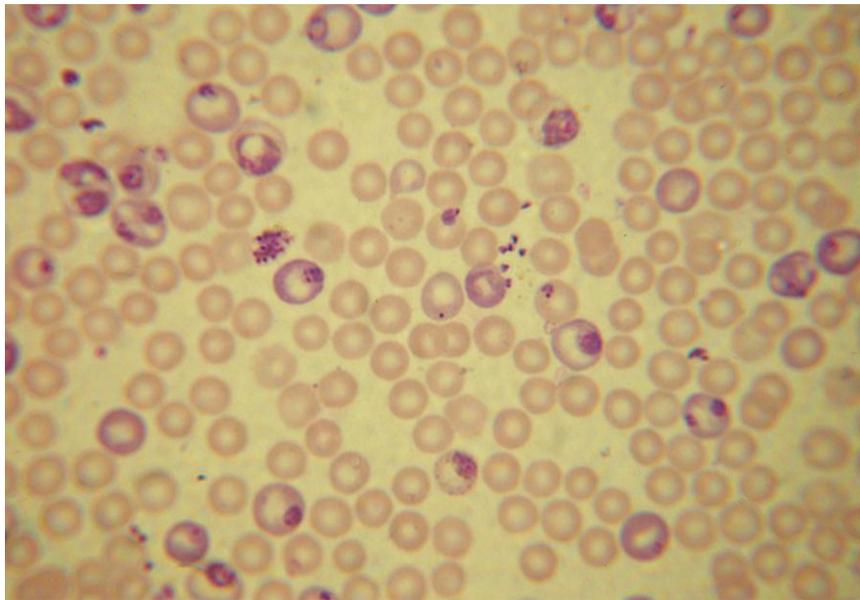


UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM IMUNOLOGIA, GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA
Área de concentração: Imunologia

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL DE ANÁLOGOS
DA CLOROQUINA**



Nicolli Bellotti de Souza

Juiz de Fora, 2011

Nicolli Bellotti de Souza

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL DE ANÁLOGOS
DA CLOROQUINA**

**Dissertação de Mestrado do Curso
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências
Biológicas na área de Imunologia**

Orientadora: Prof. Dra. Clarice Abramo

Co-orientador: Prof. Dr. Adilson David da Silva

Juiz de Fora, 2011

Souza, Nicolli Bellotti de

Avaliação da atividade antiplasmodial de análogos da cloroquina /
Nicolli Bellotti de Souza. – 2011.
113 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Imunologia)—Universidade Federal de Juiz
de Fora, Juiz de Fora, 2011.

1. Malária. 2. Cloroquina.. I. Título.

CDU 616.936

SOUZA, N.B. Avaliação da atividade antiplasmodial de análogos da cloroquina, 2011. 113 f. Dissertação de Mestrado (Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora.

DEDICATÓRIA

Dedico este sucesso em mais uma etapa a todos aqueles que de alguma forma me inspiraram, auxiliaram e dele participaram, em especial aos mestres.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus e a todas as entidades iluminadas por sempre estarem comigo.

À minha família, por me acompanharem incondicionalmente nesta caminhada (domingo, feriado e dia santo!), torcendo por mim.

À minha orientadora, Prof. Clarice: pela oportunidade, paciência, dedicação, conselhos e ensinamentos. Serei eternamente grata a você por ter me aberto uma porta, me ajudado a trilhar meu caminho acadêmico, lapidando o meu potencial científico.

Ao meu co-orientador, Prof. Adilson: não somente por orientar a síntese dos compostos que foram objeto deste trabalho, mas também por participar neste meu processo de “aprimoramento científico”, com suas sugestões práticas, dinâmicas e objetivas.

À Prof. Elaine, por sempre me ajudar quando a ela recorri e também por ter me concedido a primeira oportunidade no Laboratório de Parasitologia.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Parasitologia-UFJF, em especial à Ivone, Flávia e Luciana por tantos momentos de alegria; ao pessoal da malária (Davi, Raphaela e Luana) pela ajuda e em especial à Marcela, por ter sido meu “braço direito” durante muito tempo. À Arturene, que também se tornou uma colega de trabalho e por curto período membro do nosso laboratório, o que me rendeu uma amizade.

À Sandra, sempre muito prestativa, por ter me ajudado com os ensaios de ELISA.

À Prof. Jacy, por sempre me socorrer com minhas “dúvidas imunológicas” e participar da minha banca de qualificação, com suas sugestões valiosíssimas.

Ao Prof. Márcio Alves, por ter me ajudado com a estatística, com muita boa vontade e paciência.

Aos meus queridos amigos, tanto aqueles companheiros da vida científica (Michelle, Thiago-Patrick; Felipe-Fester e Víctor), como também os que se encerram no “departamento extra-científico”, dentre estes em especial Gabriela e Giselle – que sempre torceram muito por mim – e vários outros que ocupam lugar essencial na minha vida.

À Universidade Federal de Juiz de Fora.

Ao Programa de Pós-Graduação de Imunologia, Genética e Biotecnologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo fomento.

Aos camundongos, minhas ferramentas de estudo, que doaram suas vidas pelo progresso da ciência.

A TODOS VOCÊS, MUITO OBRIGADA! Vocês foram peças fundamentais dessa conquista!

RESUMO

A malária é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e é responsável por 250 milhões de casos e 1 milhão de mortes anualmente. Um dos principais empecilhos para o controle da doença é o desenvolvimento de resistência do parasito aos fármacos comumente usados, o que torna urgente a pesquisa por novos antimaláricos. Nesse contexto, análogos de cloroquina acoplados a 6-mercaptopurina e a alquil aminas e complexos de platina foram avaliados quanto a atividade antimalárica utilizando o teste supressivo descrito por Peters em modelo murino de infecção por *Plasmodium berghei* NK65. Tais análogos exibiram altos valores de supressão da parasitemia, entre 60% e 94% em comparação com o controle não tratado. Considerando o papel imunossupressor de derivados de purina, o análogo de cloroquina acoplado a 6-mercaptopurina MPQUI foi avaliado quanto a aspectos imunológicos (contagem de leucócitos específicos, dosagem de TNF- α e IL-10), não interferindo na resposta imune tendo como base os parâmetros analisados. Portanto, esses análogos devem ser objetos de futuras pesquisas, podendo fornecer novos antimaláricos, já que apresentaram-se promissores e não influenciaram a resposta imune nos parâmetros analisados.

Palavras-chave: Malária. *Plasmodium berghei*. Atividade antimalárica. Análogos de cloroquina. Alquil-aminas. Complexos de Platina. 6-mercaptopurina.

ABSTRACT

Malaria is caused by protozoan parasites of the genus *Plasmodium* and is responsible for 250 million cases and 1 million deaths annually. One of the main obstacles for the disease control is the development of resistance by the parasite to the commonly used antimalarials, what makes the research for new ones urgent. In this context, chloroquine analogs attached to 6-mercaptopurine and to alkyl-amines and platinum complexes were evaluated for their antimalarial activity using the 4-day suppressive test described by Peters which was carried out in mice infected with *Plasmodium berghei* NK65. These analogs exhibited high values of parasitemia suppression, which ranged from 60% to 94% in comparison to untreated control. Considering the immune suppressor role of purine derivatives, the chloroquine analog attached to 6-mercaptopurine MPQUI was evaluated for immunological aspects (specific leukocytes count, TNF- α and IL-10 measurements in sera of mice), revealing no interference in the immune response considering these parameters. Therefore, these analogs may be objects of further research, aiming at new antimalarials, since they were shown to be promising and did not influence the immune response in the parameters analyzed.

Keywords: Malaria. *Plasmodium berghei*. Antimalarial activity. Chloroquine analogs. Alkyl-amines. Platinum complexes. 6-mercaptopurine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1- Distribuição da transmissão da malária no mundo | 11 |
| Figura 2- Fêmea de <i>Anopheles</i> spp. realizando repasto sanguíneo | 12 |
| Figura 3- Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> sp. | 14 |
| Figura 4- (a) Cloroquina, amodiaquina e primaquina: análogos de quinolinas comumente usados no tratamento da malária. (b) adenina e guanina: purinas essenciais; azatioprina e 6-mercaptopurina: purinas utilizadas no tratamento do câncer ou como imunossuppressores | 18 |
| Figura 5- Estrutura dos derivados avaliados neste trabalho, evidenciando a parte de quinolina presente na estrutura da cloroquina. Figura 5a- derivados do grupo 1 (análogos da cloroquina acoplados a 6-mercaptopurina); 5a.1: MPQUI; 5a.2: MPQUI propil; 5a.3: MPQUI pentil. Figura 5b- derivados do grupo 2; 5b.1: análogos da cloroquina acoplados a alquil-aminas; 5b.2: análogos da cloroquina complexados com platina..... | 26 |
| Figura 6- Supressão da parasitemia decorrente do tratamento com os compostos análogos de quinolina acoplados à 6-mercaptopurina nas diferentes dosagens em comparação com a cloroquina | 36 |
| Figura 7a- Médias das parasitemias nos grupos tratados com MPQUI nas diferentes dosagens. Cada grupo continha 5 camundongos. 7a.1- 5mg/Kg; 7a.2- 10mg/Kg; 7a.3- 25mg/Kg | 37 |
| Figura 7b- Médias das parasitemias nos grupos tratados com MPQUI propil nas diferentes dosagens. Cada grupo continha 5 camundongos. 7b.1- 5mg/Kg; 7b.2- 10mg/Kg; 7b.3- 25mg/Kg; 7b.4- 50mg/Kg | 38 |

Figura 7c- Médias das parasitemias nos grupos tratados com MPQUI pentil nas diferentes dosagens. Cada grupo continha 5 camundongos. 7c.1- 5mg/Kg; 7c.2- 10mg/Kg; 7c.3- 25mg/Kg; 7c.4- 50mg/Kg 39

Figura 8- Dosagem de TNF- α em soro de grupos de camundongos suíços infectados com *Plasmodium berghei* NK65 e tratados com MPQUI em várias dosagens. Cada grupo continha 5 camundongos..... 42

Figura 9- Dosagens de TNF- α em soro de grupos de camundongos suíços não infectados e tratados com MPQUI nas várias dosagens. Cada grupo continha 5 camundongos. Não houve significância estatística entre nenhum grupo 43

Figura 10- Dosagens de IL-10 em soro de grupos de camundongos suíços infectados com *Plasmodium berghei* NK65 e tratados com MPQUI em várias doses. Cada grupo continha 5 camundongos. 44

Figura 11 - Dosagens de IL-10 em soro de grupos de camundongos suíços não infectados e tratados com MPQUI em várias dosagens. Cada grupo continha 5 camundongos..... 45

Figura 12- Contagem de leucócitos específicos de camundongos suíços infectados com *Plasmodium berghei* NK65 e tratados com MPQUI. Cada grupo continha 5 camundongos. a- controle não tratado; b- controle tratado; c- MPQUI 100mg/Kg; d- MPQUI 50mg/Kg; e- MPQUI 25mg/Kg; f- MPQUI 10mg/Kg; g- MPQUI 5mg/Kg; h- MPQUI 1mg/Kg 47

Figura 13- Contagem diferencial de leucócitos de camundongos suíços não infectados e tratados com MPQUI. Cada grupo continha 5 camundongos. a- controle não tratado; b- controle tratado; c- MPQUI 10mg/Kg; d- MPQUI 5mg/Kg; e- MPQUI 1mg/Kg 49

Figura 14- Índices de massa de fígado e baço de camundongos suíços infectados com *Plasmodium berghei* NK65 e tratados com os análogos de

quinolina acoplados a 6-mercaptopurina. Cada grupo continha 5 camundongos. a- MPQUI; b- MPQUI propil; c- MPQUI pentil 50

Figura 15- Supressão da parasitemia decorrente do tratamento com os análogos de quinolina acoplados a alquil - aminas e complexos de platina nas várias doses em comparação com a cloroquina. a- compostos acoplados a alquil - aminas a 10mg/Kg; b- compostos acoplados a alquil – aminas a 25mg/Kg; c- compostos complexados com platina a 10mg/Kg..... 53

Figura 16- Médias das parasitemias dos grupos tratados com os análogos de quinolina acoplados a alquil aminas e complexos de platina. Cada grupo continha 5 camundongos. a- experimento 1; b- experimento 2; c- experimento 3..... 54

Figura 17- Índices de massa de fígado e baço de camundongos suíços infectados com *Plasmodium berghei* NK65 e tratados com os análogos de quinolina acoplados a alquil-aminas e complexos de platina. Cada grupo continha 5 camundongos. a- experimento 1; b- experimento 2; c- experimento 3 57

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Estrutura dos análogos de quinolina acoplados a 6-mercaptopurina | 27 |
| Tabela 2- Estrutura dos análogos de quinolina acoplados a alquil aminas e seus complexos de platina | 28 |
| Tabela 3- Supressão da parasitemia induzida pelo tratamento com os compostos análogos de quinolina acoplados a 6-mercaptopurina contra <i>Plasmodium berghei</i> NK65 | 35 |
| Tabela 4- Mortalidade dos camundongos infectados e não infectados com <i>Plasmodium berghei</i> NK65 ao longo do tratamento com MPQUI (mortos/vivos) | 40 |
| Tabela 5- Concentrações de TNF- α em soro de grupos de camundongos suíços infectados com <i>Plasmodium berghei</i> NK65 e tratados com MPQUI | 41 |
| Tabela 6- Concentrações de TNF- α em soro de camundongos suíços não infectados e tratados com MPQUI | 42 |
| Tabela 7- Concentrações de IL-10 em soro de camundongos suíços infectados com <i>Plasmodium berghei</i> NK65 e tratados com MPQUI | 44 |
| Tabela 8- Concentrações de IL-10 em soro de camundongos suíços não infectados e tratados com MPQUI | 45 |
| Tabela 9- Contagem diferencial de leucócitos de camundongos suíços infectados com <i>Plasmodium berghei</i> NK65 e tratados com MPQUI | 46 |
| Tabela 10- Contagem diferencial de leucócitos de camundongos suíços não infectados e tratados com MPQUI | 48 |

Tabela 11- Supressão da parasitemia promovida pelo tratamento com os compostos análogos de quinolina acoplados a alquil aminas e seus complexos de platina contra *Plasmodium berghei* NK65 52

Tabela 12- Mortalidade dos camundongos suíços infectados com *Plasmodium berghei* NK65 ao longo do tratamento com os análogos de quinolina acoplados a alquil-aminas e complexos de platina (mortos/vivos) 55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------|--|
| MPQUI | análogo de quinolina acoplado a 6-mercaptopurina sem extensão de cadeia entre a quinolina e a purina |
| MPQUI propil | análogo de quinolina acoplado a 6-mercaptopurina que contém 3 carbonos entre a quinolina e a purina |
| MPQUI pentil | análogo de quinolina acoplado a 6-mercaptopurina que contém 5 carbonos entre a quinolina e a purina |
| PBS | Phosphate Buffer Saline |
| CEEA | Comitê de Ética em Experimentação Animal |
| DMSO | Dimetil Sulfóxido |
| TNF- α | Fator de Necrose Tumoral α |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| MTT | 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difenil tetrazólico |
| SPSS | Statistical Package for the Social Sciences |
| 2N | 2mol/L |
| °C | graus Celsius |
| h | hora |
| mL | mililitro |

| | |
|---------|---------------------------|
| g | grama |
| Kg | quilograma |
| mg | miligrama |
| pg | picrograma |
| μ L | microlitro |
| μ M | micromolar |
| μ g | micrograma |
| nm | nanômetro |
| EUA | Estados Unidos da América |
| MO | Missuri |
| CA | Califórnia |
| FP-IX | ferritoporfirina-IX |
| SBF | Soro Bovino Fetal |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1-INTRODUÇÃO | 11 |
| 1.1- A doença e perspectivas | 11 |
| 1.2- Aspectos imunológicos da doença | 19 |
| | |
| 2- JUSTIFICATIVA | 22 |
| | |
| 3-OBJETIVOS | 24 |
| 3.1- Objetivo geral | 24 |
| 3.2- Objetivos específicos | 24 |
| | |
| 4-MATERIAL e MÉTODOS | 25 |
| 4.1- Síntese dos compostos | 25 |
| 4.2- Testes “in vivo” | 30 |
| 4.2.1- Teste de atividade antimalárica “in vivo” | 30 |
| 4.2.2- Contagem de parasitemia | 31 |
| 4.2.3- Porcentagem de inibição da multiplicação dos parasitos (supressão da parasitemia) | 31 |
| 4.3- Dosagem das citocinas TNF-α e IL-10 | 31 |
| 4.4- Contagem diferencial de leucócitos | 32 |
| 4.5- Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> | 32 |
| 4.6- Índice de massa de fígado e baço | 33 |
| 4.7- Análise estatística | 33 |
| | |
| 5-RESULTADOS | 34 |
| 5.1- Análogos de cloroquina acoplados a 6-mercaptopurina | 32 |
| 5.1.1- Supressão da parasitemia | 32 |
| 5.1.2- Sobrevivência | 40 |
| 5.1.3- Citotoxicidade <i>in vitro</i> | 40 |
| 5.1.4- Dosagem das citocinas TNF-α e IL-10 | 41 |
| a) TNF- α | 41 |
| b) IL-10 | 43 |
| 5.1.5- Contagem diferencial de leucócitos | 46 |

| | |
|---|-----------|
| 5.1.6- Índice de massa de fígado e baço | 50 |
| 5.2- Análogos de cloroquina acoplados a alquil aminas e seus complexos de platina | 51 |
| 5.2.1- Supressão da parasitemia | 51 |
| 5.2.2- Sobrevivência..... | 55 |
| 5.2.3- Citotoxicidade <i>in vitro</i> | 56 |
| 5.2.4- Índice de massa de fígado e baço | 56 |
| | |
| 6-DISCUSSÃO | 58 |
| 6.1- Análogos de quinolina acoplados a 6-mercaptopurina | 58 |
| 6.1.1- Atividade antimalárica dos análogos de quinolina acoplados a 6-mercaptopurina | 59 |
| 6.2- Análogos da cloroquina acoplados a alquil aminas e seus complexos de platina | 60 |
| 6.2.1- Atividade antimalárica dos análogos da cloroquina acoplados a alquil aminas e seus complexos de platina | 60 |
| 6.3- Aspectos imunológicas sobre do tratamento com análogo de cloroquina acoplado a 6-mercaptopurina MPQUI | 62 |
| | |
| 7- CONCLUSÕES | 65 |
| | |
| 8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 66 |
| | |
| 9-ANEXOS | 86 |
| ANEXO A- Produtos diretos da dissertação | 86 |
| ANEXO B- Produtos indiretos da dissertação | 88 |

1- INTRODUÇÃO

1.1- A doença e perspectivas

A malária é uma doença parasitária, que ocorre em todas as regiões tropicais e subtropicais do planeta. Endêmica nas Américas Central e do Sul, na África e no Sudeste Asiático, abrange mais de 109 países (WHO, 2009). Sua distribuição pode ser observada na **Figura 1**.

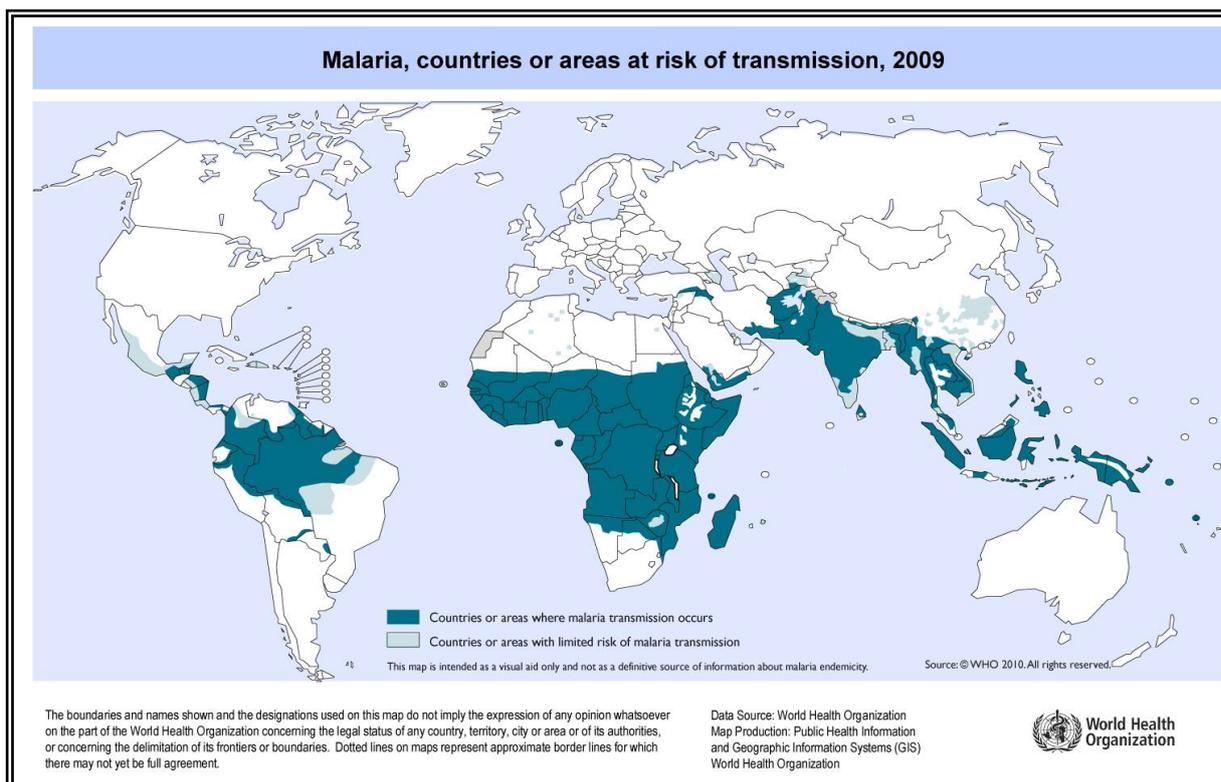


Figura 1 – Distribuição da transmissão da malária no mundo.

(Fonte: http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Malaria_ITHRiskMap.JPG)

Ela é causada por protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, gênero *Plasmodium*. Até pouco tempo, quatro espécies eram reconhecidas como causadoras de malária humana: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* (WHO, 2009). Entretanto, já se reconhece uma quinta: *P. knowlesi* (COX-SINGH et al, 2008; WHITE, 2008). A espécie *P. falciparum* tem se tornado cada vez mais resistente aos agentes quimioterápicos de baixo custo e comumente usados (OLLIARO & YUTHAVONG, 1999; RIDLEY et al, 2003; JANA et al 2007; JEFFORD et al, 2007; FIDOCK et al, 2008), causa complicações graves que podem levar ao óbito (COURA et al, 2006) e causa maiores morbidade e mortalidade; *P. vivax* é o mais amplamente distribuído pelas zonas tropicais e

subtropicais do globo, tem sido responsável por casos graves da doença e inclusive mortes (MEDIS et al, 2001). *P. malariae* e *P. ovale*, apesar de menos freqüentes, têm tido uma distribuição mais ampla atualmente (COLLINS & JEFFERY, 2007(a); COLLINS & JEFFERY, 2007(b); MEULLER et al, 2007). *P. knowlesi*, usualmente confundido com *P. malariae*, é importante causa de malária na Malásia, podendo rapidamente atingir densidades potencialmente letais se não diagnosticado e tratado precocemente (COX-SINGH et al, 2008; WHITE, 2008). Já no Brasil, existem três espécies de *Plasmodium* responsáveis pela malária: *P. malariae*, *P. falciparum* e *P. vivax*, sendo esta última a espécie causadora de malária predominante no Brasil e que causa casos graves, com hospitalizações e até óbitos (ALEXANDRE et al, 2010; OLIVEIRA-FERREIRA et al, 2010).

A infecção se inicia quando o inseto vetor, anofelino fêmea (**Figura 2**), inocula os esporozoítos infectantes que se desenvolvem nos hepatócitos, onde se processa o desenvolvimento parasitário.



Figura 2- Fêmea de *Anopheles darlingi* realizando repasto sanguíneo.

Fonte: <http://www.fiocruz.br/~ccs/arquivosite/estetica/malaria.htm>

Autor: Genilton Vieira – Fiocruz-MG

Nos hepatócitos, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos pré-eritrocíticos, os quais se multiplicam por esquizogonia, originando os esquizontes teciduais e posteriormente os merozoítos que invadirão os eritrócitos. Essa primeira fase do ciclo, que precede o ciclo sanguíneo do parasito, é denominada exo-eritrocítica, pré-eritrocítica ou tissular. Alguns trofozoítos podem permanecer no hepatócito em estado de latência: são os hipnozoítos, responsáveis pelas recaídas tardias da doença após períodos variáveis de incubação. Ela é consequência da esquizogonia tardia desses parasitos dormentes. Tal evento é observado nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*.

