

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
Pós-Graduação em Ciências Biológicas

José Márcio Fernandes da Silva

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMALÁRICA DE COMPOSTOS
SINTÉTICOS DERIVADOS DE QUINOLINA EM CULTURA DE
PLASMODIUM FALCIPARUM.**

Juiz de Fora
2013

JOSÉ MÁRCIO FERNANDES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMALÁRICA DE COMPOSTOS
SINTÉTICOS DERIVADOS DE QUINOLINA EM CULTURA DE
PLASMODIUM FALCIPARUM.**

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Biológicas na área de
Imunologia e DIP.

Orientadora: Profa. Dra. Kézia Katiani Gorza Scopel – UFJF
Co-orientador: Prof. Dr. Fernando de Pilla Varotti – UFSJ

Juiz de Fora
2013

José Márcio Fernandes da Silva

**Avaliação da Ação Antimalárica de Compostos Sintéticos derivados de
Quinolina em cultura de *Plasmodium falciparum*.**

Dissertação de Mestrado Apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Biológicas na área de
Imunologia e DIP.

Aprovada em 09 de maio de 2013.

Banca Examinadora

Prof^a. Dra. Kézia Katiani Gorza Scopel (Orientadora)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dra. Clarice Abramo
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Bruno Antônio Marinho Sanchez
Universidade Federal do Mato Grosso

DEDICATÓRIA

Às duas mulheres muito especiais para mim, Minha Esposa Grazielle e Minha Querida Mãe Rosária.

AGRADECIMENTOS

De maneira especial, agradeço ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia e DIP/Genética e Biotecnologia, bem como a Universidade Federal de Juiz de Fora pela oportunidade de realização desse trabalho.

Devo agradecer, principalmente a Deus, pois sem a Sua ajuda jamais conseguiria chegar até aqui.

“Seja bendito o nome de Deus de eternidade a eternidade, porque dele são a sabedoria e o poder;

É Ele quem muda os tempos e as estações; ele remove os reis e estabelece os reis; ele dá sabedoria aos sábios e conhecimento aos entendidos” (Daniel 2:20-21).

Tudo o que foi feito foi por meio Dele, sem Deus nada teria sido feito.

Agradeço aos meus Pais pela dedicação e sacrifício, que fizeram a vida toda para que eu conseguisse alcançar meus objetivos.

Agradeço a minha amada esposa Grazielle pela paciência e por ser meio ombro amigo nos momentos de dificuldade.

A minha Irmã Cida que sempre me incentivou e pela amizade que me tem ofertado durante todos estes anos.

Agradeço a Profa. Kézia Scopel pela oportunidade, por ter acreditado em mim no início mesmo sem me conhecer e também pela paciência quando as coisas ficaram difíceis e começaram a dar errado. Agradeço também pela orientação, direção e por ter provido meios para a realização deste projeto.

Ao Prof. Dr Marcelo Urbano Ferreira e a Maria José Menezes da Universidade de São Paulo, pelo treinamento em cultivo de *P. falciparum*, bem como por terem permitido a utilização do laboratório para realização de todos os experimentos em cultivo de *P. falciparum* que fazem parte dessa dissertação;

Ao Prof. Dr. Fernando de Pilla Varotti, e a seus alunos de iniciação científica, Ana e a Sarah, que de igual modo, me forneceram treinamento e auxílio nos testes das citotoxicidade em HeLa. Agradeço ainda ao Dr. Fernando pela ajuda incondicional durante as análises dos dados e pelas críticas durante a escrita desse trabalho;

Ao Prof. Dr. Adilson David da Silva pelas moléculas avaliadas neste estudo; sem elas essa dissertação não teria sido possível.

Aos alunos de iniciação científica, Valdenir, Eliza, Ariana e Juliana, pela amizade, companheirismo e pela ajuda na realização do projeto.

À Cristina e Ivone, também pela paciência e ajuda durante a realização das atividades no laboratório.

Aos meus companheiros de Mestrado pela amizade, pela troca de conhecimento, em especial a Roberta pela ajuda na dissertação.

Aos queridos professores do mestrado que nos transmitiram seus conhecimentos, contribuindo para nossa formação intelectual, o nosso mais sincero obrigado.

