitra E., Anstey N. M., Price R. N. 2009. *Vivax* malaria: a major cause of morbidity in early infancy. *Clin Infect Dis* 48:1704-1712.

Price R. N., Nosten F. 2001. Drug resistant falciparum malaria: clinical consequences and strategies for prevention. *Drug Resist Updat.* 4:187-96.

Radfar A., Diez A., Bautista. J. M. 2008. Chloroquine mediates specific proteome oxidative damage across the erythrocytic cycle of resistant *Plasmodium falciparum*. *Free Radic Biol Med* 44:2034-2042.

Ridley R. G. 2002. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature* 415:686-693.

Rosenthal P. J. 2003. Antimalarial drug discovery: old and new approaches. *J Exp Biol* 206:3735-3744.

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

Sanchez C. P, Wünsch S, Lanzer M. 1997. Identification of a chloroquine importer in *Plasmodium falciparum*. Differences in import kinetics are genetically linked with the chloroquine-resistant phenotype. *J Biol Chem.*;272: 2652-8.

Sánchez-Delgado R. A., Lazard K., Rinch L., Urbina J., Hubert A. J., Noels A. N. 1993. Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 1. Enhancement of the efficacy of clotrimazole against *Trypanosoma cruzi* by complexation to ruthenium in RuCl₂(clotrimazole)₂. *J Med Chem* 36:2041-243.

Sánchez-Delgado R. A., Navarro M., Pérez H., Urbina J. A. 1996. Toward a Novel Metal-Based Chemotherapy against Tropical Diseases. 2. Synthesis and Antimalarial Activity *in vitro* and *in Vivo* of New Rutheniumand. *J. Med. Chem.* 39: 1095-1099.

Secretaria de Vigilância Sanitária - SVS. 2009. Malária no Brasil. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/situacao_da_malaria_site_svs_28_12.pdf. Acessado em: 11/mai/2011.

Secretaria de Vigilância Sanitária - SVS. 2008. Situação Epidemiológica. Disponível em: http://dw.saude.gov.br/portal/page/portal/sivep_malaria?Ano_n=2008. Acessado em: 11/mai/2011.

Sijwali P. S., Shenai B. R., Gut J., Singh A., and Rosenthal P. J.. 2001. Expression and characterization of the *Plasmodium falciparum* haemoglobinase falcipain-3. *Biochem J* 360:481-489.

Snow R.W., Guerra C. A., Noor A. M., Myint H.Y., Hay S.I. 2005. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 434:214-217.

Stephen M. W. e Stuart M. L 2000. Chloroquine Interferes with Lipopolysaccharide - Induced TNF- α Gene Expression by a Nonlysosomotropic Mechanism. *J Immunol.*165:1534-40.

Stepniewska K. e White N. J. 2008. Pharmacokinetic determinants of the window of selection for antimalarial drug resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1589-1596.

Sturm A., Amino R., van de Sand C., Regen T., Retzlaff S., Rennenberg A., Krueger A., Pollok J.M., Menard R., Heussler V.T. 2006. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 313:1287-1290

Sullivan D. J. 2002. Theories on malarial pigment formation and quinoline action. *Int J Parasitol* 32:1645-1653.

Sweeney A. W. 2000. Wartime research on malaria chemotherapy. *Parassitologia* 42:33-45.

Trager W e J. Jensen. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193:673-675.

Tauil P.L. 2006. Perspectives of vektor borne diseases control in Brazil. *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 29:275-277

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

Vieira P. P., Ferreira M. U., Alecrim M. G., Alecrim W. D., da Silva L. H., Sihuinha M. M, Joy D. A., Mu J., Su X. Z, Zalis M. G. 2004. pfcrt Polymorphism and the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* populations across the Amazon Basin. *J Infect Dis* 190:417-424.

Wang C., Qin X., Huang B., He F., Zeng C. 2010. Hemolysis of human erythrocytes induced by melamine-cyanurate complex. *Biochem Biophys Res Commun* 402:773-777.

Wellems T. E. e Plowe C. V. 2001. Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis* 184:770-776.

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

White N. J. 2008. Qinghaosu (artemisinin): the price of success. *Science* 320:330-334.

WHO. 2006. Guidelines for the treatment of malaria. World Health Organization. Disponível em: <http://apps.who.int/malaria/docs/TreatmentGuidelines2006.pdf>. Acessado em: 21/fev/2011

WHO. 2009. Guidelines for the treatment of malaria, second edition. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547925_eng.pdf. Acessado em: 04/nov/2010.

WHO. 2010. Key malaria facts. Disponível em: <http://rbm.who.int/keyfacts.html>. Acessado em: 04/nov/2010.

Winstanley P., Ward S., Snow R., Breckenridge A. 2004. Therapy of *falciparum* malaria in sub-saharan Africa: from molecule to policy. *Clin Microbiol.*17:612-37.

Wongsrichanalai C., Pickard A., Wernsdorfer W., Meshnick S. 2002. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis* 2:209-218.

Wykes M. and Good M. F.2007. A case for whole-parasite malaria vaccines. *Int J Parasitol.* 31:705-12.

Yang J. e Chen C. 2004. GEMDOCK: A generic evolutionary method for molecular docking. *Proteins* 55:288-304.

Yearick K., Ekoue-Kovi K., Iwaniuk D. P., Natarajan J. K., Alumasa J., de Dios A. C., Roepe P. D., Wolf C. 2008. Overcoming drug resistance to heme-targeted antimalarials by systematic side chain variation of 7-chloro-4-aminoquinolines. *J Med Chem* 51: 1995–1998.