Quando os merozoítos invadem os eritrócitos, tem início o ciclo eritrocítico. A partir de então, eles se multiplicam por esquizogonia, originando outros merozoítos que invadirão novos eritrócitos. Após gerações de merozoítos sanguíneos, estes se diferenciam em gametócitos (estágios sexuais). Se ingeridos pelo vetor, o desenvolvimento continua originando os esporozoítos.

O ciclo sanguíneo – o responsável pelas manifestações clínicas da doença – se repete sucessivamente, a cada 48 horas nas infecções por *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* e a cada 72 horas nas infecções por *P. malariae*. (NEVES et al; 2001; WHO, 2009). O ciclo biológico da doença encontra-se ilustrado na **Figura 3**.

O parasito tem capacidade limitada de sintetizar aminoácidos (SHERMAN, 1977) e sua sobrevivência é altamente dependente da proteólise da hemoglobina do hospedeiro durante o processo de esquizogonia intraeritrocítica (SHERMAN, 1977; BRAY et al, 1996). Ele realiza a ingestão eficiente e subsequente digestão do citosol contendo hemoglobina por meio de organelas especializadas (OLLIARO & GOLDBERG, 1995) que clivam a hemoglobina em pequenos fragmentos que são transportados ao citosol do parasito para degradação final em aminoácidos utilizados por ele (KOLAKOVICH et al, 1997). Durante o catabolismo da hemoglobina, ferriprotoporfirina IX (FP-IX) é liberada juntamente com oxigênio, o que promove alto conteúdo de oxigênio e pH ácido. Para neutralizar essas moléculas tóxicas, o parasito realiza oxidação a hematina, que por sua vez é polimerizada em hemozoína – o pigmento malárico (GOLDBERG et al, 1992; DORN et al, 1995; SULLIVAN, 2002; ACHARYA et al, 2008), que, juntamente com as hemácias infectadas, são removidas da circulação por macrófagos (SHEAR et al, 1979; QUINN & WYLE, 1980; BUFFET et al, 2006).

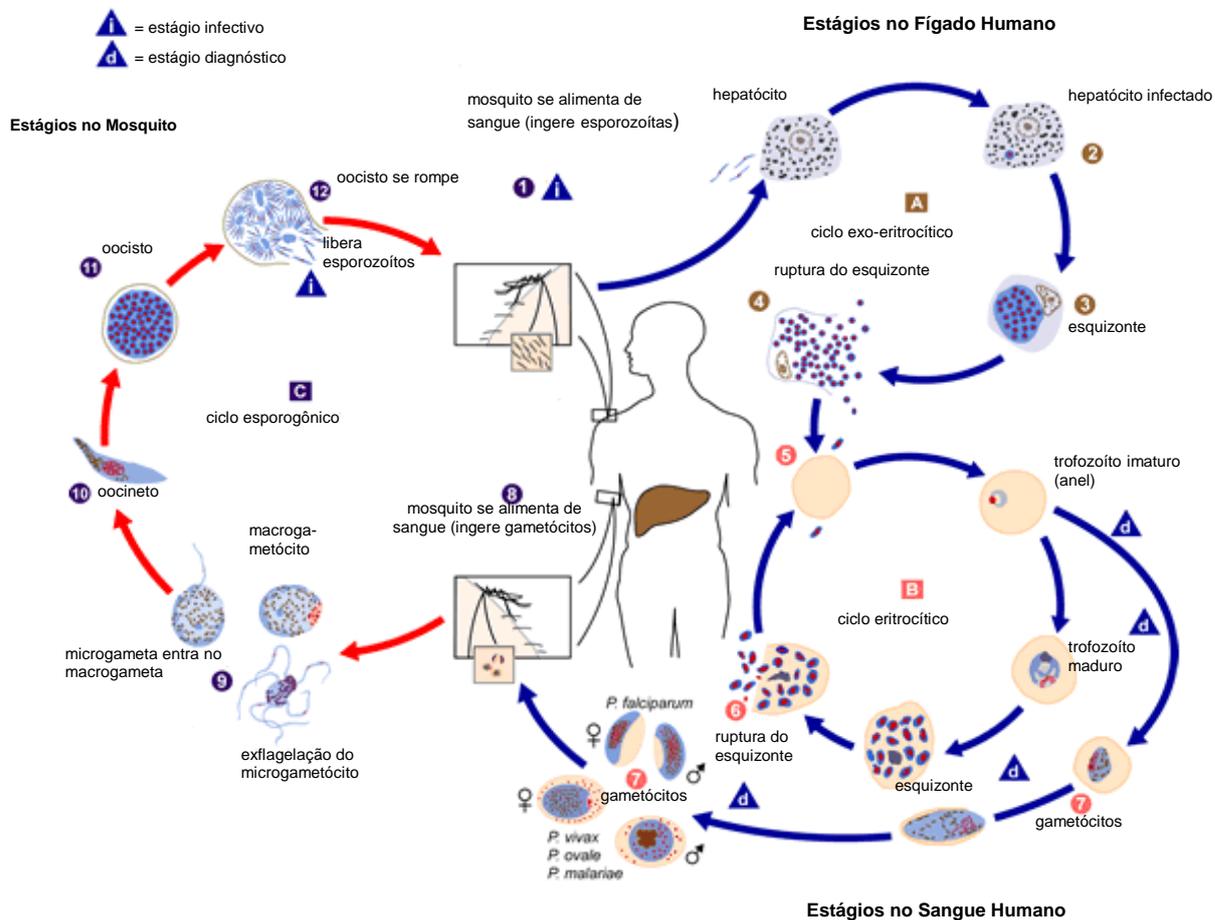


Figura 3- Ciclo biológico de *Plasmodium* sp.

(Adaptado de: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Malaria_il.htm)

Atualmente, a malária é um dos maiores problemas de saúde pública do mundo, já que é a principal causa de perda econômica e alta morbidade (ANDRADE-NETO et al, 2007) e representa uma das doenças infecciosas que mais acometem seres humanos (PASTERNAK & DZIKOWSKI, 2009). De acordo com o Relatório Mundial de Malária de 2009 da Organização Mundial de Saúde, essa doença foi responsável por 243 milhões de casos e 863 mil mortes em 2008 (WHO, 2009), cuja maioria é causada por *P. falciparum* e *P. vivax*.

Ao longo de muitos anos, diversas estratégias têm sido propostas na tentativa de erradicar a doença, sendo estas geridas por estratégias de abrangência global, cujos financiamentos chegaram a 2,8 bilhões de dólares em 2006 (KOMATSU et al, 2007). Os esforços para o controle da malária, cuja principal base tem sido a quimioterapia (ROSENTHAL, 2003), incluem estratégias de intervenção preventiva, uso de inseticidas de efeito residual, tratamento especial de mulheres grávidas, aprimoramento do diagnóstico, mudanças em tratamentos nos quais há resistência, monitoramento e avaliação dos programas de saúde (WHO, 2005).

O controle da doença é difícil devido ao aparecimento de resistência do parasito a drogas (SATHE & KAUSHIK, 2010), especialmente *P. falciparum* e também *P. vivax* (MURPHY et al, 1993; WHITE, 1996) e dos vetores aos inseticidas (BOURDY et al, 2007). A aquisição e difusão de resistência a drogas levam não somente ao aumento nas taxas de morbidade e mortalidade (FIDOCK et al, 2008), mas também afeta programas de erradicação e gestão clínica de áreas endêmicas (MISHRA et al, 2009). Portanto, há a necessidade urgente de se obter novos antimaláricos, preferencialmente com novos mecanismos de ação (MILLER et al, 2002; RIDLEY, 2002; VAROTTI et al, 2008; MISHRA et al, 2009). Os vários esforços atuais têm se baseado na síntese de drogas *de novo* e modificação química dos antimaláricos existentes (OLLIARO & YUTHAVONG, 1999; MACREADIE et al, 2000; WINSTANLEY, 2001), o que dificulta o aparecimento de resistência (RAPAPORT et al, 1992; MICKIE et al, 1998; RIDLEY, 2002; ROSENTHAL, 2003), considerando que o processo de resistência a novos fármacos, além de fisiologicamente complexo para o parasito, não é um processo evolutivamente instantâneo.

A quimioterapia da malária envolve o uso de vários grupos de fármacos compreendem a cloroquina, amodiaquina, ferroquina, isoquina, pironaridina,

naftoquina, aminoquinolizidina e bisquinolinas (junção de duas 4-aminoquinolinas) e formam complexos com a FP-IX, impedindo a detoxificação (SCHLITZER, 2007). Os alril-aminoálcoois compreendem a quinina, mefloquina, halofantrina e lumefantrina e agem evitando a fusão das vesículas de hemoglobina com o vacúolo digestivo (FITCH, 2004). As 8-aminoquinolinas englobam a primaquina, tafenoquina e bulaquina e apesar de ainda não terem mecanismo de ação plenamente elucidado, acredita-se que ajam inibindo o transporte de elétrons na cadeia respiratória ou causando estresse oxidativo (SCHLITZER, 2007). Os derivados de artemisinina compreendem arteméter, artesunato, artenilato e artemisona e agem interagindo com ferro ou heme gerando radicais livres (MESHNICK et al, 1996). Os antifolatos compreendem a pirimetamina, proguanil e sulfadoxina e agem inibindo a síntese do folato (WATKINS & MESHNICK, 2000; SCHLITZER, 2007).

Durante décadas, o tratamento de escolha para a malária tem sido baseado em compostos análogos de quinolinas (**Figura 4**), representando a base da quimioterapia contra a doença (FOLEY & TILLEY, 1998). Esses compostos foram extensivamente estudados para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, o que levou a descoberta de algumas drogas, dentre as quais cloroquina e primaquina (TEKWANI & WALKER, 2006).

As quinolinas apresentam vasto potencial farmacológico, já que atuam como analgésicos, anti-hipertensores, microbicidas e antivirais (KOUZNETSOV & MELÉNDEZ-GÓMEZ, 2005). Os análogos de aminoquinolinas constituem uma classe versátil de compostos no que tange a atividade contra *Plasmodium*. Cloroquina e amodiaquina, por exemplo, atuam sobre formas sanguíneas, enquanto a primaquina atua sobre formas teciduais. Além disso, sua síntese é fácil, barata e tais compostos, além de serem bem tolerados, apresentam níveis aceitáveis de toxicidade (GOMES et al, 2005).

Como já mencionado, o modo de ação das quinolinas se baseia na interferência no processo de detoxificação do heme por parte do parasito (FOLEY & TILLEY, 1997), inibindo-o (SULLIVAN et al, 1996). É proposto que, de maneira alternativa à ligação ao heme, esses compostos inibam a proteólise da hemoglobina – aumentando o pH do vacúolo digestivo, matando o parasito por consequência de efeitos tóxicos – ou a formação de hemozoína, por meio da

inibição da enzima polimerase do heme (CHOU et al, 1980; FITCH et al, 1982; SLATER & CERAMI, 1992).

A combinação de dois agentes farmacológicos separados numa única molécula é uma estratégia promissora na descoberta de novas drogas (KEITH et al, 2005) e tem sido uma estratégia utilizada no tratamento da malária (WHITE et al, 1999; MADAPA et al, 2009; MUREGI et al, 2009). Neste contexto, modificações estruturais feitas nos análogos de quinolinas ou que tenham como produto análogos constituídos de quinolinas e purinas podem oferecer alternativas promissoras ao tratamento da malária. Tal processo torna-se ainda mais interessante se levados em conta os seguintes aspectos: a síntese é fácil e barata (GOMES et al, 2005) o que por sua vez pode fornecer fármacos de baixo custo, atendendo a uma necessidade inerente ao controle da doença (GELB, 2007). Além disso, dificulta o desenvolvimento de resistência pelos parasitos (WHITE et al, 1999; KEITH et al, 2005), fenômeno que parece ser composto-específico e não relacionado a mudanças na estrutura do alvo da droga (CASAGRANDE et al, 2008). Para um parasito mutante ser simultaneamente resistente a duas drogas antimaláricas, deve haver um número total de parasitos cuja biomassa é fisiologicamente muito grande. Exemplo: se um em 10^9 parasitos é resistente a uma droga A e um em 10^{13} à droga B, somente um em 10^{22} parasitos será resistente simultaneamente a A e B. A maioria dos doentes por malária apresentam de 10^8 a 10^{12} parasitos e uma biomassa de mais de 10^{13} parasitos numa única pessoa é impossível (WHITE et al, 1999).

Considerando o aspecto promissor da combinação de drogas, as purinas merecem relevante atenção já que são essenciais para a síntese de nucleotídeos, proteínas e outras reações que requerem energia. Elas são sintetizadas pela via *de novo* ou pela via de incorporação (“salvage pathway”), da qual dependem os parasitos *Plasmodium* spp. (GHÉRARDI & SARCIRON, 2007). A inabilidade dos protozoários parasitos em sintetizar purinas *de novo* tem direcionado esforços à pesquisa por alvos quimioterapêuticos e análogos que inibam transportadores ou enzimas envolvidas no metabolismo de purinas, o que constitui alternativas potenciais (EL KOUNI, 2003).

Antimetabólitos de purina têm sido usados no desenvolvimento de potentes agentes quimioterápicos, tais como antineoplásicos, antileucêmicos, antivirais, antibacterianos e antifúngicos (DA SILVA et al, 1994; LANDFEAR et al,

2004; ZAZA et al, 2004; STEURER et al, 2006; PETIT et al, 2008; MIRON et al, 2009). Por sua vez, 6-mercaptapurinas, são pró-drogas citotóxicas que inibem a atividade de enzimas na via sintética *de novo* de purinas e promovem dano ao DNA (BRIDGER & COHEN, 1963; BOKKERINK et al, 1993). Elas são comumente usadas no tratamento do câncer e como imunossupressores (DUBINSKY, 2004; COULTHARD & HOGARTH, 2005).

Na **Figura 4** podem ser observadas estruturas de quinolinas e purinas.

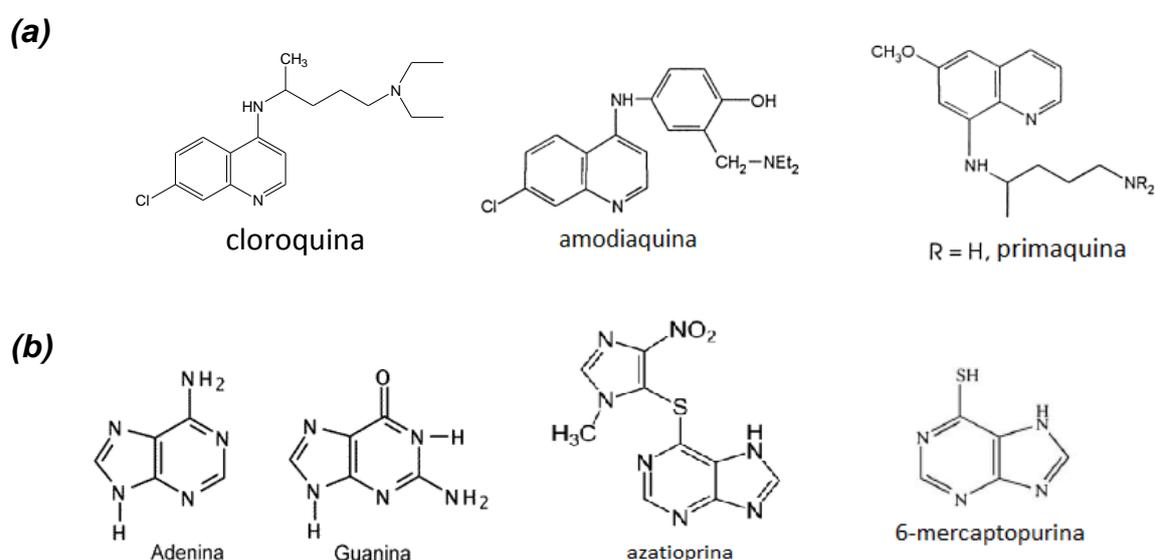


Figura 4- **(a)** Cloroquina, amodiaquina e primaquina: análogos de quinolinas comumente usados no tratamento da malária. **(b)** Adenina e guanina: purinas essenciais; azatioprina e 6-mercaptapurina: purinas utilizadas no tratamento do câncer ou como imunossupressores.

1.2- Aspectos imunológicos da doença

Em relação aos aspectos imunológicos, a resposta é complexa e é improvável que qualquer antígeno isoladamente promova imunidade devido aos múltiplos estágios do ciclo de vida do *Plasmodium* e à complexidade/variedade de possíveis mediadores e alvos de tal resposta. Além disso, a resposta imune está envolvida na prevenção, cura das manifestações clínicas da doença e também na patogênese (MACKINTOSH et al, 2004; HAFALLA et al, 2006; BEESON et al, 2008). Entretanto, a cura da malária depende não somente de uma resposta imune eficiente como também de um tratamento antimalárico eficaz (TARGETT, 1992).

A imunidade inata desempenha papel crucial na imunidade protetora à malária, limitando a densidade do parasito na fase inicial da doença (STEVENSON & RILEY, 2004), com destaque para as células NK e IFN- γ produzido por elas na resolução espontânea da infecção. Alguns mediadores “parasiticidas” (como o óxido nítrico e TNF- α) liberados por macrófagos ou células similares do sistema inato também contribuem (POMBO et al, 2002), conferindo caráter importante às células mononucleares (STEVENSON & RILEY, 2004). Os fagócitos mononucleares são importantes para fagocitose de eritrócitos infectados devido à ausência de anticorpos específicos citofílicos ou opsonizantes (SERGHIDES et al, 2003). Células dendríticas também desempenham papel fundamental na polarização de células T CD4+ levando a respostas imunes adaptativas (STEVENSON & URBAN, 2002). São também importantes as células T $\gamma\delta$ e células NKT (STEVENSON & RILEY, 2004).

Parecem ser necessárias resposta humoral e celular em cooperação para o controle da parasitemia, sendo o alvo principal os parasitos do estágio eritrocítico (BEESON et al, 2008) contra os quais ocorre uma orquestrada resposta de citocinas e anticorpos (NOLAND et al, 2008). No estágio pré-eritrocítico, predomina a resposta celular (LEE et al, 1979) com destaque para células TCD8+ e as células produtoras de IFN- γ (TSUJI & ZAVALA, 2003).

Destaca-se o importante papel das células T e suas subpopulações: CD4+, CD8+, $\gamma\delta$ e NK (SCHMIEG et al, 2003). As células CD4+ medeiam a imunidade ao estágio pré-eritrocítico e são essenciais para um resposta humoral eficiente contra os parasitos (SCHMIEG et al, 2003). O papel das células T CD8+ é crítico, já que elas atuam de forma protetora e patológica (BELNOUE et al, 2002;

HAFALLA et al, 2006). A regulação da resposta celular pode representar distinção entre contribuição para cura ou para doença (BEESON et al., 2008).

TNF- α (Fator de Necrose Tumoral α) é uma das principais citocinas envolvidas na imunologia da malária e participa da patologia (GRAU et al, 1987; AMANI et al, 2002; SCHOFIELD & GRAU, 2005). É uma proteína com grande variedade de atividades biológicas produzida principalmente por macrófagos e tem importância em processos inflamatórios (GRAU et al, 1987). É produzida também por monócitos, células NK, neutrófilos, basófilos, mastócitos, eosinófilos e também por linfócitos T citotóxicos antígeno-específicos e células T auxiliares no controle de tumores e infecções (RICHARDS, 1997).

TNF- α é produzido após exposição a vários antígenos liberados durante o complexo ciclo de vida dos plasmódios (RICHARDS, 1997). No caso da malária, uma produção excessiva de TNF- α é induzida por uma resposta imune decorrente da presença do parasito no sangue (HUNT & GRAU, 2003). Em alguns estudos, altas concentrações plasmáticas de TNF- α estiveram associadas à gravidade da doença (MOLYNEUX, 1991; SHAFFER et al, 1991). Em estudos com pacientes com malária falciparum grave, houve uma relação entre níveis plasmáticos de TNF- α e patologia cerebral (GRAU et al, 1989; KWIATKOWSKI et al, 1990; MOLYNEUX et al, 1993).

A citocina IL-10 é um inibidor da síntese de citocinas e é produzida principalmente por células Th2, monócitos e células B. Deve desempenhar papel importante na definição da resposta de células T auxiliares e, conseqüentemente, da resposta por citocinas na malária (RICHARDS, 1997), o que influencia na evolução clínica da doença. Além disso, parece ter um papel protetor na malária murina (HUNT & GRAU, 2003). Ela inibe a produção de citocinas como GM-CSF (fator estimulador de colônia de granulócito e macrófago) e TNF- α , as quais se acredita participar nas complicações da malária grave e cerebral (CLARK & ROCKETT, 1994).

Uma resposta imune eficaz é caracterizada por resposta inicial e intensa do tipo Th1 com mecanismos efetores mediados por citocinas pró-inflamatórias que aniquilam as células infectadas, seguida de uma rápida supressão desses mecanismos potencialmente excessivos e patogênicos por células efetoras ou mediadores anti-inflamatórios (ARTAVANIS-TSAKONAS et al, 2003). A redução

de parasitos no sangue circulante e a prevenção da recrudescência parecem ocorrer sob mecanismos efetores dependentes de anticorpo (LONG, 2003).

Considerando a influência de fármacos na resposta imune, sabe-se que os linfócitos T e B são profundamente susceptíveis à interrupção da síntese *de novo* de purinas (FINE et al, 2007) o que pode comprometer a resposta imune do hospedeiro. Esta, por sua vez, pode ser influenciada pelo tratamento com antimaláricos (SALMERON & LIPSKY, 1983; LIN et al, 1995; WHITE, 1998; HUGOSSON et al, 2002; MA et a, 2007), os quais também alteram o perfil de citocinas, podendo levar à exacerbação da doença (OJO-AMAIZE et al, 2001; BASTOS et al, 2002; WHALTHER et al, 2006). Um exemplo é a própria cloroquina, que reduz a proliferação de linfócitos (BYGBJERG & FLACHS, 1986), afeta a produção de citocinas como IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ (ROSA et al, 1999), reduz a produção de intermediários reativos de nitrogênio, inibe a fagocitose (OSORIO et al, 1992) – assim como relatado para 4-aminoquinolinas (SHALMIEVL et al, 1996) – e interfere na apresentação de antígenos via MHC de classe II (FOX & KANG, 1993).

2- JUSTIFICATIVA

Além de a malária ser um dos maiores problemas de saúde pública do mundo, a principal causa de perda econômica e alta morbidade (ANDRADE-NETO et al, 2007) e uma das doenças infecciosas que mais acometem seres humanos (PASTERNAK & DZIKOWSKI, 2009), seu controle tem sido difícil em função da crescente resistência dos parasitos aos fármacos comumente usados. Portanto, há a necessidade urgente de se obter novos antimaláricos, preferencialmente com novos mecanismos de ação (MILLER et al, 2002; RIDLEY, 2002; VAROTTI et al, 2008; MISHRA et al, 2009).

Nesse contexto, as quinolinas são promissoras por já constituírem uma classe versátil de compostos no que tange a atividade contra *Plasmodium* (a exemplo da cloroquina, amodiaquina e primaquina) e agirem em ponto crítico para o parasito (GOLDBERG & SLATER, 1992).

Uma estratégia interessante para descoberta de novas drogas é a combinação de dois agentes farmacológicos numa única molécula (KEITH et al, 2005) e tem sido uma estratégia utilizada no tratamento da malária (WHITE et al, 1999; MADAPA et al, 2009; MUREGI et al, 2009). Assim, modificações estruturais feitas nos análogos de quinolinas ou que tenham como produto análogos constituídos de quinolinas e purinas podem oferecer alternativas promissoras ao tratamento da malária. Tal processo torna-se ainda mais interessante se levados em conta os seguintes aspectos: a síntese é fácil e barata (GOMES et al, 2005) o que por sua vez pode fornecer fármacos de baixo custo, atendendo a uma necessidade inerente ao controle da doença (GELB, 2007). Além disso, dificulta o desenvolvimento de resistência pelos parasitos (WHITE et al, 1999; KEITH et al, 2005), fenômeno que parece ser composto-específico e não relacionado a mudanças na estrutura do alvo da droga (CASAGRANDE et al, 2008).

Desta forma, as purinas merecem relevante atenção já que são essenciais para processos celulares fundamentais como síntese de nucleotídeos, proteínas e outras reações que requerem energia. A inabilidade dos protozoários parasitos em sintetizar purinas *de novo* tem direcionado esforços à pesquisa por alvos quimioterapêuticos e análogos que inibam transportadores ou enzimas envolvidas no metabolismo de purinas, o que constitui alternativas potenciais (EL KOUNI, 2003).