Ao Hemocentro de Juiz de Fora, por nos ter fornecido o plasma utilizado no cultivo dos parasitos;

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACT	Terapia Combinada com derivados de Artemisinina (Artemisinin Combination Therapies)
ARG	Arginina
ASN	Asparagina
CI	Concentração Inibitória
CIS	Cisteína
CC	Concentração Citotóxica
CQ	Cloroquina
CQR	Resistência a Cloroquina (Chloroquine Resistance)
CQS	Sensível a Cloroquina (Chloroquine Sensitive)
DHF	Dihidrofolato
DHFR	Dihidrofolato redutase
DHPS	Dihidropteroato sintase
DNA	Ácido Desoxiribonucleico (Desoxiribonucleic Acid)
dTMP:	deoxitimidilato monofosfato
Fe	Ferro
GSH	Glutathione
HCl	Ácido Clorídrico
HeLa	Adenocarcinoma de Cérvix
ILE	Interleucina
IPA	Índice Parasitário Anual
IS	Índice de Seletividade
KDa	Kilodalton (unidade de massa atômica)
µg	Micrograma
mg	Miligrama
µL	Microlitro
mL	Mililitro
MS	Ministério da Saúde
MTT	Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazol
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido hidreto
ND	Não Determinado

OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
PABA:	ácido <i>para</i> - amino benzoico
PAHO	PAHO: Organização PanAmericana de Saúde (Pan American Health Organization)
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico (Peripheral Blood Mononuclear Cell)
PBS	Tampão Salino Fosfatado (Phosphate Buffered Saline)
PfATPase6	<i>Plasmodium falciparum</i> Adenosina Trifosfatase 6
PfCRT	<i>Plasmodium falciparum</i> Chloroquine Resistance Transporter (PfCRT)
pfcr1	gene que codifica a PfCRT
PfMDR1	<i>Plasmodium falciparum</i> Multi Drug Resistant 1, <i>Plasmodium falciparum</i> multidroga resistente
pfmdr1	gene que codifica PfMDR1
PfUB1	<i>P. falciparum</i> subtilisine-like protease 1
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIACM	Plano de Intensificação das Ações de Controle de Malária
pvcr1	<i>Plasmodium vivax</i> Chloroquine Resistance Transporter
pvmdr1:	<i>Plasmodium vivax</i> Multi Drug Resistant 1
RAVREDA:	Rede Amazônica de Vigilância da Resistência aos Antimaláricos
RBM	Plano de Controle da Malária (Roll Back Malaria)
RMP	Código da Droga Testada
RNA	Ribonucleic Acid, Ácido Ribonucleico
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
SER	Serina
SERCA	Ca ²⁺ ATPases do Retículo Sarcoplasmático e Endoplasmático
THF	Tetrahydrofolato
TS	Timidilato sintase
USAID	Agência Americana para o Desenvolvimento Internacional
VD	Vacúolo Digestivo
WHO	Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)

Lista de Figuras

Figuras

Figura 1	Mapa de Risco da Malária no Mundo (WHO, 2010).....	17
Figura 2	Mapa de risco de infecção de malária na Amazônia Brasileira. (IPA: número de casos/1000 habitantes) (WHO, 2012).....	18
Figura 3	Formas evolutivas de <i>P. falciparum</i> (cepa 3D7) observadas em cultura antes e após sincronização.....	43
Figura 4	Frequência de células HeLa viáveis após exposição a diferentes concentrações dos compostos avaliados.....	45
Figura 5	Curvas dose-resposta dos compostos contra <i>P. falciparum</i> (cepa 3D7).....	49

Lista de Quadros

Quadro 1	Compostos derivados de quinolinas.....	37
----------	--	-----------

Lista de Tabelas

Tabela 1	Fatores que influenciam na resistência aos Antimaláricos	24
Tabela 2	Concentração Citotóxica 50(CC ₅₀) obtida para as moléculas derivadas de quinolinas em células HeLa.....	46
Tabela 3	Inibição do crescimento <i>in vitro</i> de <i>P. falciparum</i> (%) por drogas derivadas de quinolinas.....	47
Tabela 4	Concentração Inibitória 50 (CI ₅₀) das drogas derivadas de quinolinas em cultura de <i>P. falciparum</i> (cepa 3D7).....	48
Tabela 5	Índice de Seletividade (IS) das drogas derivadas de quinolinas.....	50
Tabela 6	Concentração Inibitória 50 (CI ₅₀) das drogas derivadas de quinolinas em cultura de <i>P. falciparum</i> (cepa W2).....	51