Tais análogos já têm sido usados como antineoplásicos, antileucêmicos, antivirais, antibacterianos e antifúngicos (DA SILVA et al, 1994; LANDFEAR et al, 2004; ZAZA et al, 2004; STEURER et al, 2006; PETIT et al, 2008; MIRON et al, 2009). Por sua vez, 6-mercaptopurinas, são pró-drogas citotóxicas que inibem a atividade de enzimas na via sintética *de novo* de purinas e promovem dano ao DNA (BRIDGER & COHEN, 1963; BOKKERINK et al, 1993). Elas são comumente usadas no tratamento do câncer e como imunossupressores (DUBINSKY, 2004; COULTHARD & HOGARTH, 2005).

Considerando os aspectos mencionados e a crescente resistência dos parasitos aos antimaláricos comumente usados, esse trabalho avaliou a atividade antimalárica *in vivo* de análogos de cloroquina acoplados a 6-mercaptopurina e a alquil-aminas e seus complexos de platina.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antiplasmodial de análogos da cloroquina.

3.2- Objetivos específicos

- Analisar a atividade antiplasmodial dos análogos de cloroquina utilizando teste supressivo *in vivo* através de modelo murino de infecção por *Plasmodium berghei* cepa NK65.
- Analisar a citotoxicidade dos compostos em células de mamíferos utilizando ensaios *in vitro* com macrófagos peritoniais.
- Analisar aspectos imunológicos decorrentes do tratamento com o derivado de quinolina acoplado a 6-mercaptopurina, derivado MPQUI, através da contagem diferencial de leucócitos e dosagem de citocinas (TNF- α e IL-10).
- Analisar a influência dos tratamentos com os compostos em fígado e baço dos animais por meio de índice desses órgãos.
- Estabelecer possíveis relações estrutura-atividade para os compostos avaliados.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Síntese dos análogos avaliados

As moléculas avaliadas neste trabalho foram obtidas a partir da conjugação de dois anéis heterocíclicos (quinolinas e mercaptopurina). Na intenção de verificar a relação estrutura-atividade dessas classes de compostos, vários derivados foram obtidos. Inicialmente obteve-se o derivado de quinolina ligado diretamente pelo grupo sulfeto a purina (derivado MPQUI, **Figura 5b.1**). Em seguida, uma série de derivados foram obtidos com variações no comprimento da cadeia de grupos metilênicos entre os dois anéis heterocíclicos (grupo 1). Outro grupo de moléculas derivadas de quinolina também foi obtido (grupo 2), desta vez grupos alquil-aminas foram adicionados à posição 4 da quinolina. Num terceiro momento os derivados do grupo 2 foram complexados com platina (grupo 3). As estruturas desses grupos estão apresentadas na **Figura 5**. As estruturas dos compostos avaliados neste trabalho encontram-se nas **Tabelas 1 e 2**.

Todos os compostos foram obtidos pelo grupo do Prof. Dr. Adilson David da Silva, pertencente ao Núcleo de Pesquisa Química (NUPEQ) da Universidade Federal de Juiz de Fora.

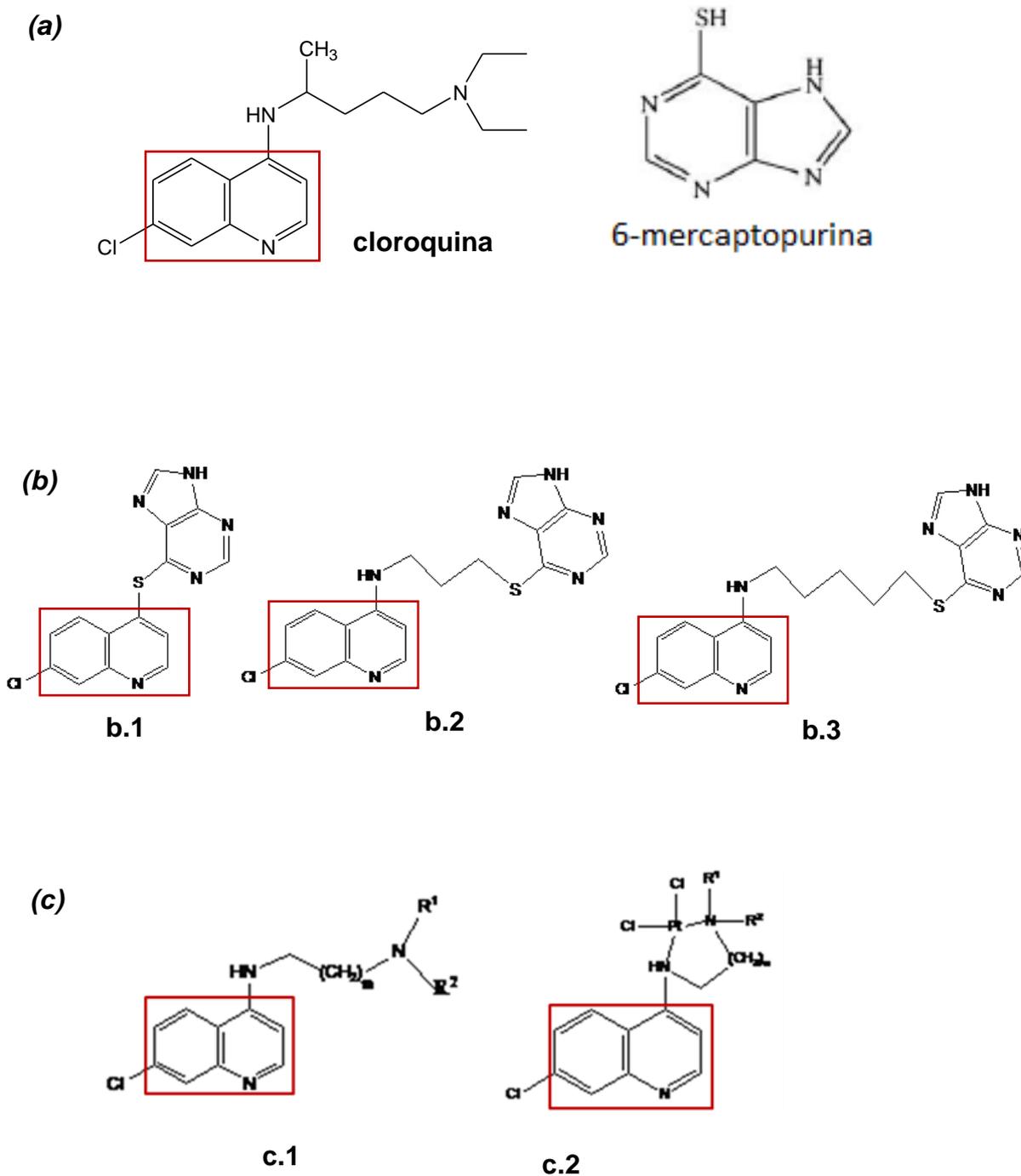


Figura 5- Estrutura dos derivados avaliados neste trabalho, evidenciando a parte de quinolina. Figura 5a- estruturas da cloroquina e 6-mercaptapurina. Figura 5b- derivados do grupo 1 (análogos da cloroquina acoplados a 6-mercaptapurina): 5b.1: MPQUI; 5b.2: MPQUI propil; 5b.3: MPQUI pentil. Figura 5c- derivados do grupo 2 e 3; 5c.1: análogos da cloroquina acoplados a alquil-aminas (grupo 2); 5c.2: análogos da cloroquina complexados com platina (grupo 3).

Tabela 1- Estrutura dos análogos de quinolina acoplados a 6-mercaptopurina.

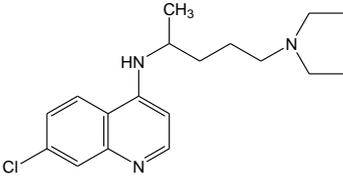
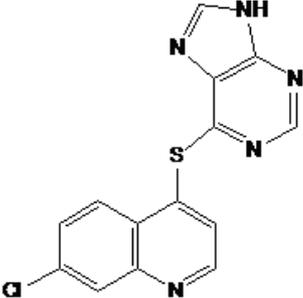
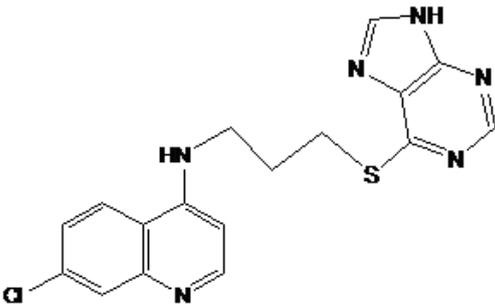
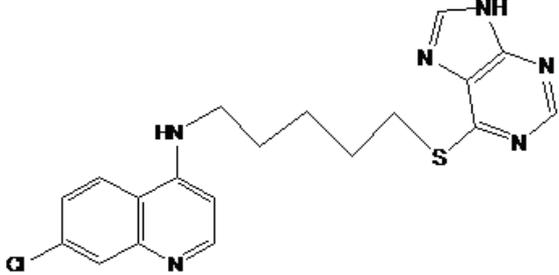
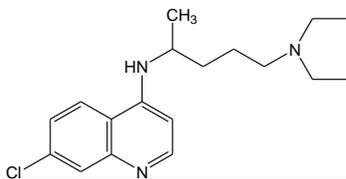
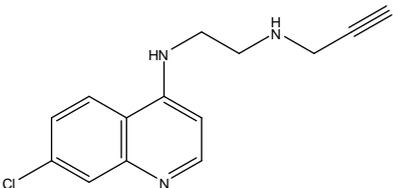
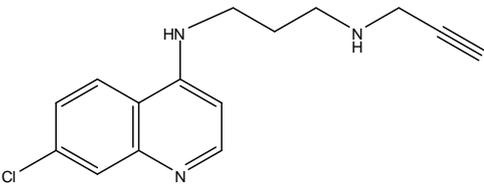
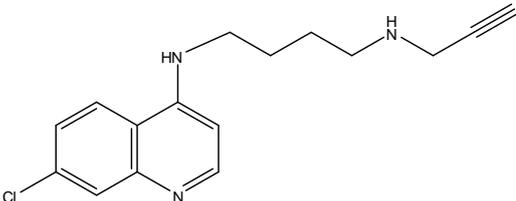
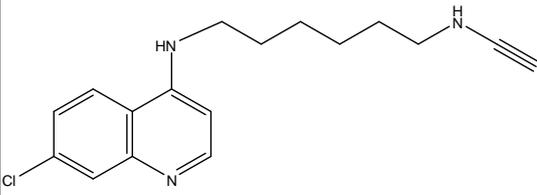
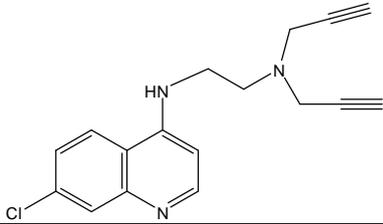
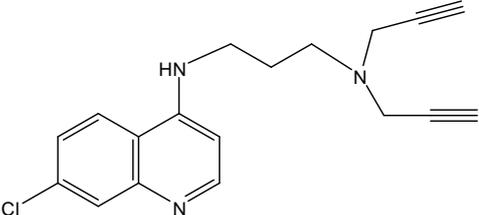
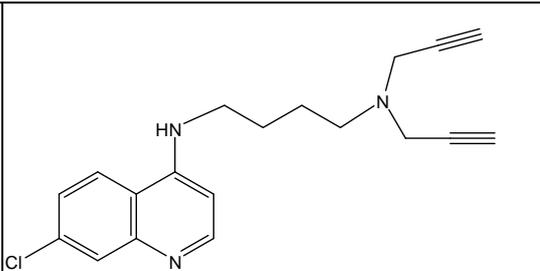
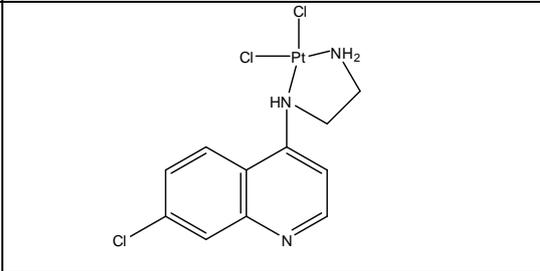
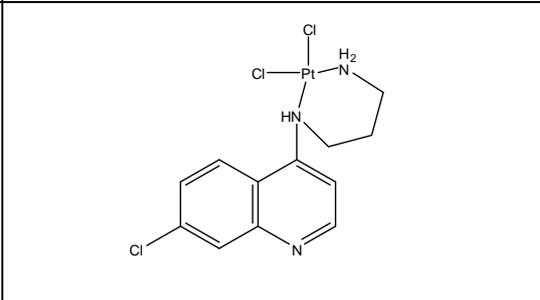
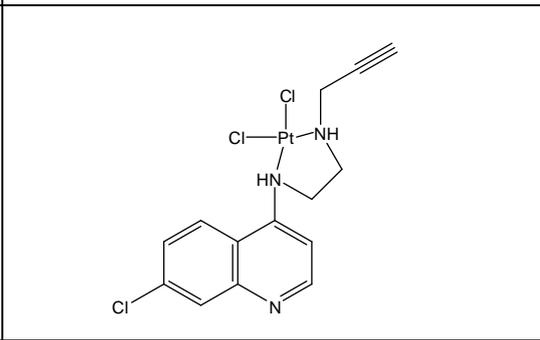
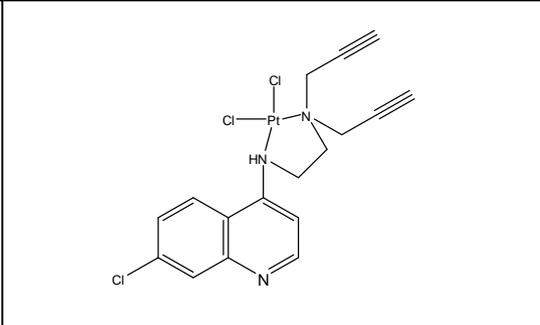
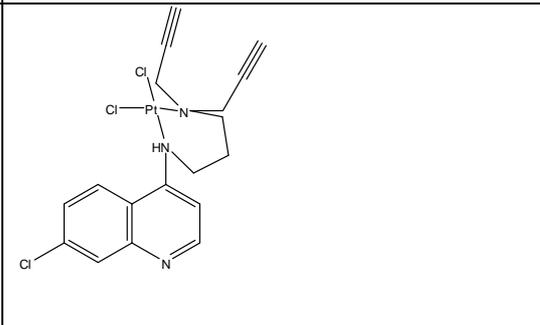
| Nome Químico | Estrutura | Modificação estrutural | Código |
|--|---|---|--------------|
| N'-(7-cloroquinolin-4-il)-N,N-dietil-pentano-1,4-diamina |  | - | cloroquina |
| 4-(6'-tiopurina)-7-cloroquinolina |  | Adição da 6-mercaptopurina à quinolina | MPQUI |
| N-(4-(7H-purin-6-iltio)propil)-7-cloroquinolina-4-amino |  | Adição de 3 grupos metilênicos entre a mercaptopurina e a quinolina | MPQUI propil |
| N-(4-(7H-purin-6-iltio)pentil)-7-cloroquinolina-4-amino |  | Adição de 5 grupos metilênicos entre a mercaptopurina e a quinolina | MPQUI pentil |

Tabela 2- Estrutura dos análogos de quinolina acoplados a alquil-aminas e seus complexos de platina.

| Nome químico | Estrutura | Modificação estrutural | Código |
|--|--|--|---------------|
| 4,7-dicloroquinolina |  | - | cloroquina |
| 7-cloro-N-(2-(prop-2-inilamino)etil)quinolin-4-amino |  | Adição de grupo etilamina N-propinil a quinolina | 1 |
| 7-cloro-N-(3-(prop-2-inilamino)propil)quinolin-4-amino |  | Adição de grupo propilamina N-propinil a quinolina | 2 |
| 7-cloro-N-(4-(prop-2-inilamino)butil)quinolin-4-amino |  | Adição de grupo butilamina N-propinil a quinolina | 3 |
| 7-cloro-N-(6-(prop-2-inilamino)hexil)quinolin-4-amino |  | Adição de grupo hexilamina N-propinil a quinolina | 4 |
| N-(2-(di(prop-2-inil)amino)etil)-7-cloroquinolin-4-amino |  | Adição de grupo etilamina N,N-dipropinil a quinolina | 5 |
| N-(3-(di(prop-2-inil)amino)propil)-7-cloroquinolin-4-amino |  | Adição de grupo propilamina N,N-dipropinil a quinolina | 6 |

| | | | |
|--|--|--|----|
| 7-cloro-N-(4-(di(prop-2-inil)amino)butil)quinolin-4-amino |  | Adição de grupo butilamina N,N-dipropinil a quinolina | 7 |
| Complexo de platina (II) do N-(2-aminoetil)-7-cloroquinolin-4-amino |  | Complexação com platina do grupo etilenodiamina acoplado a quinolina | 8 |
| Complexo de Platina (II) do N-(2-aminopropil)-7-cloroquinolin-4-amino |  | Complexação com platina do grupo propanodiamina acoplado a quinolina | 9 |
| Complexo de platina (II) do 7-cloro-N-(2-(prop-2-inilamino)etil)quinolin-4-amino |  | Complexação com platina do grupo etilenodiamina N-propinil acoplado a quinolina | 10 |
| Complexo de platina (II) do N-(2-(di(prop-2-inil)amino)etil)-7-cloroquinolin-4-amino |  | Complexação com platina do grupo etilenodiamina N,N-dipropinil acoplado a quinolina | 11 |
| Complexo de platina (II) do N-(3-(di(prop-2-inil)amino)propil)-7-cloroquinolin-4-amino |  | Complexação com platina do grupo propilenodiamina N,N-dipropinil acoplado a quinolina | 12 |

4.2 – Testes “*in vivo*”

4.2.1- Teste de atividade antimalárica *in vivo*

Foi utilizado o parasito da malária murina *Plasmodium berghei* cepa NK-65 inoculado em camundongos. A manutenção da cepa foi feita a partir da passagem semanal de sangue em camundongos. Aproximadamente 4µL desse sangue foi diluído em solução salina e 0,2 mL do preparado foi inoculado por via intraperitoneal em camundongos suíços outbreed fêmeas, obtidos no Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Os compostos, em diferentes doses, foram testados *in vivo* em camundongos infectados com formas sangüíneas de *Plasmodium berghei* cepa NK65, usando o teste supressivo (PETERS, 1965). Foram usados camundongos Suíços outbreed, fêmeas, de 19 a 22 g, obtidos do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob o processo aprovado no Comitê de Ética sob o nº 063/2007-CEEA. Esses camundongos foram infectados com 1×10^6 hemácias parasitadas por via intraperitoneal.

As substâncias testadas foram preparadas em solução aquosa ou diluídas de acordo com sua solubilidade em dimetil sulfóxido (DMSO) a 5%. Os camundongos infectados foram divididos ao acaso em grupos de 5 animais e os grupos-teste receberam doses orais das drogas em diferentes doses: 3 análogos de cloroquina conjugados com 6-mercaptopurina nas doses de 1, 5, 10, 25, 50 e 100 mg/Kg e os acoplados a alquil-aminas e seus complexos de platina (totalizando 12 compostos) a 10 e/ou a 25 mg/Kg. Foi administrada uma dose por dia, durante 4 dias consecutivos, a partir do dia da inoculação. Dois grupos controle foram utilizados, um recebendo a droga padrão cloroquina na dose de 100mg/Kg e outro não tratado, que recebeu solução de DMSO a 5%. Foram utilizados também grupos que receberam doses de cloroquina iguais às dos compostos testados a fim de obter uma comparação da atividade antimaláricos dos mesmos. Nos dias 5, 7 e 9 após a inoculação dos parasitos foram feitos esfregaços sangüíneos, fixados em metanol, corados por Giemsa e examinados em microscopia de imersão para determinação da parasitemia. Datas de morte dos animais também foram registradas com o intuito de obter dados sobre a

sobrevivência dos mesmos em decorrência do tratamento com os compostos avaliados.

4.2.2- Contagem da parasitemia

Para contagem da parasitemia foram confeccionados esfregaços do sangue dos camundongos infectados em lâmina de microscopia, corados pelo corante de Giemsa e examinados ao microscópio sob objetiva de imersão (1000X). A parasitemia foi determinada pela quantidade de hemácias infectadas usando como universo a quantidade de hemácias totais que varia de acordo com uma estimativa inicial da parasitemia: <5%: 4 mil hemácias; 5-10%: 3mil; 10-20%: 1.500; >10%: 1mil.

4.2.3- Porcentagem de Inibição da Multiplicação dos Parasitos (supressão da parasitemia)

A atividade antimalárica dos compostos testados foi estabelecida com base na porcentagem de inibição da multiplicação dos parasitos observada nos grupos tratados com os compostos, em comparação com o grupo controle não tratado, calculada por meio da seguinte fórmula (CARVALHO et al, 1991): $[(A-B)/A] \times 100$, onde A= parasitemia média no grupo controle (não tratado), B=parasitemia média do grupo teste.

4.3- Dosagem das citocinas TNF- α e IL-10

Para coleta de soro, sangue foi coletado do plexo orbital dos animais no 12º dia após inoculação dos mesmos. Após a formação de coágulo, as amostras foram centrifugadas e posteriormente mantidas em freezer -20°C até a realização dos ensaios de ELISA. Como os animais dos grupos tratados com MPQUI nas doses de 100, 50 e 25mg/Kg morrem precocemente, a coleta de soro deles (tanto infectados como não infectados) foi realizada no 3º dia do experimento. Para as dosagens das citocinas supracitadas, placas de ELISA de 96 poços com fundo chato (Maxisorp, Nunc) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, diluído em tampão específico preparado pelo fabricante e incubadas por aproximadamente 16h a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS-

Tween a 0,05% e bloqueadas com PBS-soro fetal por 1 hora. Após este período, as placas foram lavadas novamente e, em seguida as amostras e os padrões de citocinas foram colocados. As placas foram então incubadas por aproximadamente 16 horas a 4°C. Terminada a incubação, as placas foram lavadas, o anticorpo anti-citocina biotilado (TNF- α e IL-10, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) foi acrescentado e a placa foi incubada por mais 1 hora à temperatura ambiente. Após 5 lavagens, o conjugado enzimático foi adicionado e as placas foram incubadas por 30 minutos. Transcorrido esse tempo, o substrato (solução de tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio) foi adicionado e a placa incubada por 15 minutos. Por fim, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 2N e a leitura feita em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices) a 450 nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão, obtidas pelas diferentes concentrações dos respectivos recombinantes (TNF- α e IL-10, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). As leituras foram interpretadas como concentrações das citocinas em pg/mL.

4.4- Contagem diferencial de leucócitos

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada sob microscopia de imersão, em esfregaços sanguíneos fixados em metanol e corados com Giemsa, até atingir o total de 100 leucócitos totais. Tais esfregaços foram obtidos no 12^o dia após a inoculação dos animais. Como os animais dos grupos tratados com MPQUI nas doses de 100, 50 e 25mg/Kg morrem precocemente, a coleta de esfregaço deles (tanto infectados como não infectados) foi realizada no 3^o dia do experimento.

4.5- Teste de citotoxicidade *in vitro*

Para verificar a citotoxicidade *in vitro* em células de mamíferos, foram utilizados macrófagos peritoniais de camundongos BALB/c estimulados com tioglicolato a 4% 72h antes da realização do teste. A extração dos macrófagos foi feita realizando-se lavado peritonal com a manutenção das células em solução de Hanks e em gelo. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em meio

RPMI-1640 suplementado com SBF 10% e 10^6 foram adicionadas em cada poço, em uma placa de cultivo de 96 poços. Após a adição das drogas nas seguintes concentrações: MPQUI a 110, 55, 27.5, 13.75, 6.875, 3.44, 1.72, 0.86 μ g/mL e análogos de cloroquina acoplados a alquil-aminas e complexos de platina nas concentrações de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78 μ M, as células foram mantidas em estufa a 37° C, 5% de CO₂. Após 48 horas de incubação, a viabilidade dos macrófagos foi determinada pelo método colorimétrico do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difenil tetrazólico (MTT; Sigma, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA), adicionando-se 10 μ L de MTT (5mg/mL). Decorridas 4 horas, a reação foi interrompida com o acréscimo de 100 μ L de álcool isopropílico acidificado com HCL 0,4%. A absorbância foi medida a 570 nm em espectrofotômetro (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices) (MOSSMANN, 1983; BRAGA et al, 2007). A citotoxicidade é expressa pela razão: leitura obtida nos poços com células expostas aos compostos / leitura dos poços controle que não foram incubados com compostos x 100. Foram considerados citotóxicos os compostos que causaram a morte de mais de 50% das células em comparação com o controle que não foi incubado com compostos.

4.6- Índice de massa de fígado e baço

Para verificar se houve hepatoesplenomegalia decorrente da doença aliada ao tratamento com os compostos, baço e fígado dos camundongos suíços infectados e tratados, inclusive os controles, foram extraídos, pesados e suas massas incluídas na seguinte fórmula de modo a estabelecerem relação com o peso do animal sob a forma de índice: peso do órgão / peso do animal x 100, originando uma grandeza adimensional (ALMEIDA et al, 1996).

4.7- Análise estatística

Os dados dos testes antimaláricos foram analisados por meio do software SPSS para Windows (v.13) (SPSS Inc. SPSS 13.0 for Windows. Chicago, IL: SPSS Inc.; 2004), usando o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre duas amostras independentes. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

5- RESULTADOS

5.1- Análogos de quinolina acoplados a 6-mercaptopurina

5.1.1- Supressão da parasitemia

O análogo MPQUI apresentou elevados valores de supressão da parasitemia, por volta de 70%, como a 50mg/Kg nos 7^o e 9^o dias, e 25mg/Kg no 9^o dia. Destaca-se a supressão na dose de 5mg/Kg: aproximadamente 70% nos 3 dias analisados. Valores de supressão próximos a 60% também podem ser observados: MPQUI pentil a 5 e 25mg/Kg no 5^o dia. MPQUI propil e MPQUI pentil também suprimiram a parasitemia, mas em valores menos expressivos. Faz-se necessário ressaltar que não há valores de supressão para a dose de 100mg/Kg, já que os camundongos morreram antes do 5^o dia. Os dados referentes ao tratamento com MPQUI na dose de 50mg/Kg são provenientes de 1 camundongo, o que impossibilita a aplicação de testes estatísticos e cálculo de desvio padrão.

Os valores de supressão da parasitemia podem ser observados na **Tabela 3** e sob a forma de gráficos na **Figura 6**. As médias das parasitemias decorrentes do tratamento com cada análogo encontram-se ilustradas na **Figura 7a, 7b e 7c**.

Tabela 3- Supressão da parasitemia induzida pelo tratamento com os compostos análogos de quinolina acoplados a 6-mercaptopurina contra *Plasmodium berghei* NK65^a

| Composto | Dose (mg/Kg) | Supressão da parasitemia (%) nos dias | | |
|--------------|-----------------|--|-----|-----|
| | | 5 | 7 | 9 |
| MPQUI | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | 5 | 76 | 74* | 71 |
| | 10 | 37 | 50 | 61 |
| | 25 | 26 | 28 | 69 |
| | 50 ^b | 23 | 70 | 79 |
| MPQUI propil | 5 | 26 | 41 | 51 |
| | 10 | 24 | 21 | 27 |
| | 25 | 10 | 6 | 0 |
| | 50 | 16 | 0 | 0 |
| MPQUI pentil | 5 | 58 | 0 | 0 |
| | 10 | 0 | 41 | 46 |
| | 25 | 58 | 35 | 23 |
| | 50 | 26 | 41 | 49 |
| Cloroquina | 5 | 80* | 47 | 43 |
| | 10 | 89* | 33 | 58 |
| | 25 | 100 | 24* | 62* |
| | 50 | 100 | 100 | 100 |

* $p < 0,05$ (diferenças significativas em relação ao grupo controle não tratado utilizando o Teste de Mann-Whitney); ^a cada grupo teve $n=5$; ^b dado oriundo de apenas um animal.

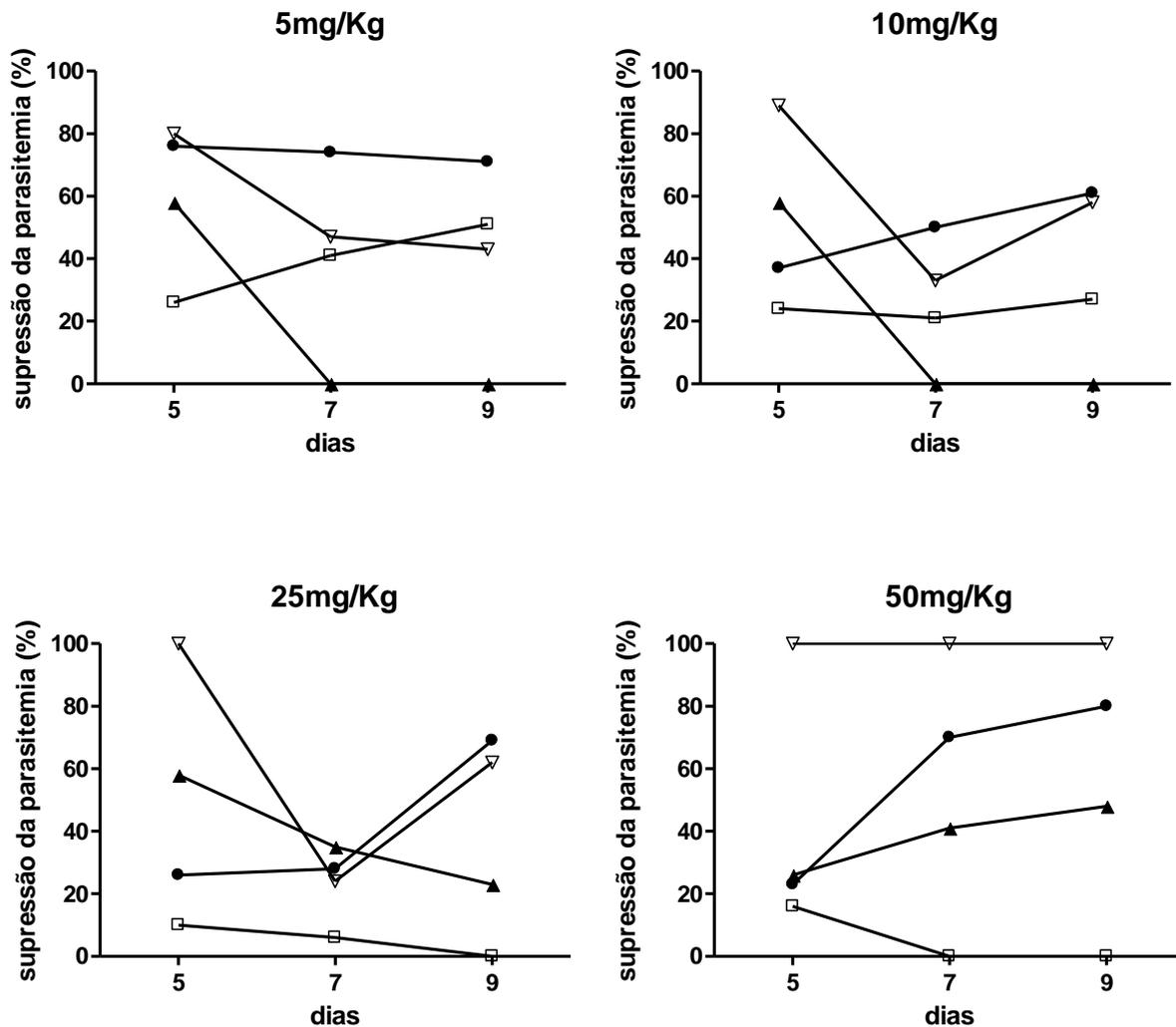


Figura 6- Supressão da parasitemia decorrente do tratamento com os compostos análogos de quinolina acoplados à 6-mercaptopurina nas diferentes doses em comparação com a cloroquina.

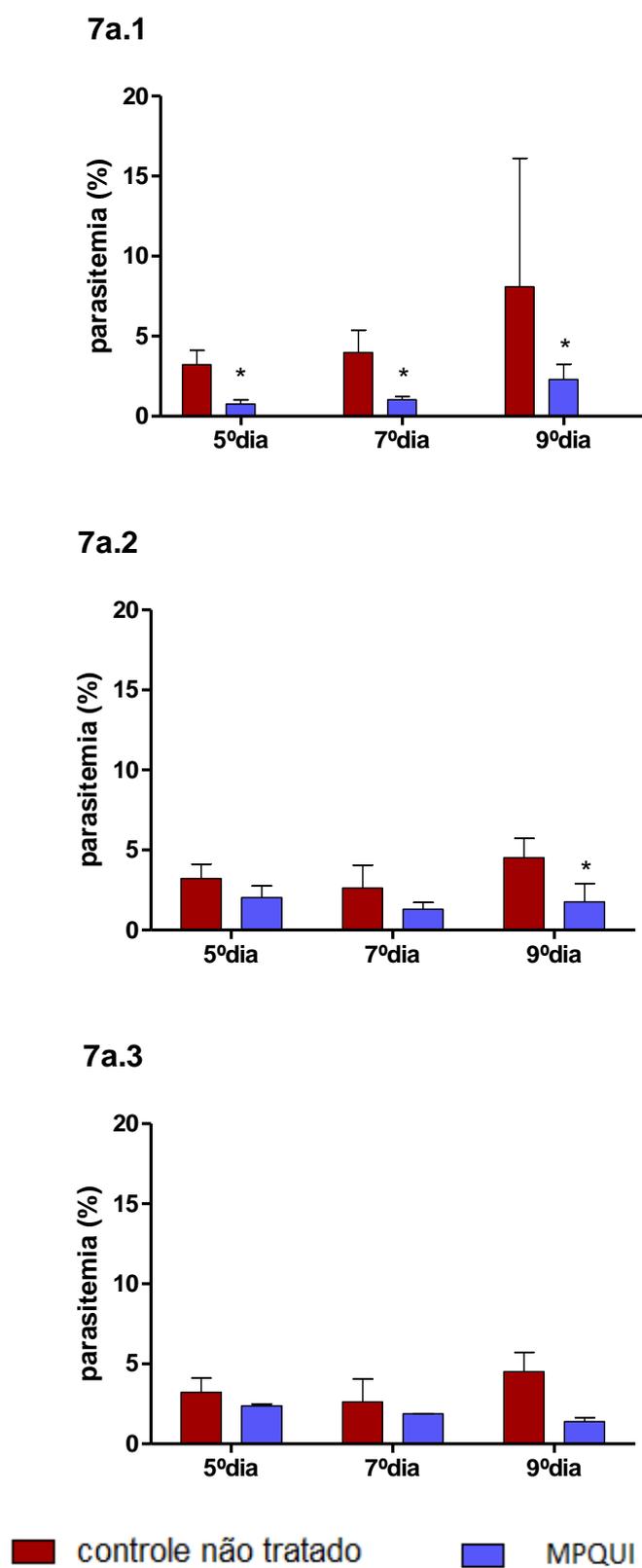


Figura 7a- Médias das parasitemias nos grupos tratados com MPQUI nas diferentes doses. Cada grupo continha 5 camundongos. 7a.1- 5mg/Kg; 7a.2- 10mg/Kg; 7a.3- 25mg/Kg. * $p < 0,05$ (diferenças significativas em relação ao grupo controle não tratado utilizando o Teste de Mann-Whitney)

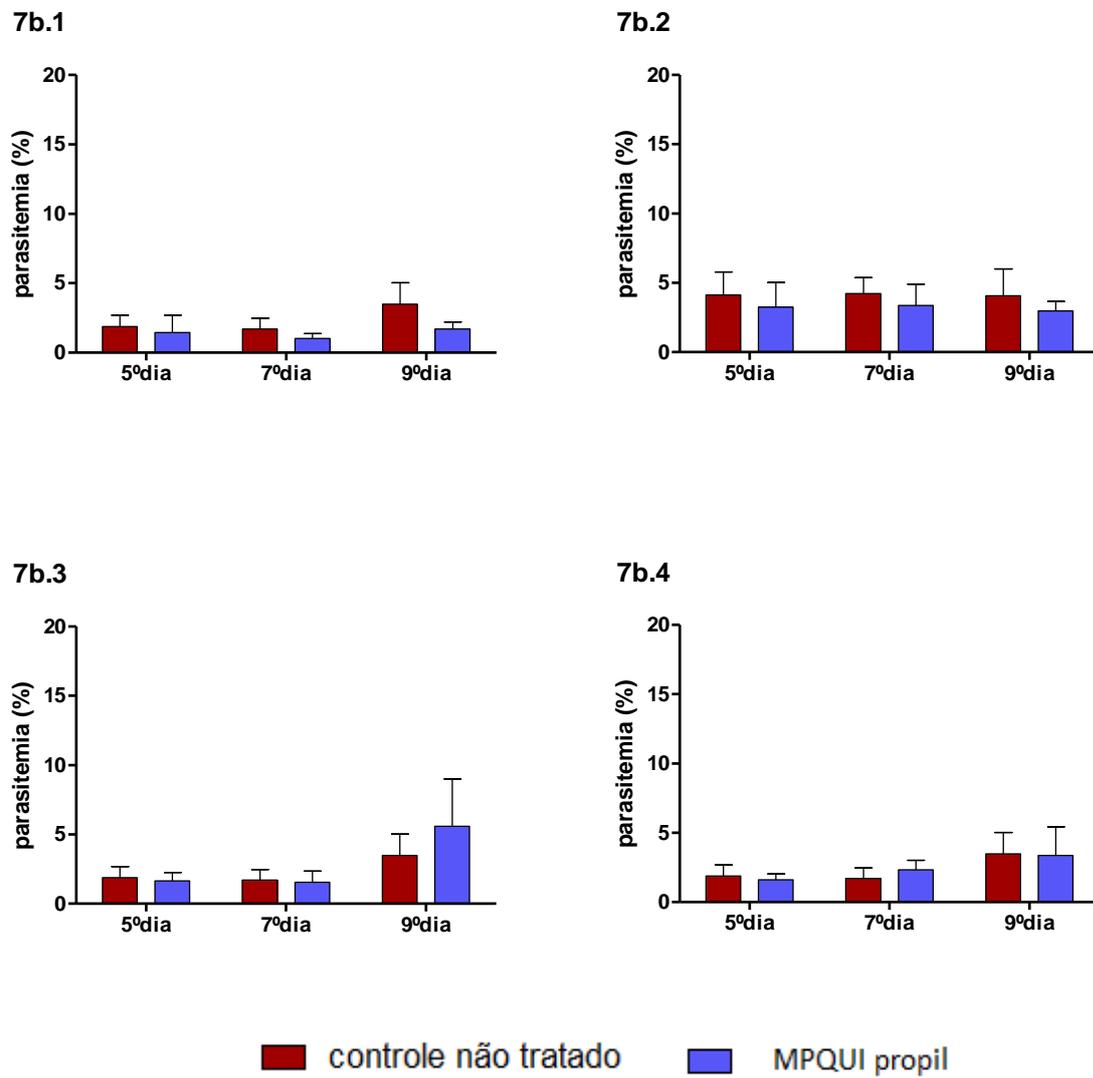
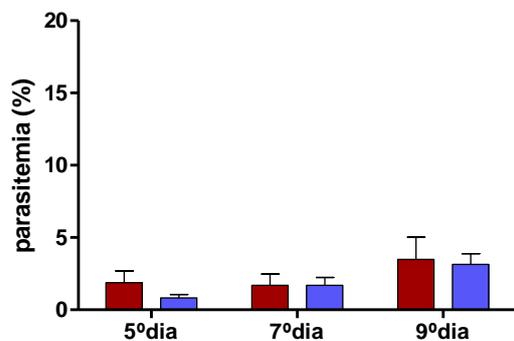
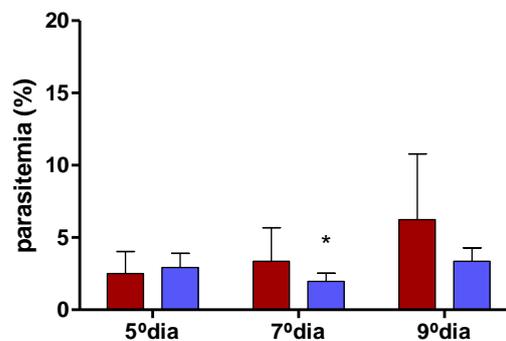


Figura 7b- Médias das parasitemias nos grupos tratados com MPQUI propil nas diferentes doses. Cada grupo continha 5 camundongos. 7b.1- 5mg/Kg; 7b.2- 10mg/Kg; 7b.3- 25mg/Kg; 7b.4- 50mg/Kg.

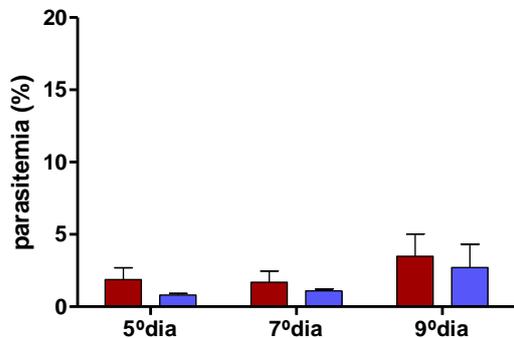
7c.1



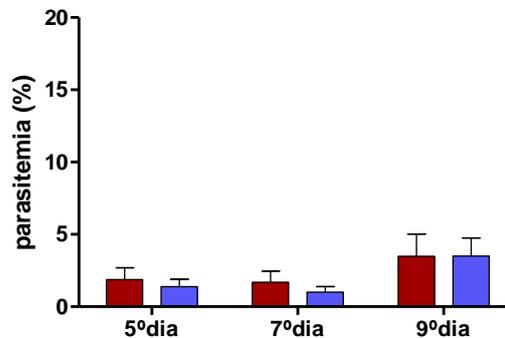
7c.2



7c.3



7c.4



■ controle não tratado

■ MPQUI pentil

Figura 7c- Médias das parasitemias nos grupos tratados com MPQUI pentil nas diferentes doses. Cada grupo continha 5 camundongos. 7c.1- 5mg/Kg; 7c.2- 10mg/Kg; 7c.3- 25mg/Kg; 7c.4- 50mg/Kg. * $p < 0,05$ (diferenças significativas em relação ao grupo controle não tratado utilizando o Teste de Mann-Whitney).

5.1.2- Sobrevivência

Não houve diferença na sobrevivência entre o grupo controle não tratado e os grupos tratados com os compostos, exceto para MPQUI nas doses de 100, 50 e 25mg/Kg.

Os camundongos tratados com MPQUI nas doses de 100, 50 e 25mg/Kg morreram precocemente. Esses dados podem ser vistos na **Tabela 4**.

Os camundongos do grupo controle tratado sobreviveram até o fim do experimento.

Tabela 4- Mortalidade dos camundongos infectados ou não infectados com *Plasmodium berghei* NK65 ao longo do tratamento com MPQUI (mortos/vivos)

| Doses | Infectados* | | | Não infectados† | | |
|-----------------------|-------------|-------|-------|-----------------|-------|-------|
| | Dia 3 | Dia 5 | Dia 8 | Dia 3 | Dia 5 | Dia 8 |
| não tratados | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/2 | 0/2 | 0/2 |
| 100mg/Kg ^a | 0/5 | 4/5 | - | 0/2 | 2/2 | - |
| 50mg/Kg | 0/5 | 0/5 | 2/5 | 2/2 | - | - |
| 25mg/Kg | 0/5 | 3/5 | 3/5 | 2/2 | - | - |

* cada grupo continha 5 camundongos

† cada grupo continha 2 camundongos

^a um camundongo deste grupo não desenvolveu infecção

5.1.3- Citotoxicidade *in vitro*

O composto MPQUI apresentou toxicidade *in vitro* na concentração de 110µg/mL (57,8%) e 55µg/mL (32,6%). Não foram realizados testes com MPQUI propil e MPQUI pentil.

5.1.4- Dosagem das citocinas TNF- α e IL-10

a) TNF- α

Com os camundongos infectados, o grupo controle não tratado apresentou a maior concentração média de TNF- α e o grupo controle tratado com cloroquina apresentou a menor concentração. Os grupos de camundongos infectados e tratados com MPQUI nas doses de 100, 50, 25 e 5 mg/Kg apresentaram concentrações médias menores que os infectados não tratados. O grupo de camundongos infectados e tratados com MPQUI a 1mg/Kg apresentou concentração média similar à dos camundongos infectados e não tratados. Tais resultados podem ser observados na **Tabela 5** e **Figura 8**.

Tabela 5- Concentrações de TNF- α em soro de camundongos suíços infectados com *Plasmodium berghei* NK65 e tratados com MPQUI *

| GRUPOS ^a | Média \pm desvio padrão |
|----------------------|---------------------------|
| Controle não tratado | 278,926 \pm 123,6 |
| Controle tratado | 14,679 \pm 4,3 |
| MPQUI 100mg/Kg | 57,883 \pm 28,2 |
| MPQUI 50mg/Kg | 133,763 \pm 58,7 |
| MPQUI 25mg/Kg | 132,130 \pm 62,7 |
| MPQUI 10mg/Kg | 163,498 \pm 81,7 |
| MPQUI 5mg/Kg | 136,784 \pm 47 |
| MPQUI 1mg/Kg | 262,157 \pm 162 |
| Controle sadio | 24,533 \pm 35,1 |

*valores expressos em pg/mL; ^a cada grupo teve n=5

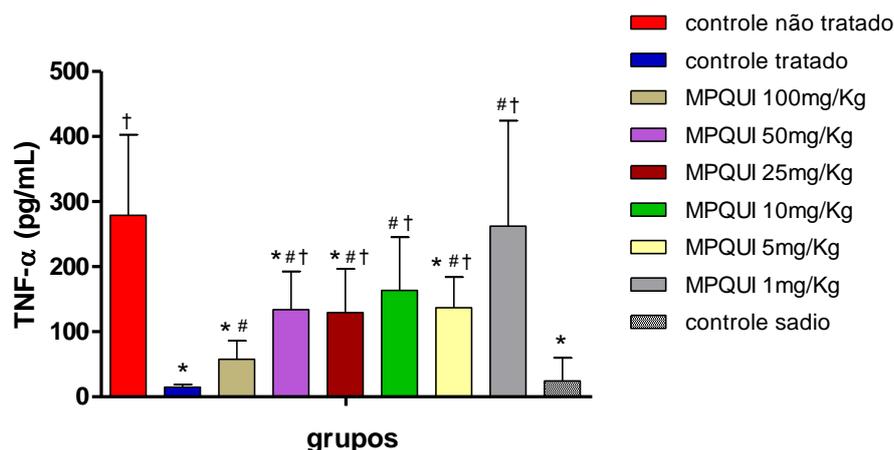


Figura 8- Dosagem de TNF- α em soro de grupos de camundongos suíços infectados com *Plasmodium berghei* NK65 e tratados com MPQUI em várias doses. Cada grupo continha 5 camundongos. * $p < 0,05$ em comparação com o controle não tratado; # $p < 0,05$ em comparação com o controle tratado; † $p < 0,05$ em comparação com o controle sadio (não infectado e não tratado).

Com relação aos camundongos não infectados, o grupo tratado com MPQUI a 10mg/Kg apresentou a maior concentração média de TNF- α , similar ao grupo controle não tratado. Já o grupo de camundongos tratados com MPQUI a 1mg/Kg apresentou a menor concentração média da citocina, semelhante aos controles tratados. Observa-se que à medida que a dose de MPQUI diminui, as concentrações médias da citocina também diminuem. Resultados ilustrados na **Tabela 6 e Figura 9**.