RESUMO

As dificuldades de adequação, aplicação e manutenção das estratégias de controle nos locais onde a malária é endêmica contribuem, em grande parte, para que a doença seja considerada o maior flagelo da humanidade. Neste contexto, destaca-se o amplo desenvolvimento de resistência dos plasmódios aos mais variados compostos que foram ou que ainda são utilizados na terapêutica antimalárica, o que faz do tratamento efetivo dos casos um grande desafio a cada ano. Diante disso, torna-se inquestionável a necessidade da descoberta de novas moléculas que possam, no futuro próximo, estar disponíveis para inclusão em medicamentos destinados à cura efetiva da infecção. Este estudo investigou a atividade antiplasmodial de 10 moléculas sintéticas derivadas de quinolinas em cultura de *P. falciparum*, bem como sua atividade citotóxica em células HeLa e mononucleares do sangue periférico. Das 10 moléculas, 5 estão conjugadas a sulfonamidas enquanto as demais possuem em sua estrutura um grupo hidrazina. Independentemente do grupamento farmacofórico integrado ao anel quinolínico, nenhuma molécula foi citotóxica para células HeLa ou linfócito humano em baixas concentrações. No que se refere a atividade antimalárica, 60% das moléculas foram altamente ativas contra *P. falciparum* (CI_{50} variando de $<0,195\mu\text{g/mL}$ a $3,12\mu\text{g/mL}$) e 10% totalmente inativas ($CI_{50}>50\mu\text{g/mL}$). Ao analisarmos o índice de seletividade das moléculas, somente dois compostos não foram seletivos para o parasito (RMP103 e RMP107). Dentre as moléculas mais seletivas destacaram-se aquelas conjugadas ao grupo hidrazina, sobretudo RMP105 que foi >1800 vezes mais seletiva para plasmódio quando comparada a droga de referência. Portanto, por apresentarem alta atividade antimalárica e baixa toxicidade em células humanas, com elevado índice de seletividade para os plasmódios, as moléculas testadas nesse estudo podem ser consideradas boas alternativas para se tornarem medicamentos antimaláricos e auxiliarem de maneira eficaz no combate a doença.

PALAVRAS CHAVE: Malária, *Plasmodium falciparum*, resistência, antimaláricos, citotoxicidade.

ABSTRACT

The difficulties found in adapting, implementing and maintaining control strategies in malaria endemic regions are largely responsible for the spread of this disease, which is considered one of the greatest scourges of mankind. In this context, there is a widespread development of plasmodia resistance to various compounds that have been or are still used in antimalarial therapy, making effective treatment of the cases a constant challenge. Therefore, there is an unquestionable need for discovery of new molecules that may, in the near future, be available for inclusion in effective medicines for the cure of the infection. This study investigated the antiplasmodial activity of 10 synthetic molecules (derived from quinoline) in cultured *P. falciparum*, and their cytotoxic activity against HeLa cells and peripheral blood mononuclear cells. Of the 10 molecules tested, 5 are combined to sulfonamides, while the others have in their structure a hydrazine group. Regardless of the grouping pharmacophore integrated into the quinoline ring, all the molecules tested were not cytotoxic to HeLa cells or human lymphocytes, at low concentrations. Concerning the antimalarial activity, 60% of the molecules were highly active against *P. falciparum* (CI_{50} ranging from $<0.195 \mu\text{g} / \text{ml}$ to $3.12 \mu\text{g} / \text{mL}$) and 10% totally inactive ($CI_{50} > 50\mu\text{g}/\text{mL}$). By analyzing the selectivity index of molecules, only two compounds were not selective for the parasite (RMP103 and RMP107). Among the more selective molecules, the highlights were those linked to the hydrazine group, especially RMP105 which was >1800 times more selective for plasmodium compared to the reference drug. Therefore, due to their high antimalarial activity and low toxicity in human cells, with a high selectivity for *Plasmodium*, the molecules tested in these studies can be considered good alternatives to become antimalarial drugs and assist effectively in combating the disease.

KEY WORDS: Malaria, *Plasmodium falciparum*, resistance, antimalarial, cytotoxicity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 A malária como problema de saúde pública no Mundo.....	16
1.2 A malária no Brasil.....	17
1.3 Os parasitos e o seu ciclo biológico.....	20
1.4 Tratamento da malária	21
1.5 Fatores que Influenciam na Resistência aos antimaláricos	22
1.6 Mecanismo de Ação dos antimaláricos	24
1.6.1. Aminoquinolinas.....	24
1.6.2 Antifolatos.....	26
1.6.3 Endoperóxidos.....	27
1.7 Resistência aos antimaláricos	29
1.7.1 Resistência aos quinolínicos.....	29
1.7.2 Resistência aos antifolatos.....	31
1.7.3 Resistência aos endoperóxidos.....	32
1.8 Compostos híbridos.....	32
2 JUSTIFICATIVA	35
3 OBJETIVOS	36
3.1 Específicos	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Compostos testados.....	37
4.2 Solubilização dos compostos para testes de atividade biológica	39
4.3 Ensaio Biológicos.....	39
4.3.1 Cultivo de células HeLa.....	39
4.3.2 Obtenção de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC).....	40
4.3.3 Citotoxicidade.....	40
4.3.4 Cultura de <i>P. falciparum</i>	41

4.3.4.1 Teste de Viabilidade da Cultura.....	43
4.3.4.2 Sincronização dos parasitos.....	43
4.3.4.3 Testes de Antimaláricos “ <i>in vitro</i> ”.....	44
4.4 Índice de Seletividade	44
4.5 Análise estatística.....	44
5 RESULTADOS	45
5.1 Atividade citotóxica das moléculas em células HeLA e PBMC.....	45
5.2 Atividade antimalárica das drogas avaliadas.....	46
6 DISCUSSÃO	52
6.1 Atividade antimalárica dos derivados de Quinolina sobre cultura de <i>P. falciparum</i> cepa 3D7	53
6.2 Atividade Citotóxica dos derivados quinolínicos sobre células HeLa e linfócitos humanos.	55
7 CONCLUSÕES	57
8 REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 A malária como problema de saúde pública no Mundo

As doenças parasitárias têm afetado grande parte da população mundial, sendo a causa de diversas mortes e um forte fator limitante da qualidade de vida e do desenvolvimento de muitos países (FRANÇA, et al., 2008).

Entre os parasitos, os protozoários são responsáveis por grande parte das infecções que acometem os seres humanos ocorrendo principalmente em regiões subdesenvolvidas do planeta, que apresentam baixos índices de escolaridade e de saneamento básico (WHO, 2010). Neste contexto destaca-se a malária, presente atualmente na maior parte das regiões tropicais e subtropicais do mundo (FRANÇA, et al., 2008; WHO, 2010) (Figura 1).

A malária, também conhecida como maleita, febre intermitente, paludismo, impaludismo, febre terçã ou febre quartã, é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por parasitos pertencentes ao gênero *Plasmodium*, sendo transmitida ao hospedeiro vertebrado por meio da picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* (HAY, et al., 2004, MORAIS, et al., 2012). Ocasionalmente, a transmissão pode ocorrer por transfusão sanguínea, por compartilhamento de agulhas e seringas infectadas ou por acidentes laboratoriais (HAY, et al., 2004).

Dentre as espécies de *Plasmodium* conhecidas, quatro comumente infectam o ser humano: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium malariae*. Atualmente, contudo, *Plasmodium knowlesi*, uma espécie de plasmódio de primatas, vem sendo associada a várias mortes no sudeste asiático (WHITE, 2008; COX-SINGH et al., 2008; ONG et al., 2009). De maneira geral, todas as espécies são responsáveis por provocar intensa debilidade física nos indivíduos parasitados, provocando perdas sociais e econômicas significativas para a sociedade (FRANÇA, et al., 2008).