Tabela 6- Concentrações de TNF- α em soro de camundongos suíços não infectados e tratados com MPQUI *

| GRUPOS ^a | Média \pm desvio padrão |
|-----------------------|---------------------------|
| Controle não tratados | 63,907 \pm 63,2 |
| Controle tratados | 14,936 \pm 8,2 |
| MPQUI 10mg/Kg | 65,056 \pm 69,7 |
| MPQUI 5mg/Kg | 30,476 \pm 28,7 |
| MPQUI 1mg/Kg | 12,376 \pm 5,5 |

*valores expressos em pg/mL; ^a cada grupo teve n=5

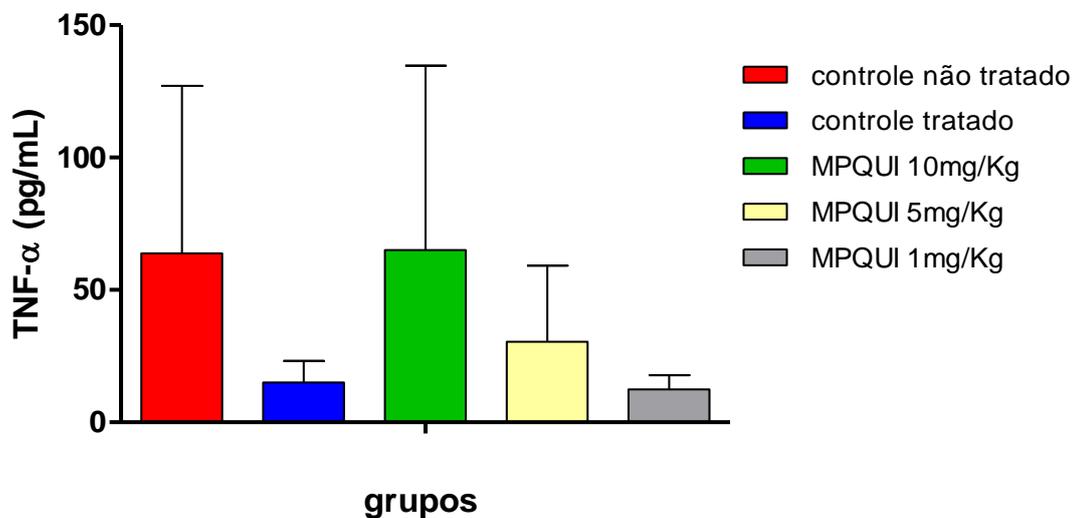


Figura 9- Dosagens de TNF- α em soro de grupos de camundongos suíços não infectados e tratados com MPQUI nas várias doses. Cada grupo continha 5 camundongos. Não houve significância estatística entre nenhum grupo.

b) IL-10

No que diz respeito aos camundongos infectados, o grupo tratado com MPQUI a 1mg/Kg apresentou a maior concentração média de IL-10, seguido do grupo não tratado, tratado com MPQUI a 10mg/Kg e a 5mg/Kg. A menor concentração média pode ser observada no grupo de camundongos controles sadios (não infectados e não tratados), seguido do controle tratado. Resultados na **Tabela 7** e **Figura 10**.

Tabela 7- Concentrações de IL-10 em soro de camundongos suíços infectados com *Plasmodium berghei* NK65 e tratados com MPQUI *

| GRUPOS ^a | Média ± desvio padrão |
|----------------------|-----------------------|
| Controle não tratado | 427,215 ± 51 |
| Controle tratado | 25,290 ± 15,4 |
| MPQUI 100mg/Kg | 187,980 ± 118,7 |
| MPQUI 50mg/Kg | 156,133 ± 168,7 |
| MPQUI 25mg/Kg | 152,835 ± 96,5 |
| MPQUI 10mg/Kg | 324,745 ± 232,3 |
| MPQUI 5mg/Kg | 260,721 ± 88,7 |
| MPQUI 1mg/Kg | 1120,001 ± 1215,6 |
| Controle sadio | 16,207 ± 11,9 |

*valores expressos em pg/mL; ^a cada grupo teve n=5

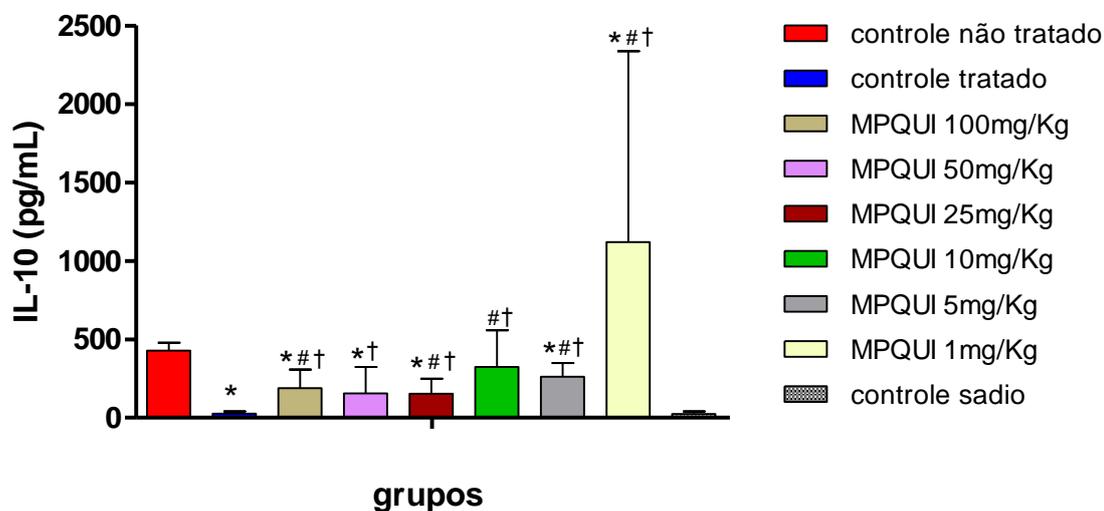


Figura 10- Dosagens de IL-10 em soro de grupos de camundongos suíços infectados com *Plasmodium berghei* NK65 e tratados com MPQUI em várias doses. Cada grupo continha 5 camundongos. * p<0,05 em comparação com o controle não tratado; # p<0,05 em comparação com o controle tratado; † p<0,05 em comparação com o controle sadio (não infectado e não tratado).

Nos camundongos não infectados, a maior concentração média de IL-10 pode ser observada no grupo não tratado e a menor, no tratado com MPQUI a 1mg/Kg. Novamente, observa-se que à medida que as doses de MPQUI diminuem, as concentrações médias da citocina também diminuem. Resultados na **Tabela 8 e Figura 11**.

Tabela 8- Concentrações de IL-10 em soro de camundongos suíços não infectados e tratados com MPQUI *

| GRUPOS^a | Média ± desvio padrão |
|---------------------------|------------------------------|
| Controle não tratados | 191,157 ± 275,145 |
| Controle tratado | 33,475 ± 20,612 |
| MPQUI 10mg/Kg | 73,224 ± 81,970 |
| MPQUI 5mg/Kg | 33,629 ± 37,720 |
| MPQUI 1mg/Kg | 18,409 ± 5,568 |

**valores expressos em pg/mL; ^a cada grupo teve n=5.*

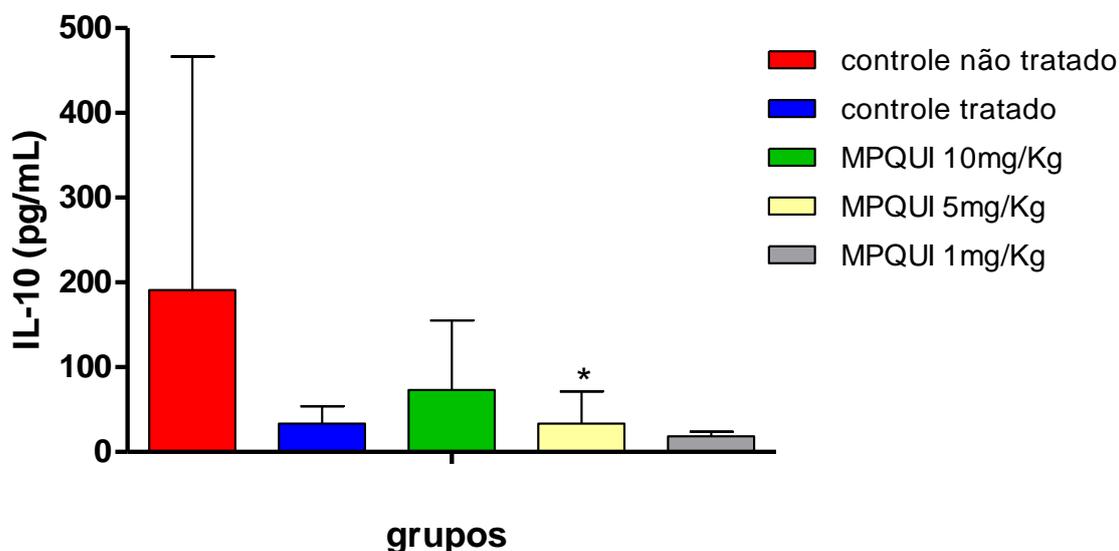


Figura 11- Dosagens de IL-10 em soro de grupos de camundongos suíços não infectados e tratados com MPQUI em várias doses. * $p < 0,05$ em comparação com o controle não tratado. Cada grupo continha 5 camundongos. Não houve significância estatística quando comparados os grupos controle tratado e sadio com os demais.

5.1.5- Contagem diferencial de leucócitos

Com relação à contagem diferencial de leucócitos dos grupos infectados e tratados com MPQUI nas doses de 100, 50, 25, 10, 5 e 1mg/Kg, foi observado que a porcentagem de eosinófilos e basófilos apresentaram baixos valores. O grupo tratado com MPQUI a 50mg/Kg apresentou a porcentagem mais elevada de neutrófilos e o controle não tratado, a maior porcentagem de monócitos. A porcentagem de linfócitos foi mais elevada no grupo controle tratado. De forma geral, é possível perceber valores similares entre o grupo de camundongos controles tratados com cloroquina e os tratados com MPQUI a 5 mg/Kg, assim como entre controle não tratado e MPQUI 1mg/Kg. Resultados na **Tabela 9** e **Figura 12**.

Tabela 9- Contagem diferencial de leucócitos de camundongos suíços infectados com *Plasmodium berghei* NK65 e tratados com MPQUI *

| GRUPO ^a | Neutrófilos | Linfócitos | Eosinófilos | Basófilos | Monócitos |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|
| Controle não tratado | 33,5 ± 20,5 | 43,5 ± 6,4 | 0 | 0 | 23 ± 14,1 |
| Controle tratado | 12,3 ± 6,1 | 75 ± 14,8 | 0 | 2 ± 2,6 | 10 ± 5,3 |
| MPQUI 100mg/Kg | 41,5 ± 4,9 | 49,5 ± 9,2 | 1,5 ± 0,7 | 3 ± 2,8 | 4,5 ± 2,1 |
| MPQUI 50mg/Kg | 50,5 ± 10,6 | 44,5 ± 9,2 | 0 | 2,5 ± 0,7 | 2,5 ± 2,1 |
| MPQUI 25mg/Kg | 38,3 ± 7,2 | 53 ± 20,9 | 3 ± 1 | 2 ± 1,1 | 7,3 ± 9,3 |
| MPQUI 10mg/Kg | 25,75 ± 5,5 | 61,3 ± 2,7 | 2,75 ± 3 | 5,25 ± 3,9 | 7,75 ± 1,2 |
| MPQUI 5mg/Kg | 16,25 ± 4,1 | 69,75 ± 7,1 | 4,5 ± 3,4 | 2,25 ± 2,6 | 7,25 ± 2,6 |
| MPQUI 1mg/Kg | 46,5 ± 10,6 | 34,5 ± 12 | 7 ± 0 | 3,5 ± 0,7 | 8,5 ± 0,7 |

* valores expressos em porcentagem na forma de média±desvio padrão; ^a cada grupo teve n=5.

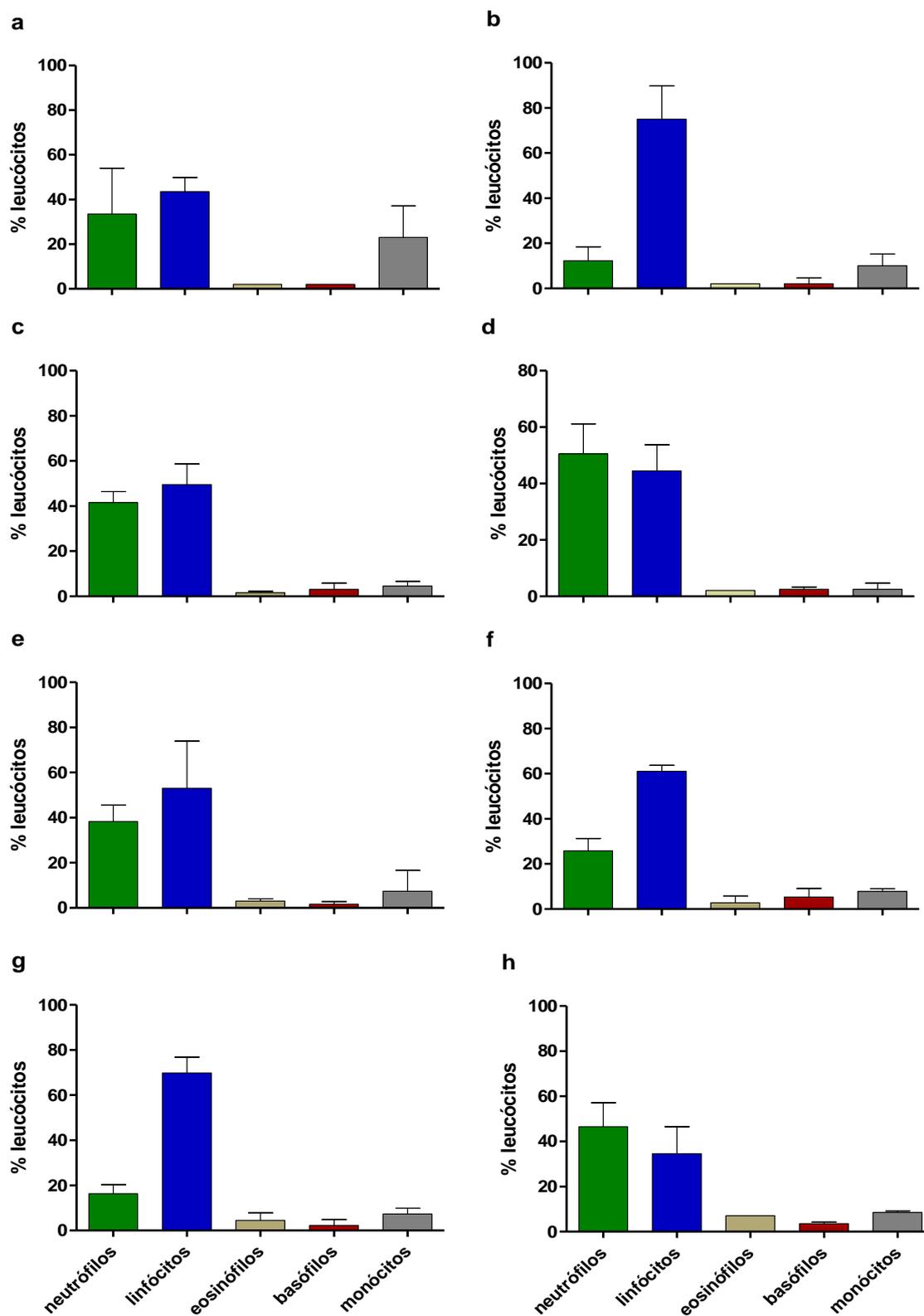


Figura 12- Contagem diferencial de leucócitos de camundongos suíços infectados com *Plasmodium berghei* NK65 e tratados com MPQUI. Cada grupo continha 5 camundongos. a- controle não tratado; b- controle tratado; c- MPQUI 100mg/Kg; d- MPQUI 50mg/Kg; e- MPQUI 25mg/Kg; f- MPQUI 10mg/Kg; g- MPQUI 5mg/Kg; h- MPQUI 1mg/Kg.

Os grupos não infectados e tratados com MPQUI apresentaram valores similares de leucócitos entre si, sendo os maiores observados para os linfócitos. Resultados na **Tabela 10** e **Figura 13**. Não há dados referentes às doses de 100, 50 e 25mg/Kg devido ao fato de os camundongos morrerem antes da data em que a contagem diferencial de leucócitos foi realizada.

Tabela 10- Contagem diferencial de leucócitos de camundongos suíços não infectados e tratados com MPQUI *

| GRUPO^a | Neutrófilos | Linfócitos | Eosinófilos | Basófilos | Monócitos |
|--------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|------------------|------------------|
| controle não tratado | 14,5 ± 6,4 | 71,5 ± 2,1 | 0 ± 0 | 2 ± 1,4 | 12 ± 5,6 |
| Controle tratado | 19,5 ± 9,2 | 68 ± 12,7 | 2 ± 1,4 | 2 ± 2,8 | 8,5 ± 2,1 |
| MPQUI 10mg/Kg | 26 ± 5,6 | 62 ± 2,8 | 3,5 ± 0,7 | 3,5 ± 0,7 | 5 ± 0 |
| MPQUI 5mg/Kg | 25,5 ± 4,9 | 61,5 ± 0,7 | 5 ± 1,4 | 3 ± 1,4 | 5 ± 1,4 |
| MPQUI 1mg/Kg | 22 ± 4,2 | 65 ± 8,5 | 3 ± 0 | 1 ± 0 | 7,5 ± 2,1 |

* valores expressos em porcentagem na forma de média±desvio padrão; ^a cada grupo teve n=5.

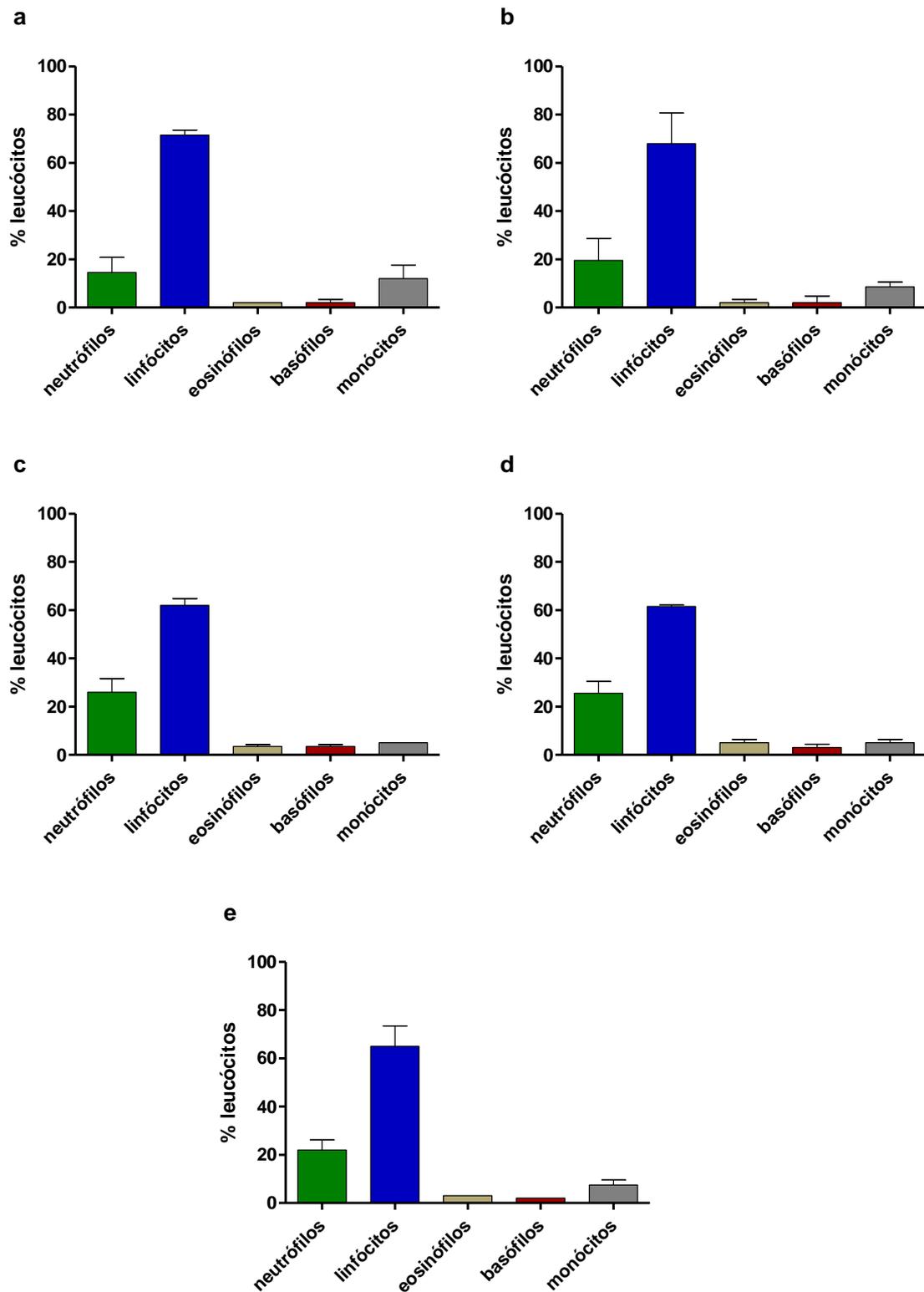


Figura 13- Contagem diferencial de leucócitos de camundongos suíços não infectados e tratados com MPQUI. Cada grupo continha 5 camundongos. a- controle não tratado; b- controle tratado; c- MPQUI 10mg/Kg; d- MPQUI 5mg/Kg; e- MPQUI 1mg/Kg.

5.1.6- Índice de massa de fígado e baço

Apesar de não haver significância estatística entre nenhum grupo, houve uma tendência de aumento dos índices de fígado e baço à medida que as doses de MPQUI diminuían. Com relação a MPQUI propil e MPQUI pentil, não houve diferença expressiva entre os grupos controle e os tratados com esses compostos nas várias doses. Os índices encontram-se ilustrados na **Figura 14**.

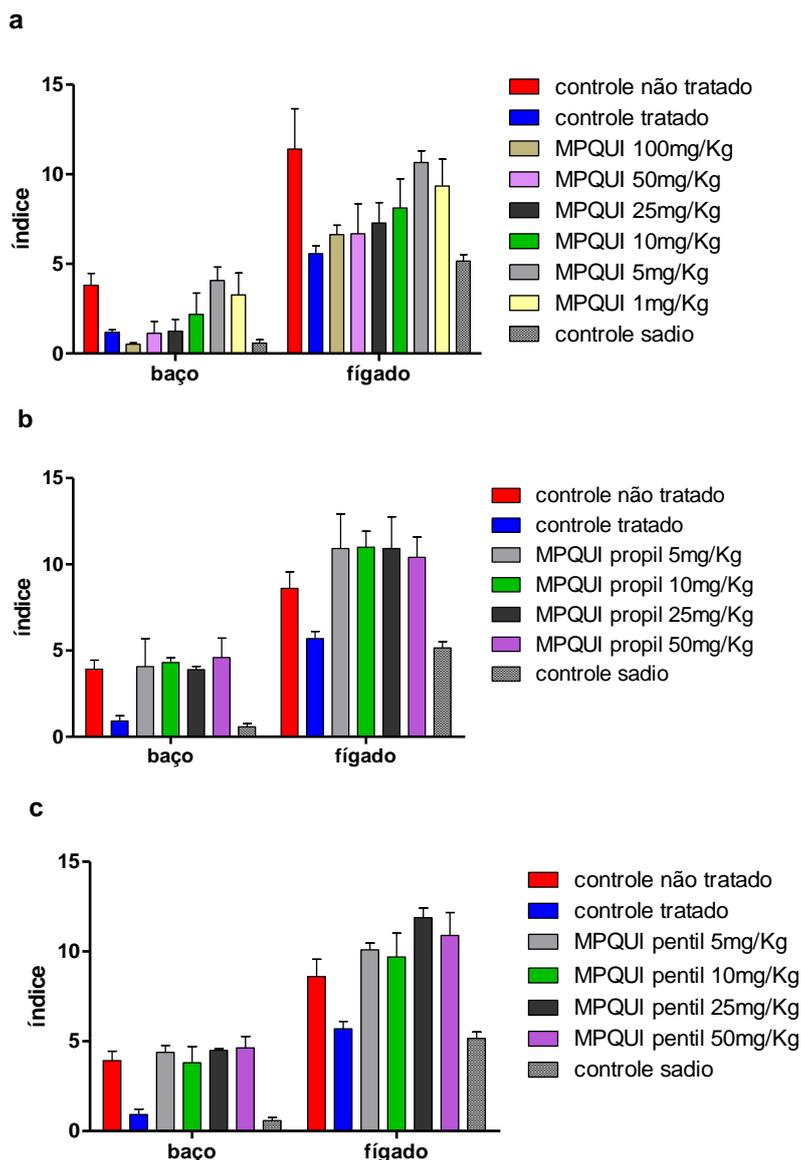


Figura 14- Índices de massa de fígado e baço de camundongos suíços infectados com *Plasmodium berghei* NK65 e tratados com os análogos de quinolina acoplados a 6-mercaptopurina. Cada grupo continha 5 camundongos. a- MPQUI; b- MPQUI propil; c- MPQUI pentil. Não houve significância estatística entre nenhum grupo.

5.2- Análogos de quinolina acoplados a alquil-aminas e seus complexos de platina

5.2.1- Supressão da parasitemia

Os análogos promoveram supressão da parasitemia em altos valores, sendo a maioria em torno dos 70% e alguns atingiram até 90%.

Os compostos que foram testados a 10 e 25mg/Kg demonstraram valores de supressão mais altos no dia 5 nessa última dose. É interessante ressaltar que eles atingiram altos valores, todos superiores a 60%.