Na década de 90, a malária apresentou um aumento significativo de casos clínicos. Isso ocorreu graças ao crescimento desordenado de alguns países que não dispunham de infraestrutura adequada para suportar seu processo de desenvolvimento. Por isso, em 1998 a Organização Mundial da Saúde (OMS), lançou um programa global de combate à malária, o “Roll Back Malaria” (RBM). Este projeto tinha por finalidade a redução da morbidade e a mortalidade causada pela malária em 50% até o ano 2010 (WHO, 2005). Suas ações basearam-se no

diagnóstico rápido e no tratamento dos indivíduos parasitados, além de estratégias para reduzir a transmissão da doença, pelo combate ao vetor, como o uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas residuais (WHO, 2010). Como resultado, muitos países conseguiram reduzir drasticamente o número de casos confirmados e mortes provocadas pela malária (WHO, 2011). Por exemplo, enquanto em 2006 ocorreram cerca de 2,5 milhões de mortes atribuídas a malária (FRANÇA, et al., 2008), 781 e 655 mil foram registradas em 2009 e 2010, respectivamente (WHO, 2010; WHO, 2011). A maioria dos óbitos ocorreu no continente africano (91%) entre crianças menores de 5 anos e mulheres grávidas; somente as crianças representaram 86% do total de óbitos (BAGAVAN, et al., 2010; WHO, 2011). De acordo com a OMS, graças ao RBM, 8 países (Bahamas, Egito, Geórgia, Iraque, Jamaica, Oman, Rússia e Síria) tiveram a interrupção da transmissão da doença confirmada em 2011 (WHO, 2011).

Atualmente, aproximadamente 3,6 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco para a malária sendo, portanto, fundamental que as estratégias de controle sejam adequadas à realidade das áreas de transmissão.

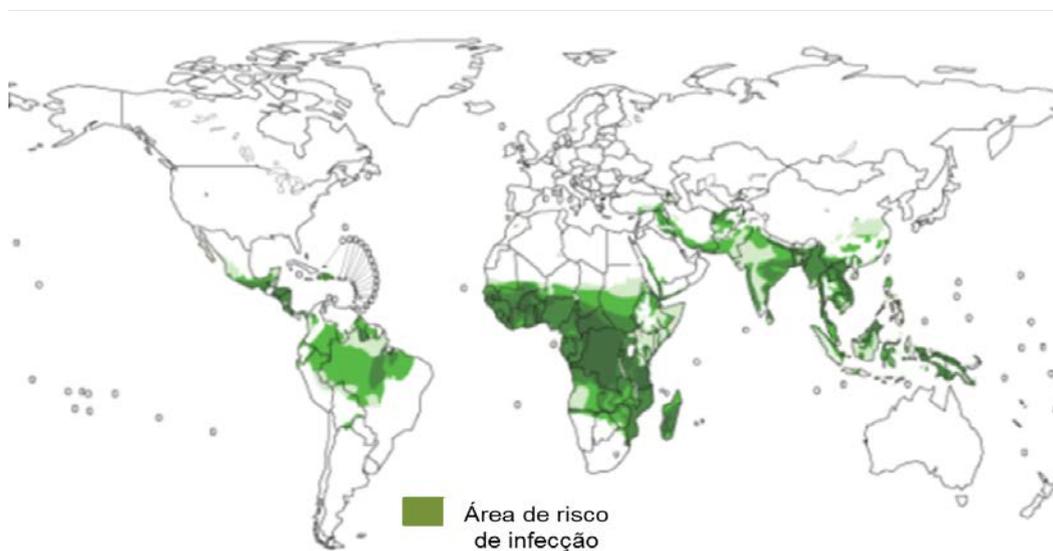


Figura 1: Mapa de Risco da Malária no Mundo (WHO, 2010)

1.2 A malária no Brasil

No Brasil, a maior incidência de transmissão da malária ocorre na região Amazônica (cerca de 95% dos casos) (Figura 2), onde as condições ambientais, como elevadas temperaturas e umidade, propiciam o desenvolvimento do inseto

vetor (FREITAS, et al., 2007; OLIVEIRA-FERREIRA, et al., 2010). No país, a doença é causada por três espécies de *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax* e, raramente, *P. malariae*. *P. vivax* é responsável pelo maior número de casos, cerca de 85% (FREITAS, et al., 2007).

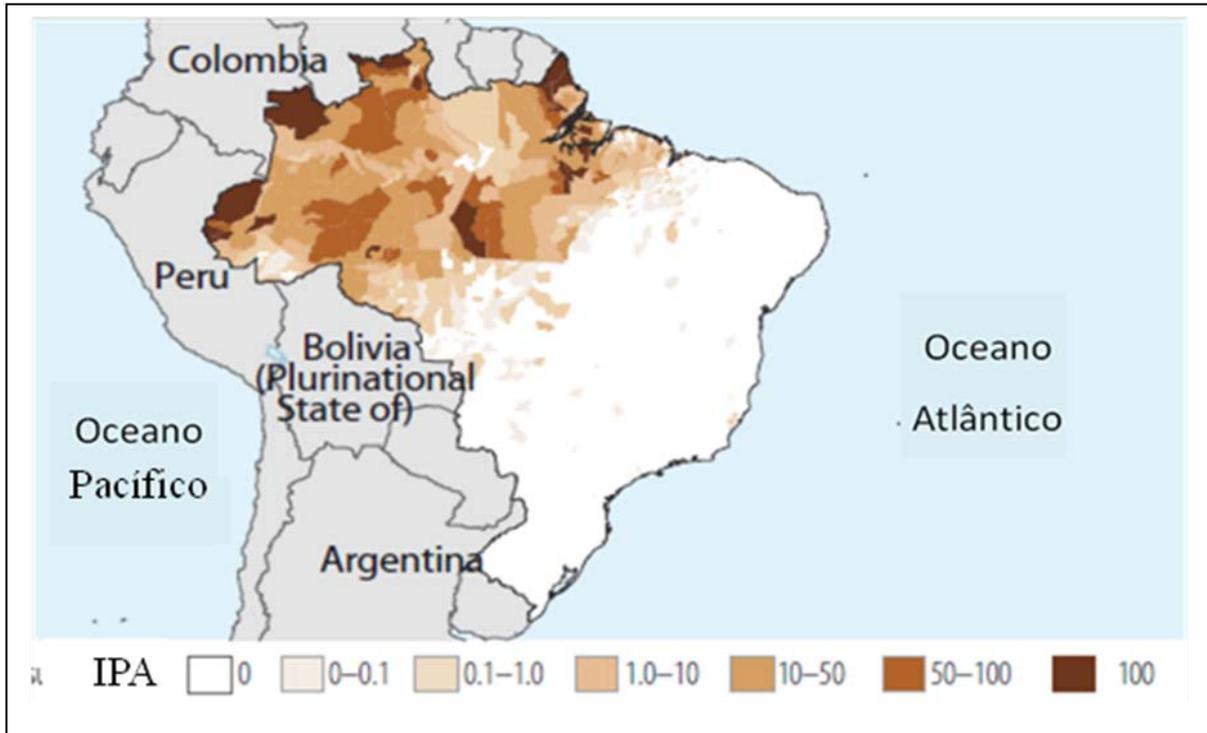


Figura 2: Mapa de risco de infecção de malária na Amazônia Brasileira. (IPA: número de casos/1000 habitantes) (WHO, 2012).

Historicamente a maior incidência da malária no Brasil ocorreu durante as décadas de 70 e 80 e esteve associada com a ocupação maciça e desordenada da região Amazônica (MARQUES, 1986 revisto por FERREIRA e SILVA-NUNES, 2010). Naquela época as precárias condições de saneamento e moradia, a carência médica e educacional e o alto desequilíbrio ecológico, expandiram os focos de malária então existentes, levando a doença a assumir proporções alarmantes no fim das décadas 80 e 90. Outro fator que contribuiu para a expansão da doença foi a resistência dos parasitos aos fármacos antimaláricos tradicionalmente usados na terapêutica (TALISUNA, et al., 2004; BAGAVAN, 2010). Como consequência da interação entre tais fatores, em 1999, cerca de 630 mil casos da doença foram registrados; 99,7% destes na Amazônia legal (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

O então, alarmante número de casos forçou o Ministério da Saúde (MS) a introduzir, no ano 2000, um importante plano de intensificação das ações de controle

de malária (PIACM) (LADISLAU, LEAL, TAUIL, 2006), tendo por objetivo reduzir a incidência da doença, impedir o surgimento de epidemias localizadas e diminuir a gravidade das infecções. As medidas preconizadas pelo PIACM priorizaram municípios com índice parasitário anual (IPA: número de indivíduos infectados por 1000 habitantes) maior que 49,9 (MS, 2003). As medidas adotadas se basearam principalmente no diagnóstico rápido e no tratamento imediato das infecções, utilizando-se principalmente a terapia baseada na combinação de fármacos. Em apenas 2 anos, tais ações foram responsáveis por uma redução de cerca de 39% no número de casos registrados em 2001 (393 mil). Estima-se, ainda, que pelo menos 1,5 milhão de casos da doença tenham sido evitados entre os anos de 2000 a 2002 (MS, 2003).