Em relação aos compostos testados a 10mg/Kg, um aumento gradual pôde ser percebido ao longo dos dias avaliados, exceto para o composto **7**. Contudo, a supressão dos compostos testados a 10mg/Kg que apresentam complexo de platina na sua estrutura (**8, 9, 10, 11 e 12**) diminui no dia 7, com exceção do composto **9**.

A supressão dos compostos testados a 25mg/Kg diminui no dia 7 e então aumenta no dia 9, com exceção do composto **1**.

Os valores de supressão da parasitemia podem ser observados na **Tabela 11** e **Figura 15** e as médias das parasitemias dos grupos tratados com os análogos na **Figura 16**.

Tabela 11- Supressão da parasitemia induzida pelo tratamento com os compostos análogos de quinolina acoplados a alquil-aminas e seus complexos de platina contra *Plasmodium berghei* NK65^a

| Composto | Dose (mg/Kg) | Supressão da parasitemia (%) nos dias | | |
|------------|--------------|---------------------------------------|-------|----------------|
| | | 5 | 7 | 9 |
| 1 | 10 | 4 | 17.6 | 61.3* |
| 1 | 25 | 84* | 33 | 0 [†] |
| 2 | 10 | 0 | 50 | 62 |
| 2 | 25 | 94* | 23,5 | 84.0* |
| 3 | 10 | 12 | 58.8* | 58.7 |
| 3 | 25 | 73 | 56,8* | 82.6* |
| 4 | 10 | 12 | 47* | 72.6* |
| 5 | 25 | 64* | 64* | 73.0* |
| 6 | 25 | 68* | 69* | 83.4* |
| 7 | 10 | 36 | 34 | 0 |
| 7 | 25 | 65* | 36 | 59.7 |
| 8 | 10 | 50 | 23 | 7,4 |
| 9 | 10 | 0 | 61.8* | 69.4* |
| 10 | 10 | 50* | 23,1 | 75,9* |
| 11 | 10 | 55 | 46,2* | 75,9* |
| 12 | 10 | 45 | 30,8 | 44,4 |
| Cloroquina | 10 | 89* | 33 | 58 |
| | 25 | 100 | 24* | 62* |

* p < 0,05 (diferenças significativas em relação ao grupo controle não tratado utilizando o Teste de Mann-Whitney); ^a cada grupo teve n=5.

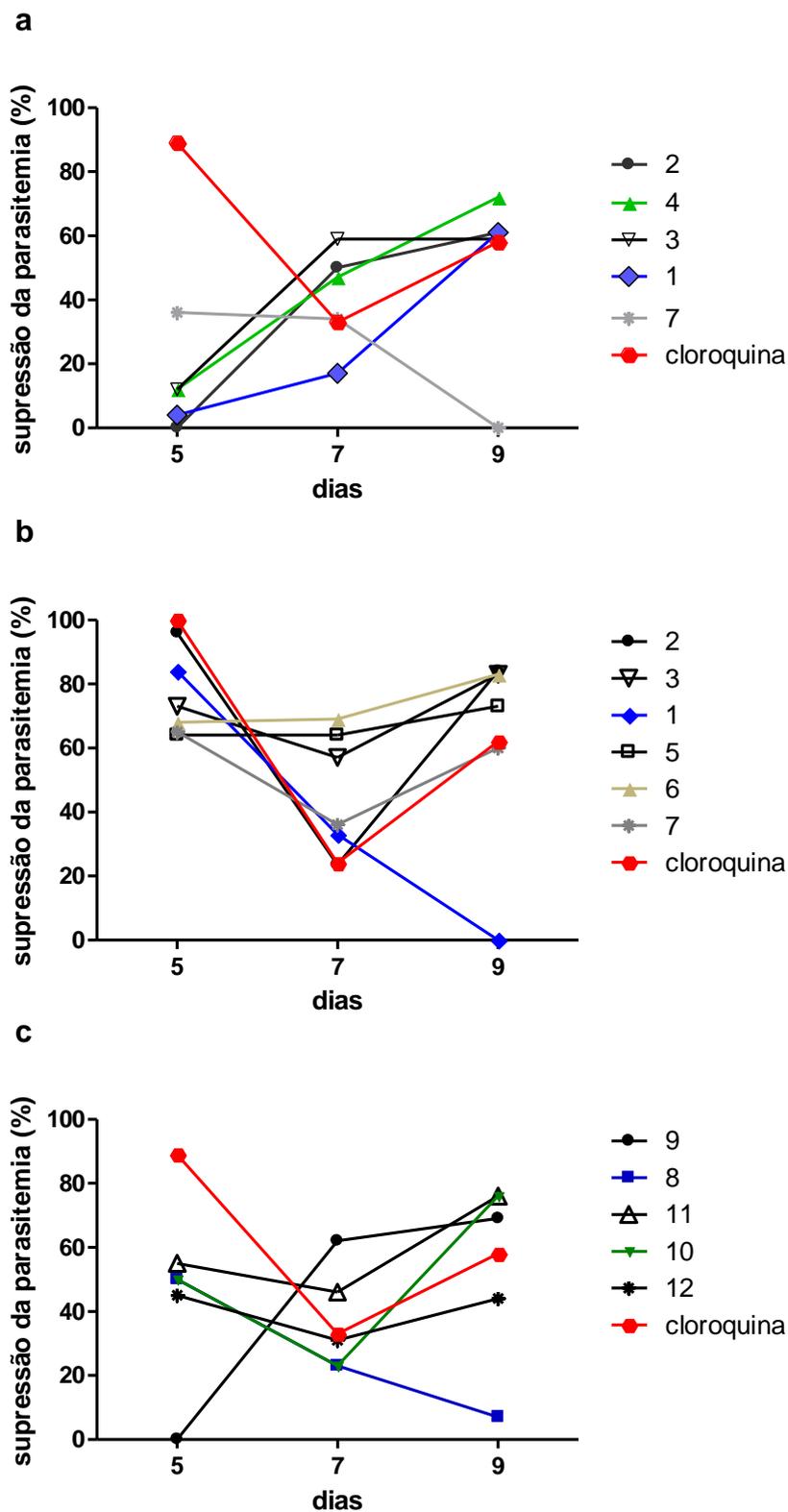


Figura 15- Supressão da parasitemia decorrente do tratamento com os análogos de quinolina acoplados a alquil-aminas e complexos de platina nas várias doses em comparação com a cloroquina. a- compostos acoplados a alquil-aminas a 10mg/Kg; b- compostos acoplados a alquil-aminas a 25mg/Kg; c- compostos complexados com platina a 10mg/Kg.

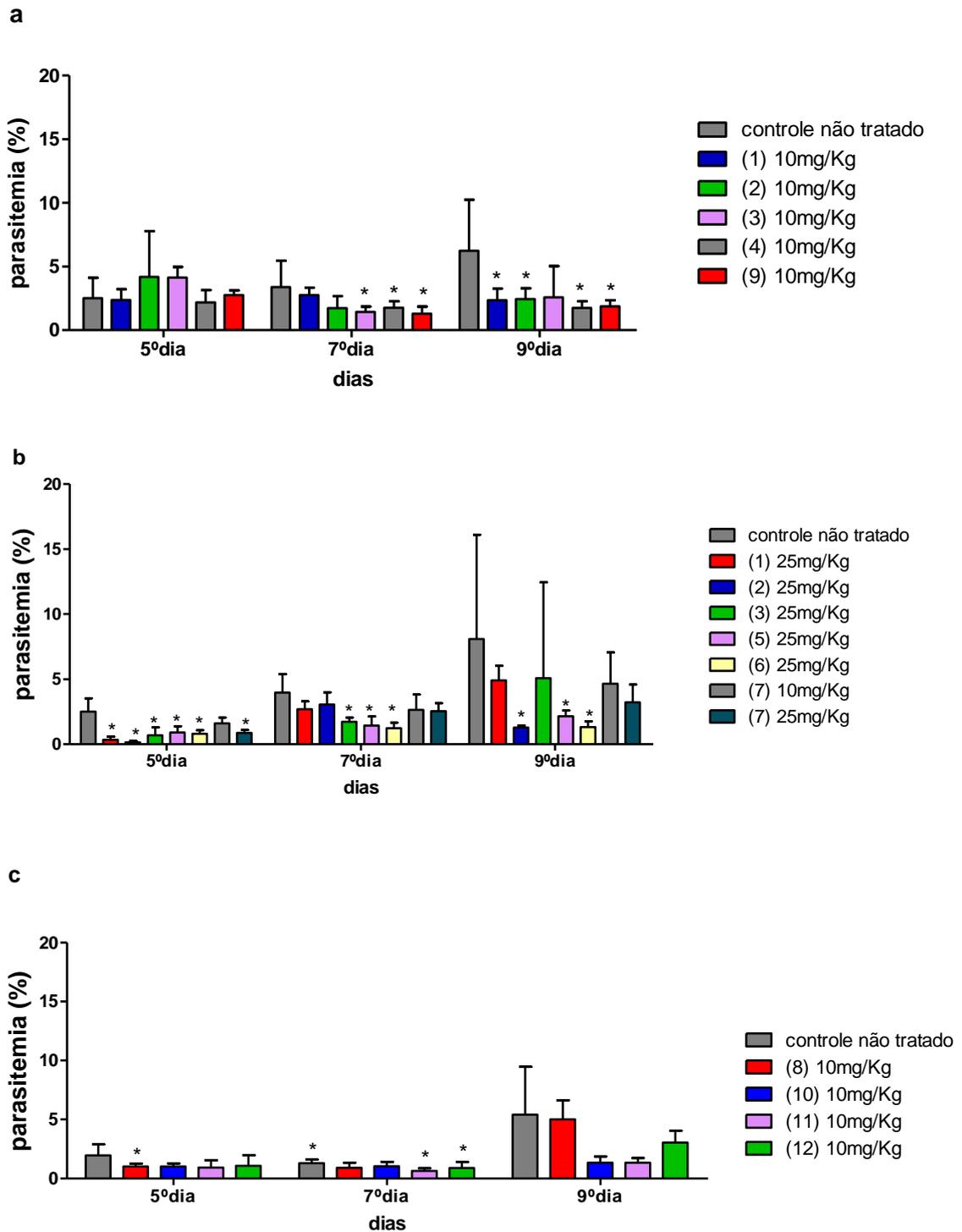


Figura 16- Médias das parasitemias dos grupos tratados com os análogos de quinolina acoplados a alquil-aminas e complexos de platina. Cada grupo continha 5 camundongos. a- experimento 1; b- experimento 2; c- experimento 3. * $p < 0,05$ (diferenças significativas em relação ao grupo controle não tratado utilizando o Teste de Mann-Whitney).

5.2.2- Sobrevivência

Não houve diferença na sobrevivência entre o grupo controle não tratado e os grupos tratados com os compostos. Os camundongos do grupo controle tratado sobreviveram até o fim do experimento. Dados na **Tabela 12**.

Tabela 12- Mortalidade dos camundongos infectados com *Plasmodium berghei* NK65 e tratados com os análogos de quinolina acoplados a alquilaminas e complexos de platina (mortos/vivos)^a

| Compostos | Dose (mg/Kg) | Dia 3 | Dia 5 | Dia 8 |
|--------------|--------------|-------|-------|-------|
| não tratados | 0 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 1 | 10 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 1 | 25 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 2 | 10 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 2 | 25 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 3 | 10 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 3 | 25 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 4 | 10 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 5 | 25 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 6 | 25 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 7 | 10 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 7 | 25 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 8 | 10 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 9 | 10 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 10 | 10 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 11 | 10 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 12 | 10 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |

^a cada grupo teve n=5.

5.2.3- Citotoxicidade *in vitro*

Os compostos **1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11** não foram citotóxicos em ensaios realizados *in vitro* na concentração de 100µM, com exceção dos compostos **3 e 12**, demonstrando os valores 43,5% e 56,2%, respectivamente. Nenhuma modificação comportamental ou alteração macromorfológica no fígado, baço e rins foram observadas.

5.2.4- Índice de massa de fígado e baço

Não houve diferença significativa entre os índices desses órgãos quando comparados os grupos tratados com os análogos e o controle não tratado. Resultados na **Figura 17**.

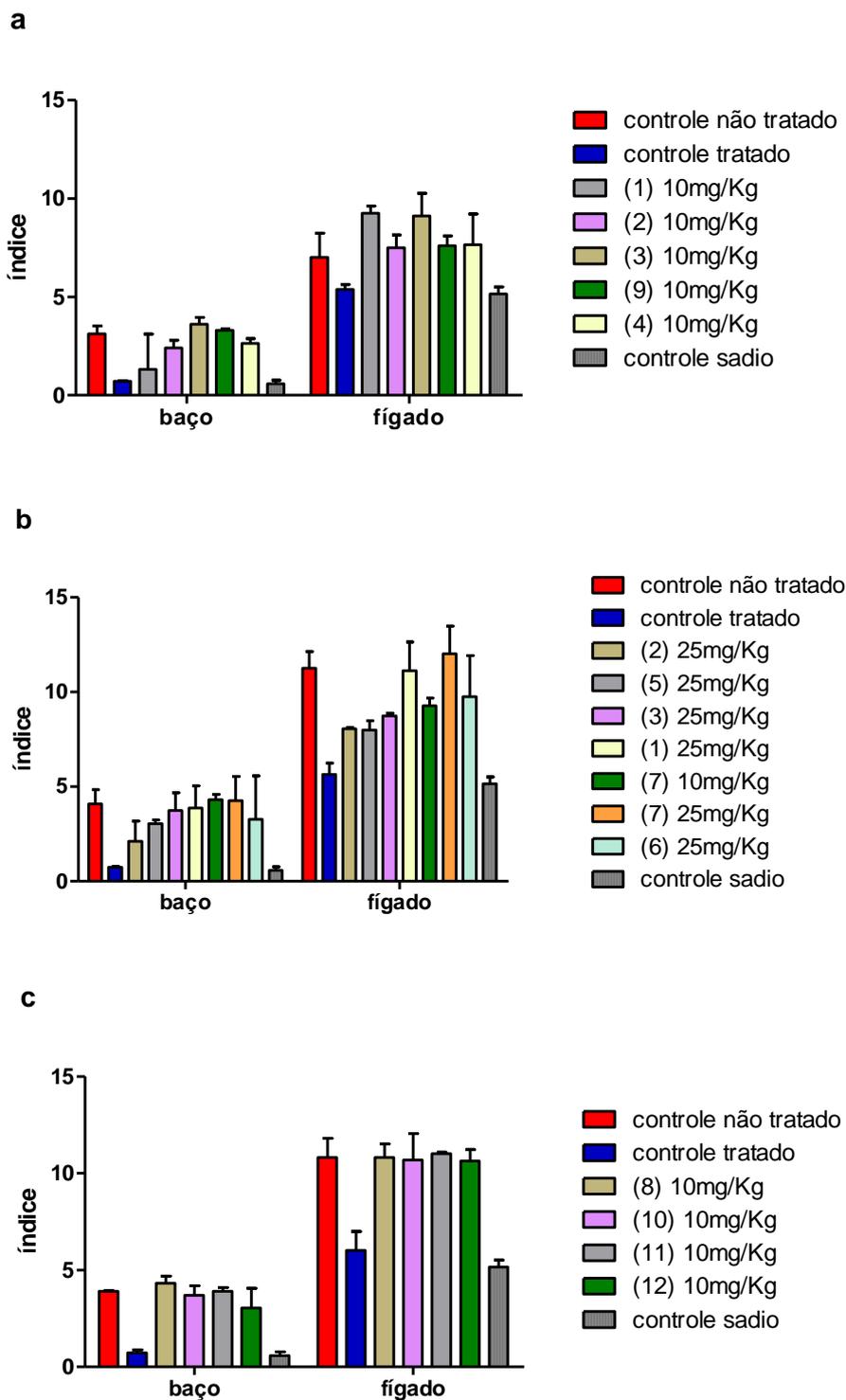


Figura 17- Índices de massa de fígado e baço de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* NK65 e tratados com os análogos de quinolina acoplados a alquil-aminas e complexos de platina. Cada grupo continha 5 camundongos. a- experimento 1; b- experimento 2; c- experimento 3. Não houve significância estatística entre nenhum grupo.

6- DISCUSSÃO

Num cenário onde a malária é responsável por milhões de mortes (WHO, 2009) e a resistência a antimaláricos não somente por *Plasmodium falciparum*, mas também por *P. vivax* (MURPHY et al, 1993; WHITE, 1996) é crescente, torna-se urgente a busca por novas alternativas quimioterápicas, já que esta é a principal base do controle da doença (ROSENTHAL, 2003). Sendo assim, este trabalho concentrou esforços na avaliação antimalárica de análogos da cloroquina acoplados a 6-mercaptopurina e a alquil-aminas e seus complexos de platina. Portanto, aspectos relacionados a essas classes de compostos e sua atuação como antimaláricos serão abordados a seguir.

6.1 – Análogos de quinolina acoplados a 6-mercaptopurina

O metabolismo de purinas é essencial para processos celulares fundamentais como constituição de ácidos nucléicos, coenzima e participam na modulação de reações enzimáticas (GHÉRARDI & SARCIRON, 2007). Os análogos de purina levariam à toxicidade para o parasito por consequência de transporte e/ou metabolismo em nucleotídeos tóxicos no parasito (EL KOUNI, 2003). Suas abordagens terapêuticas se baseiam em agirem como pró-drogas, o que levaria à formação de compostos tóxicos para o parasito; inibição do transporte de nucleobases/nucleosídeos; inibição de enzimas envolvidas no metabolismo de purinas (GHÉRARDI & SARCIRON, 2007).

O potencial dos análogos de purina em constituírem uma nova classe de antimaláricos se baseia na inabilidade dos parasitos da malária em sintetizar purinas *de novo*. Nesse sentido, o presente trabalho avaliou a atividade antimalárica de derivados de purina, cujos aspectos serão discutidos a seguir.

6.1.1 – Atividade antimalárica dos análogos de quinolina acoplados a 6-mercaptapurina

O análogo de quinolina acoplado a 6-mercaptapurina MPQUI apresentou-se como a molécula mais promissora com altos valores de supressão da parasitemia similar ou até superior à cloroquina. A supressão da parasitemia na dose de 5mg/Kg manteve-se elevada ao longo dos 3 dias avaliados. Apesar de a supressão da parasitemia na dose de 50mg/Kg ter atingido altos valores nos 7º e 9º dias, vale a pena lembrar que esses dados são oriundos de apenas um animal.

Na ausência de distanciamento entre os anéis de quinolina e purina (MPQUI), a supressão da parasitemia aumentou do 7º ao 9º dia na dose de 25mg/Kg. Entretanto, na presença de distanciamento (MPQUI propil e MPQUI pentil), ocorre diminuição na supressão nestes dias.

O análogo MPQUI propil, molécula que apresenta 3 grupos metilênicos entre os anéis de quinolina e purina, apresentou os menores valores de supressão da parasitemia. Entretanto, ela ultrapassou 50% no 9º dia na dose de 5mg/Kg.

O análogo MPQUI pentil, molécula que apresenta 5 grupos metilênicos entre os anéis de quinolina e purina, apresentou como valores de supressão da parasitemia mais expressivos no 5º dia nas dose de 5 e 25mg/Kg, atingindo aproximadamente 60%. Não obstante, atinge valores de supressão que se aproximaram dos 50%.

A enzima mais importante envolvida no metabolismo de purinas nos parasitos da malária é a hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (HGXFRT). Ela é a única enzima capaz de realizar o processo de incorporação da hipoxantina – a principal purina usada pelo parasito (REYES et al, 1982) – podendo este ser o alvo dos análogos, tendo em vista que já foi reportado que 6-mercaptapurina é um inibidor competitivo da HGXFRT (QUEEN et al, 1990). Além disso, interações com as moléculas de heme devem ser consideradas, como já observado para análogos de adenosina (RODENKO et al, 2007). Entretanto, outros alvos como enzimas dependentes de nucleotídeos não devem ser excluídos (HARMSE et al, 2001; DOERIG et al, 2002; DE KONING et al, 2005).

No que diz respeito aos índices de fígado e baço dos camundongos tratados com MPQUI, foi possível perceber uma tendência de aumento desta medida conforme as doses deste análogo diminuem, apesar de não haver significância estatística entre nenhum grupo. Além disso, os índices dos grupos tratados com

MPQUI propil e MPQUI pentil nas várias doses não diferiram de forma expressiva em relação aos grupos controle, não havendo também significância estatística.

Faz-se necessário lembrar que não há dados de camundongos não infectados e tratados com MPQUI nas doses de 100, 50 e 25mg/Kg, pois os mesmos morrem antes da data da coleta em decorrência da toxicidade da droga em altas doses. Já foi observada hepatotoxicidade a partir do tratamento com 6-mercaptopurina (NYGAARD et al, 2004; SHAYE et al, 2007), o que pode ajudar a explicar o ocorrido com os animais tratados com MPQUI.

6.2 – Análogos da cloroquina acoplados a alquil-aminas e seus complexos de platina

Apresentando um vasto potencial farmacológico (KOUZNETSOV & MELÉNDEZ-GÓMEZ, 2005), sendo a principal base da quimioterapia antimalárica (FOLEY & TILLEY, 1998; GOMES et al, 2005), as quinolinas representam uma classe promissora de fármacos considerando seu ponto de ação.

A detoxificação do heme é um processo crítico para a sobrevivência do parasito da malária (GOLDBERG & SLATER, 1992). A pesquisa por drogas que se baseiam na inibição desse processo pode fornecer potentes antimaláricos (BAZARARTE et al, 2009). Nesse contexto, análogos de cloroquina acoplados a alquil-aminas e seus complexos de platina foram avaliados quanto a sua atividade antimalárica serão abordadas a seguir.

6.2.1 – Atividade antimalárica dos análogos da cloroquina acoplados a alquil-aminas e seus complexos de platina

Tais análogos, em maioria, atingiram valores de supressão da parasitemia que variam entre 70 e 94%, destacando-se o composto **2** a 25mg/Kg. Todos promoveram supressão similar ou superior à cloroquina – comparados nas mesmas doses – nos dias 7 e 9. Os compostos testados nas doses de 10 e 25mg/Kg, promoveram um aumento da supressão da parasitemia no 9º dia nesta última dose (compostos **2**, **3** e **7**).

Na dose de 25mg/Kg, as moléculas que apresentam 2, 3 e 4 grupos metilênicos na cadeia lateral (entre o alcino terminal e o anel quinolínico) e apenas 1 alcino promoveram os maiores valores de supressão da parasitemia no

5º dia (compostos **1**, **2** e **3**). Já as moléculas que têm a adição de um segundo alcino – comparando-se os compostos **2** e **6** – demonstram uma menor supressão no 5º dia, maior no 7º e praticamente se manteve no 9º. A mesma observação é válida quando comparados os compostos **1** e **5**, porém no 9º dia há um aumento na supressão da parasitemia.

Entre as moléculas acopladas a complexo de platina, aquelas com 2 grupos metilênicos nesta parte e nenhum alcino (composto **8**) demonstram supressão da parasitemia no 5º dia, a qual decresce nos outros dias. A supressão da parasitemia ocorreu nos 7º e 9º dias, mas não no 5º com a molécula que tem 3 grupos metilênicos na referida estrutura (composto **9**). Se comparados os compostos **8** e **10** – o último é acrescido de 1 alcino na extremidade da estrutura – pode-se perceber que o valor da supressão da parasitemia difere apenas no 9º dia, sendo mais de 10 vezes maior para o composto **10**. Ao comparar-se os compostos **10** e **11** - cuja diferença reside na adição de 1 alcino no composto **11**) – percebe-se que os valores de supressão da parasitemia são similares, diferindo de maneira mais expressiva no 7º dia, quando a supressão atinge um valor 2 vezes maior. Se considerados os compostos **11** e **12** – o último apresenta 1 grupo metilênico a mais no anel componente do complexo de platina – nota-se menor supressão ao longo dos dias analisados para o último. Por fim, se comparados os compostos **8** e **11**, cuja diferença é representada pela adição de 2 alcinos na extremidade da estrutura do complexo de platina, o último promoveu supressão expressivamente maior nos 7º e 9º dias.

Um dos alvos da atividade antimalárica é a detoxificação realizada pelo parasito do radical heme ou ferriprotoporfirina IX (Fp-IX) (CHONG & SULLIVAN, 2003). Com relação ao mecanismo de ação desses análogos, sabe-se que as quinolinas se ligam ao heme para inibir a formação de hemozoína (SULLIVAN et al, 1996) e devem também ter como alvo a degradação do heme pela glutatona no citosol (GINSBURG et al, 1998). Os mecanismos desse processo têm sido elucidados e demonstram que a Fp-IX gerada no vacúolo, que é produto da digestão da hemoglobina e também é tóxica para o parasito, é polimerizada em hemozoína insolúvel, o pigmento malárico. As aminoquinolinas acumulam dentro do vacúolo e formam complexos com a Fp-IX e conseqüentemente inibem a formação de hemozoína (CHOU & FITCH, 1992; SLATER & CERAMI, 1992; EGAN et al, 1994; DORN et al, 1995; SULLIVAN et al, 1996a; BLAUER &

AKKAWI, 1997; DORN et al, 1998). Então, o parasito é impedido de detoxificar o heme, o que o mata (DORN et al, 1998).

A degradação por peróxido de hidrogênio (LORIA et al, 1999) também não deve ser descartada, adicionalmente à polimerização em hemozoína (SLATER et al, 1991) e degradação pela glutatona (GINSBURG et al, 1998) – processos sobre os quais as 4-aminoquinolinas interferem (FOLEY & TILEY, 1998).

Com relação aos índices de fígado e baço de camundongos tratados com esses análogos, não houve diferença entre os grupos tratados com os mesmos e os grupos controle. Não foi observada também significância estatística entre os grupos.

6.3 – Aspectos imunológicas sobre o tratamento com análogo de cloroquina acoplado a 6-mercaptipurina MPQUI

Considerando o uso de mercaptopurinas como imunossuppressores (DUBINSKY, 2004), supõe-se que seus análogos influenciem a resposta imune do hospedeiro. Sabe-se que para um bom desenvolvimento de uma resposta imune, a proliferação celular – processo dependente da síntese de purinas – de linfócitos T e B desempenha papel indispensável (FINE et al, 2007), o que por sua vez sofre influência de citocinas.

A resposta imune à malária pode ser influenciada pelo tratamento antimalárico (SALMERON & LIPSKY, 1983; LIN et al, 1995; WHITE, 1998; HUGOSSON et al, 2002; MA et al, 2007). Já foi relatado que o perfil de citocinas pode ser alterado em decorrência do tratamento com composto que exibiu atividade antimalárica, o que levou à exacerbação da doença (ADESOMOJU et al, 2007; OJO-AMAIZE et al, 2001; BASTOS et al, 2002; WALTHER et al, 2006). Além disso, a própria doença causa imunossupressão (OCAÑA-MORGNER et al, 2003; HISAEDA et al, 2004) e a cura depende tanto de resposta imune eficiente como também de um tratamento antimalárico eficaz (TARGETT, 1992).

Sendo o análogo MPQUI um derivado de 6-mercaptipurina, decidiu-se analisar aspectos imunológicos decorrentes do tratamento com esse composto, o qual exibiu expressiva atividade antimalárica em baixas doses e perfil tóxico nas maiores doses, nos instigando a investigá-lo.

Foi possível observar que no grupo de camundongos infectados e tratados com MPQUI, é possível perceber que à medida que a dose dos análogos diminui, os valores médios de TNF- α aumentam. Isso talvez reflita a relação atividade antimalárica do análogo e os processos desencadeados pela doença, dentre os quais se encontra a produção elevada de TNF- α (HUNT & GRAU, 2003). O análogo foi capaz de inibir a multiplicação do parasito, ocasionando menor exposição do hospedeiro aos antígenos do mesmo e conseqüentemente a uma menor produção de TNF- α . Não obstante, o valor médio da citocina no grupo controle tratado e infectado apresenta-se menor que o grupo saudável, o que pode ser decorrente da influência da cloroquina na resposta imune (SALMERON & LIPSKY, 1983; BYGBJERG & FLACHS, 1986; PICOT et al, 1986; LIN et al, 1995; WHITE, 1998; HUGOSSON et al, 2002), já que afeta a proliferação de linfócitos (BYGBJERG & FLACHS, 1986), os quais constituem uma das fontes de TNF- α e também inibe a produção desta citocina (HUGOSSON et al, 2002). Na ausência de infecção, pôde-se perceber uma tendência de aumento nas dosagens da citocina com o aumento das doses de MPQUI apesar de não haver significância estatística entre os grupos. Isso pode ser explicado pelo fato de alguns xenobióticos contribuírem para a inflamação (GANEY & ROTH, 2001) processo em que há grande produção de TNF- α .

No que diz respeito às dosagens de IL-10 nos camundongos infectados e tratados com MPQUI, pode-se perceber uma certa similaridade entre os grupos tratados e o controle não tratado, com exceção do grupo tratado com MPQUI na dose de 1mg/Kg. Como nesta dose não houve atividade antimalárica, o papel protetor dessa citocina, que é anti-inflamatória, torna-se importante (HUNT & GRAU, 2003). Na ausência de infecção, foi possível perceber uma tendência de aumento nas dosagens da citocina com o aumento das doses de MPQUI apesar de não haver significância estatística entre os grupos. Já foi relatado que o tratamento com derivado de adenosina (LE MOINE et al, 1996; NÉMETH et al, 2005) e agonista de receptor de adenosina (HASKO et al, 1996) causa o aumento da produção de IL-10. Esse raciocínio deve ser válido para MPQUI, já que adenosina é uma purina.

Uma outra citocina que talvez reflita melhor um perfil de imunossupressão é TGF- β . TGF- β é uma molécula imunorregulatória que em altas concentrações pode suprimir a produção de TNF- α e NO dos macrófagos, além de inibir a

produção de IFN- γ e TNF- α das células NK. Na malária murina, ela determina o equilíbrio entre o aspecto protetor e patológico. Baixos níveis podem ser associados ao caráter letal da doença, enquanto níveis sustentáveis podem ser associados à resolução da mesma. Em modelos murinos de infecção por *Plasmodium berghei* ANKA e *Plasmodium chabaudi* AS, TGF- β se mostrou crítica para sobrevivência, já que o tratamento com anticorpos neutralizantes levou à exacerbação da virulência. Seus níveis estão inversamente relacionados à severidade da doença, o que sugere o seu papel em contra-regular a produção de citocinas pró-inflamatórias potencialmente patogênicas (OMER et al, 2000).

As contagens diferenciais de leucócitos foram similares entre o grupo de camundongos controles tratados com a droga padrão (cloroquina) e MPQUI a 5mg/Kg, o que evidencia que essas drogas apresentaram um comportamento semelhante. O perfil similar observado nos grupos de camundongos não infectados, não tratados e tratados com os análogos reflete o fato de os mesmos não influenciarem a contagem dessas células, o que é reforçado pela ausência de significância estatística entre os grupos.

7- CONCLUSÕES

- ✓ Dos análogos de cloroquina acoplados a 6-mercaptopurina, o melhor foi MPQUI a 5mg/Kg, com valores de supressão de aproximadamente 70% e superiores à cloroquina;
- ✓ Dos análogos de cloroquina acoplados a alquil-aminas e complexos de platina: **1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 e 11** apresentaram valores de supressão de aproximadamente 70% e superiores à cloroquina nas mesmas doses;
- ✓ Modificações estruturais dos compostos levaram a análogos de cloroquina com perfis de atividade antimalárica distintos;
- ✓ MPQUI não causou imunossupressão considerados os parâmetros analisados, além de não influenciarem a contagem diferencial de leucócitos dos animais tratados com MPQUI nas várias doses;
- ✓ Os análogos não influenciaram o peso dos órgãos analisados;
- ✓ Os análogos não foram tóxicos em testes *in vitro* (com exceção de MPQUI nas maiores concentrações avaliadas);
- ✓ Enquanto a cloroquina apresenta uma queda na atividade antimalárica ao longo dos dias analisados, alguns compostos, tais como **MPQUI, 2, 3 e 11** apresentam o perfil oposto, com aumento da atividade e valores mais altos que a própria cloroquina considerando as mesmas doses, principalmente no dia 9. Isso instiga à realização de estudos posteriores usando uma abordagem que envolva modificações estruturais, relação estrutura-atividade, biodisponibilidade e modo de ação, o que pode fornecer novos antimaláricos;
- ✓ Os resultados obtidos nesse trabalho já foram objeto de publicações.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, B. N.; THAVASELVAM, D.; KAUSHIK, M. P. 2008. Synthesis and antimalarial evaluation of novel pyridine quinoline hybrids. **Medicinal Chemistry Research**, **17(8)**: 487–494

ADESOMOJU, A.A.; COTTAM, H.B.; NCHEKWUBE, E. J.; OJO-AMAIZE, E. A.; OKOGUN J. I.; OYERMADE, A. O. 2007. *Plasmodium berghei*: Antiparasitic effects of orally administered Hypoestoxide in mice. **Experimental Parasitology** **117(2)**: 218-221.

ALEXANDRE, M.A.; FERREIRA, C.O.; SIQUEIRA, A.M.; MAGALHÃES, B.L.; MOURÃO, M.P.G.; LACERDA, M.V.; ALECRIM, M.G.C. 2010. Severe *Plasmodium vivax* Malaria, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, **16(10)**:1611-1614.

ALMEIDA, R. P.; BARRAL-NETTO, M.; JESUS, A. M. R.; FREITAS, L. A. R.; CARVALHO, E. M.; BARRAL, A. 1996. Biological Behavior of *Leishmania amazonensis* Isolated from Humans with Cutaneous, Mucosal, or Visceral Leishmaniasis in Balb/C Mice. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **54(2)**:178-184.

AMANI, V.; VIGARIO, A.M.; BELNOUE, E.; MARUSSIG, M.; FONSECA, L.; MAZIER, D.; RENIA, L. 2000. Involvement of IFN γ receptor-mediated signaling in pathology and antimalarial immunity induced by *Plasmodium berghei* infection. **European Journal of Immunology**, **30(6)**:1646–1655.

ANDRADE-NETO V. F.; POHLIT, A. M.; PINTO, A. C. S.; SILVA E. C. C.; NOGUEIRA, K. L.; MELO, M. R. S.; HENRIQUE, M. C.; AMORIM, R. C. N.; SILVA, L. F. R; COSTA, M. R. F.; NUNOMURA, R. C. S.; NUNOMURA, S. M.; ALECRIM, W. D.; ALECRIM, M. G. C.; CHAVES, F. C. M.; VIEIRA, P. P. R. 2007.

In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **102 (3)**: 359-365.

ARTAVANIS-TSAKONAS, K. & RILEY, E.M. 2002. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-g from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **The Journal of Immunology**, **169(6)**: 2956–2963.

BARAZARTE, A.; LOBO, G.; GAMBOA, N.; RODRIGUES, J. R.; CAPPARELLI, M. V.; ÁLVAREZ-LARENA, Á.; LÓPEZ, S. E.; CHARRIS, J. E. 2009. Synthesis and antimalarial activity of pyrazolo and pyrimido benzothiazine dioxide derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry** **44(3)**:1303-10.

BASTOS, K.R.; BARBOZA, R.; ELIAS, R.M.; SARDINHA, L.R.; GRISOTTO, M.G.; MARINHO, C.R.; AMARANTE-MENDES, G.P.; ALVAREZ, J.M.; LIMA, M.R. 2002. Impaired macrophage responses may contribute to exacerbation of blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* malaria in interleukin- 12-deficient mice. **Journal of Interferon Cytokine Research**, **22(12)**: 1191–1199.

BEESON, J.G.; OSIER, F. H. A.; ENGWERDA, C. R. 2008. Recent insights into humoral and cellular immune responses against malaria. **Trends in Parasitology**, **24(12)**: 578-584.

BELNOUE, E.; KAYIBANDA, M.; VIGARIO, A. M.; DESCHEMIN, J. C.; VAN ROOIJEN, N.; VIGUIER, M.; SNOUNOU, G.; RÉNIA, L. 2002. On the pathogenic role of brain-sequestered ab CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. **The Journal of Immunology**, **169(11)**: 6369–6375.

BLAUER, G. & AKKAWI, M. 1997. Investigations of B- and b-hematin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, **66(2)**:145–152.

BOKKERINK, J. P.M.; ELISABET, H. S., DE ABREU, R. A.; DAMEN, F. J.M. ; HULSCHER, T. W.; BAKKER, M. A.H.; BAAL, J. A. V. 1993. 6-Mercaptopurine: Cytotoxicity and biochemical pharmacology in human malignant T-lymphoblasts. **Biochemical Pharmacology**, **45(7)**: 1455-1463.

BOURDY, G.; DEHARO, E.; GINSBURG, H.; GRAZ, B.; RASOANAIVO, P.; WILLCOX, M. L. 2007. Ethnopharmacology and malaria: New hypothetical leads or old efficient antimalarials? **International Journal for Parasitology**, **38 (1)**: 33-41.

BRAGA, F. G.; COIMBRA, E. S.; MATOS, M. O.; CARMO, A. M. L.; CANCIO, M. D.; DA SILVA, A. D. 2007. Synthesis and biological evaluation of some 6-substituted purines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, **42(4)**:530-537.

BRAY, P.G.; HAWLEY, S. R.; MUNGTHIN, M.; WARD, S.A. 1996. Physicochemical properties correlated with drug resistance and the reversal of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. **Molecular Pharmacology**, **50(6)**:1559–1566.

BRIDGER W.A & COHEN, L.H. 1963. The mechanism of inhibition of adenylosuccinate lyase by 6-mercaptopurine nucleotide (thioinosinate). **Biochimica et Biophysica Acta**, **73(9)**: 514-516

BUFFET, P. A ; MILON, G.; BROUSSE, V.; CORREAS, J.; DOUSSET, B.; COUVELARD, A.; KIANMANESH, R. ; FARGES, O.; SAUVANET, A.; PAYE, F.; UNGEHEUER, M. ; OTTONE, C.; KHUN, H.; FIETTE, L.; GUIGON, G.; HUERRE, M.; MERCEREAU-PIIJALON, O.; DAVID, P. H. 2006. Ex-vivo perfusion of human spleens maintains clearing and processing functions. **Blood**, **107(9)**:3745-3752.

BYGBJERG, I. C. & FLACHS, H. 1986. Effect of chloroquine on human lymphocyte proliferation. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **80(2)**: 231-235.

CARVALHO, L. H.; BRANDÃO, M. G. L.; SANTOS-FILHO, D.; LOPES, J. L. C.; KRETLI, A. U. 1991. Antimalarial activity of crude extracts from brazilian plants studied in vivo in *Plasmodium berghei*-infected mice and in vitro against *Plasmodium falciparum* in culture. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **24(11)**:1113-1123.

CASAGRANDE, M.; BASILICO, N.; PARAPINI, S.; ROMEO, S.; TARAMELLI, D.; SPARATORE, A. 2008. Novel amodiaquine congeners as potent antimalarial agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, **16(14)**: 6813–6823.

CHONG, C.R.; SULLIVAN, D.J. 2003. Inhibition of heme crystal growth by antimalarials and other compounds: implications for drug discovery. **Biochemical Pharmacology**, **66(11)**: 2201-2212.

CHOU, A.C.; CHEVLI, R.; FITCH, CD. 1980. Ferriprotoporphyrin IX Fulfills the Criteria for Identification as the Chloroquine Receptor of Malaria Parasites. **Biochemistry**, **19(8)**: 1543-1549.

CHOU, A.C. & FITCH, C.D. 1992. Heme polymerase—modulation by chloroquine treatment of a rodent malaria. **Life Sciences**, **51(26)**:2073–2078.

CLARK, I.A. & ROCKETT, K.A. 1994. The cytokine theory of human cerebral malaria. **Parasitology Today**, **10(10)**: 410–412.

COLLINS, W. E.; JEFFERY, G. M. 2007 (a). *Plasmodium malariae*: Parasite and Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, **20(4)**: 579–592.

COLLINS, W. E.; JEFFERY, G. M. 2007 (b). *Plasmodium ovale*: Parasite and Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, **18(3)**: 570-581.

COX-SINGH, J.; DAVIS, T. M. E.; LEE, K.-S.; SHAMSUL, S. S. G.; MATUSOP, A.; RATNAM, S.; RAHMAN, H. A.; CONWAY, D. J.; SINGH, B. 2008. *Plasmodium knowlesi* Malaria in Humans Is Widely Distributed and Potentially Life Threatening. **Clinical Infectious Diseases**, **46(2)**:165–71.

COULTHARD, S. & HOGARTH, L. 2005. The thiopurines: An update. **Investigational New Drugs**, **23(6)**: 523-532.

COURA J. R.; SUÁREZ-MUTIS, M.; LADEIA-ANDRADE, S. 2006. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic Plasmodium infection - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **101(3)**:229-237.

DA SILVA, A. D.; MACHADO, A. S.; TEMPETE, C.; GERO, M. R. 1994. Synthesis and biological activity of methyl-D-glucopyranoside derivatives of mercaptopurine and mercaptopyrimidine. **European Journal of Medicinal Chemistry**, **29(25)**:149–152.

DE KONING, H. P.; BRIDGES, D. J.; BURCHMORE, R. J. 2005. Purine and pyrimidine transport in pathogenic protozoa: from biology to therapy. **FEMS Microbiology Reviews**, **29(5)**:987–1020.

DOERIG, C.; L. MEIJER, L.; MOTTRAM, J. C. 2002. Protein kinases as drug targets in parasitic protozoa. **Trends in Parasitology**, **18(8)**:366–371.

DORN, A.; STOFFEL, R.; MATILE, H.; BUBENDORF, A.; RIDLEY, R. 1995. Malarial haemozoin/b-haematin supports haem polymerization in the absence of protein. **Nature**, **374(6519)**:269–271.

DORN, A.; VIPPAGUNTA, S. R.; MATILE, H.; JACQUET, C.; VANNERSTROM, J. L.; RIDLEY, R. G. 1998. An assessment of drug-haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerisation by quinoline antimalarials. **Biochemical Pharmacology**, **55(6)**:727–736.

DUBINSKY, M.C. 2004. Azathioprine, 6-mercaptopurine in inflammatory bowel disease: Pharmacology, efficacy, and safety. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, **2(9)**: 731-743

EGAN, T. J.; ROSSA, D. C.; ADAMS, P. A. 1994. Quinoline anti-malarial drugs inhibit spontaneous formation of β -haematin (malaria pigment). **FEBS Letters**, **352(1)**: 54-57.

EL KOUNI, M. H. 2003. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. **Pharmacology and Therapeutics**, **99(3)**:283–309.

FIDOCK, D.A.; EASTMAN, R.T.; WARD, S.A.; MESHNICK, S.R. 2008. Recent highlights in antimalarial drug resistance and chemotherapy research. **Trends in Parasitology**, **24(12)**: 537-544.

FINE, R. N.; WEBBER, S. A.; HARMON, W. E.; KELLY, D. A.; Olthoff, K. M. 2007. **Pediatric Solid Organ Transplantation**. 2^a ed., Wiley-Blackwell, Hardcover.

FITCH, C.D.; CHEVLI, R.; BANYAL, H.S.; PHILLIPS, G.; PFALLER, M.A.; KROGSTAD, D.J. 1982. Lysis of *Plasmodium falciparum* by ferriprotoporphyrin IX and a chloroquine-ferriprotoporphyrin IX complex. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **21(5)**: 819-822.

FITCH, C. D. 2004. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. **Life Sciences**, **74(16)**: 1957-1972

FOLEY, M. & TILLEY, L. 1997. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance. **International Journal for Parasitology**, **27(2)**:231–240.

FOLEY, M. & TILLEY, L. 1998. Quinoline Antimalarials: Mechanisms of Action and Resistance and Prospects for New Agents. **Pharmacology and Therapeutics**, **79(1)**: 55-87.

FOX, R. I. & KANG, H. I. 1993. Mechanisms of action of antimalarial drugs: Inhibition of antigen processing and presentation. **Lupus 2(1)(Suppl. 1)**: S9-S12.

GANEY, P. E. & ROTH, R. A. 2001. Concurrent inflammation as a determinant of susceptibility to toxicity from xenobiotic agents. **Toxicology**, **169(3)**: 195-208.

GELB, M.H. 2007. Drug discovery for malaria: a very challenging and timely endeavor. **Current Opinion in Chemical Biology**, **11(4)**:440–445.

GHÉRARDI, A. & SARCIRON, M. E. 2007. Molecules targeting the purine salvage pathway in Apicomplexan parasites. **Trends in Parasitology**, **23(8)**:384–389.

GINSBURG, H.; FAMIN, O.; ZHANG, J.; KRUGLIAK, M. 1998. Inhibition of glutathione-dependant degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarials mode of action. **Biochemical Pharmacology**, **56(10)**: 1305–1313

GOLDBERG, D.E.; SLATER, A.F.G. 1992. The pathway of hemoglobin degradation in malaria parasites. **Parasitology Today**, **8(8)**: 280-283.

GOMES, P.; MOREIRA, R.; VALE, N. 2005. Quimioterapia da malária - um século no desenvolvimento de antimaláricos. **Química**, **99**:57-69.

GRAU, G.E.; FAJARDO, L.F.; PIGUET, P. F.; ALLET, B.; LAMBERT, P. H.; VASSALLI, P. 1987. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. **Science**, **237(4819)**:1210–1212 .

GRAU, G. E.; PIGUET, P. F.; VASSALLI, P.; LAMBERT, P. H. 1989. Tumor necrosis factor and other cytokines in cerebral malaria: experimental and clinical data. **Immunological Reviews**, **112(1)**: 49–70.

HAFALLA, J. C. R.; COCKBURN, I. A.; ZAVALA, F. 2006. Protective and pathogenic roles of CD8+ T cells during malaria infection. **Parasite Immunology**, **28(1-2)**:15–24.

HARMSE, L., VAN ZYL, R.; GRAY, N.; SCHULTZ, P.; LECLERC, S.; MEIJER, L.; DOERIG, C.; HAVLIK, I. 2001. Structure-activity relationships and inhibitory effects of various purine derivatives on the in vitro growth of *Plasmodium falciparum*. **Biochemical Pharmacology**, **62(3)**:341–348.

HASKO, G.; SZABO, C.; NEMETH, Z. H.; KVETAN, V.; PASTORES, S. M.; VIZI, E. S. 1996. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. **The Journal of Immunology**, **157(10)**: 4634-4640.

HISAEDA, H.; MAEKAWA, Y.; IWAKAWA, D.; OKADA, H.; HIMENO, K. ; KISHIHARA, K.; TSUKUMO, S.; YASUTOMO, K. 2004. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nature Medicine**, **10(1)**: 29-30.

HUGOSSON, E., BJORKMAN, A., TROYE-BLOMBERG, M., 2002. Chloroquine enhances the number of IL-10 producing cells and the expression of B7-2 and ICAM-1 in in vitro-cultured PBMC. **Scandinavian Journal of Immunology**, **55(4)**: 399–98.

HUNT, N. H. & GRAU, G. E. 2003. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. **Trends in Immunology**, **24(9)**: 491-499.

JANA, S.; PALIWAL, J. 2007. Novel molecular targets for antimalarial chemotherapy. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **30(1)**: 4–10.

JEFFORD, C. W. 2007. New developments in synthetic peroxidic drugs as artemisinin mimics. **Drug Discovery Today**, **12(11-12)**: 487-495.

KEITH, C.T.; BORISY, A.A.; STOCKWELL, B.R. 2005. Multicomponent therapeutics for networked systems. **Nature Reviews Drug Discovery**, **4**: 71-78.

KOLAKOVICH, K., GLUZMAN, I., DUFFIN, K., GOLDBERG, D., 1997. Generation of hemoglobin peptides in the acidic digestive vacuole of *Plasmodium falciparum* implicates peptide transport in amino acid production. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **87(2)**: 123-135.

KOMATSU, R.; LOW-BEER, D.; SCHWARTLÄNDER, B. 2007. Global Fund-supported programmes contribution to international targets and the Millennium Development Goals: an initial analysis. **Bulletin of The World Health Organization** **85(10)**:805-811.

KOUZNETSOV, V. & MELÉNDEZ-GÓMEZ, C. 2005. Alcalóides quinolínicos: importancia biológica y esfuerzos sintéticos. **UNIVERSITAS SCIENTIARUM - Revista de la Facultad de Ciências** **10 (2)**:5-18.

KWIATKOWSKI, D.; SAMBOU, I.; TWUMASI, P.; GREENWOOD, B. M.; HILL, A. V. S.; MANOGUE, K. R.; CERAMI, A.; CASTRACANEM J.; BREWSTER, D. R. 1990. TNF concentration in fatal cerebral, nonfatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **Lancet**, **336(8725)**: 1201–1204.

LANDFEAR, S. M.; ULLMAN, B.; CARTER, N. S.; SANCHEZ, M.A. 2004. Nucleoside and nucleobase transporters in parasitic protozoa. **Eukaryotic Cell**, **3(2)**:245–254.

LANKINEN, K.S.; BERGSTROM, S.; MAKELA, P.H.; PELTOMAA, M. 1994. Health and Disease in Developing Countries. **London and Basingstoke, The Macmillan Press**, 147-162.

LEE, C. M.; HOGAN, Y.; ABOKO-COLE, G. F. 1979. Immunobiology of Malaria. **Journal Of The National Medical Association**, **71(4)**: 349-351.

LE MOINE, O.; STORDEUR, P.; SCHANDENE, L.; MARCHANT, A.; DE GROOTE, D.; GOLDMAN, M.; DEVIERE, J. 1996. Adenosine enhances IL-10 secretion by human monocytes. **The Journal of Immunology**, **156 (11)**: 4408-4414.

LIN, P.Y., FENG, Z.M., PAN, J.Q., ZHANG, D., XIAO, L.Y., 1995. Effect of artesunate on immune function in mice. **Acta Pharmacologica Sinica**, **16(5)**: 441-444.

LONG, C.A. 2003. Immunity to blood stages of malaria. **Current Opinion in Immunology**, **5(4)**: 548-556.

LORIA, P.; MILLER, S.; FOLEY, M.; TILLEY, L. 1999. Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials. **Biochemical Journal**, **339 (Pt 2)**: 363-70

MA, S.; ZHENG, L.; LIU, Y.; GUO, S.; FENG, H.; CHEN, G.; LI, D.; WANG, J.; CAO, Y. 2007. *Plasmodium yoelii*: Influence of antimalarial treatment on acquisition of immunity in BALB/c and DBA/2 mice. **Experimental Parasitology**, **116(3)**: 266-272.

MACKINTOSH, C.L.; BEESON, J.G.; MARSH, K. 2004. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. **Trends in Parasitology**, **20(12)**:597-603.

MACREADIE, I.; GINSBURG, H.; SIRAWARAPORN, W.; TILLEY, L. 2000. Antimalarial drug development and new targets. **Parasitology Today**,**16**: 438–44.

MADAPA, S.; TUSI, Z.; SRIDHAR, D.; KUMAR, A.; SIDDIQI, M.I.; SRIVASTAVA, K.; RIZVI, A.; TRIPATHI, R. S.; PURI, K.; KESHAVA, G.B.S.; SHUKLA, P.K.; BATRA, S. 2009. Search for new pharmacophores for antimalarial activity. Part I: Synthesis and antimalarial activity of new 2-methyl-6-ureido-4-quinolinamides. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, **17**: 203-221

MENDIS, K. ; SINA, B. J.; MARCHESINI, P.; CARTER, R. 2001. The neglected burden of plasmodium vivax malaria. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **64(1, 2)**: 97–106.

MESHNICK, S.R.; TAYLOR, T.E.; KAMCHONWONGPAISAN, S. 1996. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: From herbal remedy to targeted chemotherapy. **Microbiology Reviews**, **60**:301-315.

MCKIE, J. H.; DOUGLAS, K. T.; CHAN, C.; ROSER, S. A. ; YATES, R.; READ, M.; HYDE, J. E.; DASCOMBE, M. J.; YUTHAVONG, Y.; SIRAWARAPORN, W. 1998. Rational Drug Design Approach for Overcoming Drug Resistance: Application to Pyrimethamine Resistance in Malaria. **Journal of Medicinal Chemistry**, **41**: 1367-1370.

MILLER, L.H.; BARUCH, D.I.; MARSH, K.; DOUMBO, O.K. 2002. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, **415**: 673-679.

MIRON, T. ; ARDITTI, F. ; KONSTANTINOVSKI, L. ; RABINKOV, A. ; MIRELMAN, D. ; BERREBI, A. ; WILCHEK, M. 2009. Novel derivatives of 6-mercaptopurine: Synthesis, characterization and antiproliferative activities of S-allylthio-mercaptopurines **European Journal of Medicinal Chemistry**, **44**:541–550.

MISHRA, A.; SRIVASTAVA, K.; TRIPATHI, R.; PURI, S. K.; BATRA, S. 2009. Search for new pharmacophores for antimalarial activity. Part III: Synthesis and

bioevaluation of new 6-thioureido-4-anilinoquinazolines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, **44 (11)**: 494-4412.

MOLYNEUX, M. E.; TAYLOR, T. E.; WIRIMA, J. J.; GRAU, G. E. 1991. Tumour necrosis factor, interleukin-6, and malaria. **The Lancet**, **337(8749)**: 1098.

MOLYNEUX, M.E.; ENGELMANN, H.; TAYLOR, T. E.; WIRIMA, J. J.; ADERKA, D.; WALLACH, D.; GRAU, G. E. 1993. Circulating plasma receptors for tumour necrosis factor in Malawian children with severe falciparum malaria. **Cytokine**, **5(6)**: 604–609.

MOSSMAN, N. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, **65(1-2)**: 55-63.

MUELLER, I.; ZIMMERMAN, P. A.; REEDER, J. C. 2007. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* – the ‘bashful’ malaria parasites. **Trends in Parasitology**, **23(6)**: 278-282.

MUREGI, F.W.; KANO, S.; KINO, H.; ISHII, A. 2009. *Plasmodium berghei*: Efficacy of 5-fluoroorotate in combination with commonly used antimalarial drugs in a mouse model. **Experimental Parasitology**, **121(4)**: 376-380.

MURPHY, G.S.; BASRI, H.; PURNOMO; ANDERSEN, E.M.; BANGS, M.J.; MOUNT, D.L.; GORDEN, J.; LAL, A.A.; PURWOKUSUMO, A.R.; HARJOSUWARNO, S.; SORENSEN, K.; HOVMAN, S.L. 1993. Vivax malaria resistant to treatment and prophylaxis with chloroquine. **Lancet**, **341(8837)**: 96–100.

NÉMETH, Z. H.; LUTZ, C. S.; CSÓKA, B.; DEITCH, E. A.; LEIBOVICH, S. J.; GAUSE, W. C.; TONE, M.; PACHER, P.; VIZI, E. S.; HASKÓ, G. 2005.

Adenosine Augments IL-10 Production by Macrophages through an A2B Receptor-Mediated Posttranscriptional Mechanism. **The Journal of Immunology**, **175**: 8260-8270.

NOLAND, G. S.; URBAN, J. F. J.; FRIED, B.; KUMAR, N. 2008. Counter-regulatory anti-parasite cytokine responses during concurrent *Plasmodium yoelii* and intestinal helminth infections in mice. **Experimental Parasitology**, **119(2)**: 272-278.

NYGAARD, U.; TOFT, N.; SCHMIEGELOW, K. 2004. Methylated metabolites of 6-mercaptopurine are associated with hepatotoxicity. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, **75**: 274–281.

OCAÑA-MORGNER, C.; MOTA, M. M.; RODRIGUEZ, A. 2003. Malaria Blood Stage Suppression of Liver Stage Immunity by Dendritic Cells. **The Journal of Experimental Medicine**, **197(2)**: 143–151.

OJO-AMAIZE, E.A.; KAPAHI, P.; KAKKANAI AH, V.N.; TAKAHASHI, T.; SHALOM-BARAK, T.; COTTAM, H.B.; ADESOMOJU, A.A.; NCHEKWUBE, E.J.; OYEMADE, O.A.; KARIN, M.; OKOGUN, J.I. 2001. Hypoestoxide, a novel anti-inflammatory natural diterpene, inhibits the activity of I[κ]B Kinase. **Cellular Immunology**, **209(2)**: 149–157.

OLLIARO, P.L., GOLDBERG, D.E., 1995. The *Plasmodium* digestive vacuole: metabolic headquarters and choice drug target. **Parasitology Today**, **11(8)**: 294–297.

OLLIARO, P. L.; YUTHAVONG, Y. 1999. An Overview of Chemotherapeutic Targets for Antimalarial Drug Discovery. **Pharmacology and Therapeutics**, **81(2)**, 91–110.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V. G.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L. B.; TAUIL, P. L.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. 2010. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, **9(115)**:1-15

OMER, F.M.; KURTZHALS, J.A.L.; RILEY, E.M. 2000. Maintaining the Immunological Balance in Parasitic Infections: A Role for TGF- β ? **Parasitology Today**, **16(1)**:18-22.

OSORIO, L. M.; FONTE, L.; FINLAY, C. M. 1992. Inhibition of human monocyte function by prophylactic doses of chloroquine. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **46(2)**: 165-168.

PASTERNAK, N.D.; DZIKOWSKI, R. 2009. PfEMP1: An antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, **41(7)**: 1463-1466.

PETERS, W. 1965. Drug resistance in *Plasmodium berghei*. I. Chloroquine resistance. **Experimental Parasitology**, **17(1)**:80-89.

PETIT, E.; LANGOUET, S.; AKHDAR, H.; NICOLAS-NICOLAZ, C.; GUILLOUZO, A.; MOREL, F. 2008. Differential toxic effects of azathioprine, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine on human hepatocytes. **Toxicology In Vitro**, **22(3)**:632–642.

PICOT, S.; PEYRON, F.; DONADILLE, A.; VUILLEZ, J.P.; BARBE, G.; AMBROISE- THOMAS, P. 1993. Chloroquine-induced inhibition of the production of TNF, but not of IL-6, is affected by disruption of iron metabolism. **Immunology**, **80(1)**: 127–133.

POMBO, D. J.; LAWRENCE, G.; HIRUNPETCHARAT, C.; RZEPczyk, C.; BRYDEN, M.; CLOONAN, N.; ANDERSON, K.; MAHAKUNKIJCHAROEN, Y.;

MARTIN, L. B.; WILSON, D.; ELLIOTT, S.; ELLIOTT, S.; EISEN, D. P.; WEINBERG, J. B.; SAUL, A.; GOOD, M. F. 2002. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. **Lancet** , **360(9333)**: 610–617.

QUEEN, S. A. ; JAGT, D. L. ; REYES, P. 1990. In vitro susceptibilities of *Plasmodium falciparum* to compounds which inhibit nucleotide metabolism. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **34(7)**:1393-1398.

QUINN, T. C. & WYLE, D. J. 1980. Resolution of Acute Malaria (*Plasmodium berghei* in the Rat): Reversibility and Spleen Dependence. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **29(1)**: 1-4.

RAPAPORT, E.; MISIURA, K.; AGRAWAL, S.; ZAMECNIK, P. 1992. Antimalarial activities of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* **Proceedings of the National Academy of Sciences of The USA**, **89**: 8577-8580.

REYES, P.; RATHOD, P. K.; SANCHEZ, D. J.; MREMA, J. E. K.; RIECKMANN, K. H.; HEIDRICH, H. G. 1982. Enzymes of purine and pyrimidinemetabolism from the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **5(5)**:275–290.

RICHARDS, A. L. 1997. Tumour Necrosis Factor and Associated Cytokines in the Host's Response to Malaria. **International Journal for Parasitology**, **27 (10)**: 1251-1263.

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

RIDLEY, R. G. 2003. To kill a parasite. **Nature**, **424**: 887.

RODENKO, B.; VAN DER BURG, A. M.; WANNER, M. J.; KAISER, M.; BRUN, R.; GOULD, M.; DE KONING, H. P.; KOOMEN, G. J. 2007. 2,N⁶-disubstituted adenosine analogs with antitrypanosomal and antimalarial activities. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **51(11)**:3796–3802.

ROSA, R.; SILVEIRA, H.; SEIXAS, E.; ROLAO, N.; SANTOS-GOMES, G.; DO ROSARIO, V. 1999. The effect of chloroquine on the production of interferon gamma, interleukin (IL)-4, IL-6, and IL-10 in *Plasmodium chabaudi chabaudi* in infected C57BL6 mice. **Journal of Parasitology**, **85**: 956–960.

ROSENTHAL, P.J., 2003. Antimalarial drug discovery: old and new approaches. **Journal of Experimental Biology**, **206(21)**: 3735–3744.

SALMERON, G., LIPSKY, P.E., 1983. Immunosuppressive potential of antimalarials. **The American Journal of Medicine** **1(1)**: 19–24.

SATHE, M. & KAUSHIK, M.P. 2010. In vitro and in vivo antimalarial evaluation of semi-synthetic derivatives of gomphostenin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** **20(14)**: 4233-4236

SCHLITZER, M. 2007. Malaria Chemotherapeutics Part I: History of Antimalarial Drug Development, Currently Used Therapeutics, and Drugs in Clinical Development. **ChemMedChem**, **2(7)**: 944 – 986

SCHMIEG, J.; GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G.; TSUJI, M. 2003. The role of natural killer T cells and other T cell subsets against infection by the pre-erythrocytic stages of malaria parasites. **Microbes and Infection**, **5(6)**:499–506.

SCHOFIELD, L. & GRAU, G.E. 2005. Immunological processes in malaria pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, **5**: 722–735.

SERGHIDES, I.; SMITH, T. G.; PATEL, S. N.; KAIN, K. C. 2003. CD36 and malaria: friends or foes? **Trends in Parasitology**, **19(10)**: 461–469.

SHAFFER, N.; GRAU, G. E.; HEDBERG, K.; DAVACHI, F.; LYAMBA, B.; HIGHTOWER, A. W.; BREMAN, J. G.; PHUC, N. D. 1991. Tumor necrosis factor and severe malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, **163**: 96–101.

SHALMIEVL, G.; KRUGLIAK, M.; TURRI, F.; GINSBURG, H. 1996. Antimalarial drugs inhibit the phagocytosis of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **90 (5)**: 558-562.

SHAYE, O.A.; YADEGARI, M.; ABREU, M.T.; POORDAD, F.; SIMON, K.; MARTIN, P.; PAPADAKIS, K.A.; IPPOLITI, A.; VASILIAUSKAS, E.; TRAN, T.T. 2007. Hepatotoxicity of 6-mercaptopurine (6-MP) and azathioprine (AZA) in adult IBD patients. **American Journal of Gastroenterology**, **102(11)**: 2488–2494.

SHEAR, H.L.; NUSSENZWEIG, R.S.; BIANCO, C. 1979. Immune phagocytosis in murine malaria. **The Journal of experimental medicine**, **149(6)**:1288-1298.

SHERMAN, I.W. 1977. Amino acid metabolism and protein synthesis in malarial parasites. **WHO Bulletin**, **55(2-3)**:265–276.

SLATER, A.F. & CERAMI, A. 1992. Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. **Nature**, **355**:167–169.

SLATER, A.F.; SWIGGARD, W.J.; ORTON, B.R.; FLITTER, W.D.; GOLDBERG, D.E.; CERAMI, A.; HENDERSON, G.B. 1991. An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **88(2)**: 325-329.

STEURER, M.; PALL, G.; RICHARDS, S.; SCHWARZER, G.; BOHLIUS, J.; GREIL, R. 2006. Single-agent purine analogues for the treatment of chronic

lymphocytic leukaemia: a systematic review and metaanalysis. **Cancer Treatment Reviews**, **32**:377–389.

STEVENSON, M.M. & URBAN, B.C. 2006. Antigen presentation and dendritic cell biology in malaria. **Parasite Immunology**, **28(5)**: 5–14.

STEVENSON, M. M. & RILEY, E. M. 2004. Innate immunity to malaria. **Nature Reviews Immunology**, **4**:169-180.

SULLIVAN JR, D.J.; GLUZMAN, I.Y.; RUSSELL, D.G.; GOLDBERG, D.E.. 1996. On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **93(21)**: 11865–11870.

SULLIVAN, D. J. 2002. Theories on malarial pigment formation and quinoline action. **International Journal for Parasitology**, **32(13)**:1645–1653

TARGETT, G. A. T. 1992. Malaria: drug use and the immune response. **Parasitology**, **105**: S61-S70.

TEKWANI, B. L.; WALKER, L. A. 2006. 8-Aminoquinolines: future role as antiprotozoal drugs. **Current Opinion in Infectious Diseases** **19 (6)**:623–631.

TSUJI, M. & ZAVALA, F. 2003. T cells as mediators of protective immunity against liver stages of Plasmodium. **Trends in Parasitology**, **19(2)**:88–93.

VAROTTI, F. P.; BOTELHO, A. C. C.; ANDRADE, A. A.; DE PAULA, R. C.; FAGUNDES, E. M. S.; VALVERDE, A. ; MAYER, L. M. U.; MENDONÇA, J. S.; DE SOUZA, M. V. N.; BOECHAT, N.; KRETTLI, A. U. 2008. Synthesis, Antimalarial Activity, and Intracellular Targets of MEFAS, a New Hybrid Compound Derived from Mefloquine and Artesunate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **52(11)**: 3868-3874.

WALTHER, M.; WOODRUFF, J.; EDELE, F.; JEFFRIES, D.; TONGREN, J.E.; KING, E.; ANDREWS, L.; BEJON, P.; GILBERT, S.C.; DE SOUZA, J.B.; SINDEN, R.; HILL, A.V.; RILEY, E.M. 2006. Innate immune responses to human malaria: heterogeneous cytokine responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* correlate with parasitological and clinical outcomes. **Journal of Immunology**, **177(8)**: 5736–5745.

WATKINS, E.R. & MESHNICK, S.R. 2000. Drugs for Malaria. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, **11(3)**: 202-212.

WHITE, N.J. 1996. Treatment of malaria. **New England Journal of Medicine**, **335**: 801–806.

WHITE, N.J. 1998. Why is it that antimalarial drug treatments do not always work? **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, **92(4)**: 449–458.

WHITE, N. J.; NOSTEN, F.; LOOAREESUWAN, S.; WATKINS, W. M.; MARSH, K.; SNOW, R. W ; KOKWARO, G.; OUMA, J.; HIEN, T. T.; MOLYNEUX, M. E.; TAYLOR, T. E.; NEWBOLD, C. I.; RUEBUSH II, T. K.; DANIS, M.; GREENWOOD, B. M.; ANDERSON, R. M.; OLLIARO, P. 1999. Averting a malaria disaster. **The Lancet**, **353**: 1965-1967.

WHITE, N.J. 2008. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. **Clinical Infectious Diseases**, **46**: 172–173.

WHO (World Health Organization). 2005. Strategic Orientation Paper on prevention and control of Malaria.

WHO (World Health Organization). 2009. Malaria Fact Sheet, n° 94. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>).

WINSTANLEY, P. Modern chemotherapeutic options for malaria. 2001. **Lancet Infectious Disease, 1(4):** 242–50.

ZAZA, G.; YANG, W.; KAGER, L.; CHEOK, M.; DOWNING, J.; PUI, C. H. 2004. Acute lymphoblastic leukemia with TEL-AML 1 fusion has lower expression of genes involved in purine metabolism and lower de novo purine synthesis. **Blood, 104(5):**1435–1441.

9- ANEXOS

ANEXO A- Produtos diretos da dissertação

Synthesis and antimalarial activity of novel quinoline/thiopurine conjugates

SUMETIDO EM 16/06/10 para CHEMICAL BIOLOGY AND DRUG DESIGN

resposta recebida em 29/01/11; reenviado com correções em 04/03/11 para a mesma revista

Nicolli Bellotti de Souza^a, Rafael Carvalhaes^b, Arturene M.L.Carmo^b, Márcio José Martins Alves^c, Elaine S. Coimbra^a, Sônia M. N. Cupolilo^d, Clarice Abramo^a, Adilson David Da Silva^{b*}.

^a*Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, I.C.B., Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-900, Brasil.*

^b*Departamento de Química, I.C.E., Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-900, Brasil;*

^c*Departamento de Saúde Coletiva, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-900, Brasil.*

^d*Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-900, Brasil.*

* Corresponding author Dr. Adilson David da Silva, DQ, ICE, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG 36036-900, Brasil

Tel: +55 32 32293310; fax: + 55 32 32293314; E-mail: david.silva@ufjf.edu.br

Abstract

In this paper we describe the preparation, characterization and antimalarial activity of three quinoline/thiopurine conjugates. The compounds were tested *in vivo* in a murine model using chloroquine as a reference compound. The values of inhibition of parasite multiplication relative to chloroquine were determined and the compound **1** at 5 mg/Kg was considered statistically identical to chloroquine at the same dosage. The compounds were not cytotoxic over the concentrations of X-Y mg/mL as determined by the XXX method. Possible mechanisms of action are discussed. In light of these data, the title compounds may serve as prototypes for the development of novel antimalarial agents.

Keywords: Antimalarial activity; *Plasmodium berghei*; quinoline; purine

4-Aminoquinoline Analogues and its Platinum (II) Complexes as Antimalarial Agents

ACEITO em 01/03/11 em “Biomedicine & Pharmacotherapy”

Nicolli Bellotti de Souza², Arturene M. L. Carmo¹, Marcela S. Toledo¹, Davi C. La Gatta¹, Raphaela V. T. de Oliveira¹, Luana C. P. Oliveira¹, Márcio José Martins Alves³, Ana Paula Soares Fontes¹, Elaine Soares Coimbra², Adilson David Da Silva^{1*}, Clarice Abramo²

¹*Departamento de Química, I.C.E., Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-900, Brasil;*

²*Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, I.C.B., Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-900, Brasil;*

³*Departamento de Saúde Coletiva, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-900, Brasil.*

* Corresponding author Dr. Adilson David da Silva, DQ, ICE, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG 36036-900, Brasil

Tel: +55 32 32293310; fax: + 55 32 32293314; E-mail: david.silva@ufjf.edu.br

Abstract

The high incidence of malaria and drug-resistant strains of *Plasmodium* have turned this disease into a problem of major health importance. One of the aims to control it is the search for new antimalarial agents, such as quinoline derivatives. They compose a broad group of antimalarial agents, which are largely employed, and inhibit the formation of β -haematin (malaria pigment), which is lethal to the parasite. More specifically, 4-aminoquinoline derivatives represent potential sources of antimalarials, as the example of chloroquine, the most used antimalarial worldwide. In order to assess antimalarial activity, twelve 4-aminoquinoline derived drugs were obtained and some of these derivatives were complexed with platinum (II). These compounds were tested *in vivo* in a murine model and revealed remarkable inhibition of parasite multiplication values, whose majority ranged from 50 to 80%. In addition they were not cytotoxic. Thus, they may be object of further research for new antimalarial agents.

Keywords: Malaria; Antimalarial activity; *Plasmodium berghei*; Quinoline; platinum (II) complexes

ANEXO B- Produtos indiretos da dissertação



Available online at
 ScienceDirect
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
 EM|consulte
 www.em-consulte.com



Original article

Thiopurine derivatives containing triazole and steroid: Synthesis, antimalarial and antileishmanial activities

Roberta C.N.R. Corrales^a, Nicolli B. de Souza^b, Liliane S. Pinheiro^b, Clarice Abramo^b, Elaine S. Coimbra^b, Adilson David Da Silva^{a,*}

^a Departamento de Química, ICE, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-900, Brazil

^b Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 June 2010

Accepted 12 October 2010

Keywords:

6-thiopurine

1,2,3-triazole

Click chemistry

Antimalarial and antileishmanial activities

Plasmodium

Leishmania

ABSTRACT

A series of novel 6-thiopurine derivatives containing 1,2,3-triazole were synthesized and their *in vivo* antimalarial activity and *in vitro* antileishmanial activity were examined. The compounds **10**, **11**, **12** and **14** presented higher values of inhibition of parasite multiplication than chloroquine. For antileishmanial activity, the compound **14** showed activity against the three species of *Leishmania* tested. None of compounds showed cytotoxicity against mammalian cells.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Antimalarial Activity of an *N*-Alkyl Diamine

Nicolli B. de Souza^a, Carlos A. M. Rezende^b, Marcela S. Toledo^a, Davi C. Lagatta^a,
Raphaela V. T. de Oliveira^a, Cristiane F. da Costa^b, Adilson D. da Silva^b, Márcio J. M. Alves^c,
Sônia M. N. Cupolilo^d, Mauro V. de Almeida^b and Clarice Abramo^{*,a}

^a*Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Martelos, 36036-900 Juiz de Fora, MG, Brazil*

^b*Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Martelos, 36036-900 Juiz de Fora, MG, Brazil*

^c*Departamento de Saúde Coletiva, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Martelos, 36036-900 Juiz de Fora, MG, Brazil*

^d*Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Martelos, 36036-900 Juiz de Fora, MG, Brazil*

Received September 10, 2010; Revised January 28, 2011; Accepted February 09, 2011

Abstract: We report in this work the antimalarial activity of *N*-dodecyl-ethylenediamine (NDEDA). This compound was tested *in vivo* in a *Plasmodium berghei* murine model using the 4-day suppressive test in two separate experiments and displayed a very good inhibition of parasite multiplication.

Keywords: Antimalarial activity, Diamines, Malaria, Murine model, *Plasmodium berghei*, Polyamines.