Apesar do número de notificações ter permanecido estável de 2000 até 2002, um aumento considerável voltou a ser percebido em 2004, com 459 mil casos. Embora isso reflita a fragilidade e as dificuldades de manutenção das estratégias preconizadas, observou-se uma considerável redução no número de municípios com alto e médio risco de infecção (MS, 2010) reafirmando a necessidade de uma readequação das estratégias de controle para melhor atender regiões com características ambientais e epidemiológicas distintas (revisto por FERREIRA e SILVA-NUNES, 2010).

Para desenvolver atividades de controle da doença, em seqüência ao PIACM, o governo brasileiro criou, em parceria com a sociedade organizada, o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM), com o objetivo de fornecer diretrizes aos governos: federal, estadual e municipal. Essa iniciativa melhorou tanto a estrutura das unidades de saúde quanto o controle dos riscos de transmissão da doença (ROCHA, et.al., 2006).

Para a maior efetividade das medidas de controle e para que se consiga alcançar êxito na erradicação da malária, faz-se necessária a utilização de dados científicos para nortear as políticas de saúde pública (FERREIRA e SILVA-NUNES, 2010). Com o objetivo de gerar dados científicos e promover a vigilância epidemiológica frente à crescente resistência aos fármacos antimaláricos foi criada no ano de 2001 a Rede Amazônica de Vigilância da Resistência aos Antimaláricos (RAVREDA) (MONTROYA, 2008; PAHO, 2009). Esta rede é financiada pela Agência Americana para o Desenvolvimento Internacional (USAID) e pela Organização Pan-Americana de Saúde (PAHO), sendo constituída por centros sentinelas regionais,

que monitoram em tempo real os episódios de resistência aos antimaláricos (FERREIRA e SILVA-NUNES, 2010).

Para implantação dos centros de vigilância foram considerados fatores tais como incidência da malária, infraestrutura de saúde e logística da região (MACHADO, et. al., 2004). Ao longo dos anos, a RAVREDA, tem monitorado a eficácia dos regimes terapêuticos adotados na América Latina e assim, vem norteando a adoção e adequação de medidas que visam reduzir a incidência dos casos de resistência (FERREIRA e SILVA-NUNES, 2010).

1.3 Os parasitos e o seu ciclo biológico

O ciclo de vida natural de todas as espécies de *Plasmodium* é complexo envolvendo dois hospedeiros, vertebrado e invertebrado. A infecção nos humanos inicia-se com a picada do mosquito anofelino infectado, durante a qual são depositadas na pele, ou diretamente na corrente sanguínea, as formas infectantes do parasito; os esporozoítos. Quando depositados na pele os esporozoítos, permanecem nesse local por aproximadamente 1 a 3 horas até alcançarem os vasos sanguíneos (AMINO et al., 2006; YAMAUCHI et al., 2007). Uma vez no sistema circulatório, os mesmos rapidamente atingem o fígado.

Os parasitos, que chegam ao fígado, se diferenciam e se multiplicam por reprodução assexuada do tipo esquizogônica dando origem a dezenas de milhares de merozoítos que saem dos hepatócitos através de um processo de brotamento de vesículas, os merossomas, alcançando a corrente sanguínea (STURM et al., 2006). Esporozoítos de *P. vivax* e *P. ovale* ao atingirem o fígado podem permanecer latentes, sendo, portanto, chamados de hipnozoítos. Essas formas são responsáveis por constantes recaídas da doença, com variáveis períodos de incubação (revisito por FRANÇA, et al., 2008). Essa fase primária do ciclo é chamada exo-eritrocítica ou tecidual.

A segunda fase do ciclo é denominada eritrocítica, e se inicia quando os merozoítos teciduais, ao final do processo esquizogônico, invadem os eritrócitos. Dentro dessa célula, os parasitos multiplicam-se por reprodução esquizogônica, produzindo no final deste processo de 12 a 16 merozoítos por célula infectada. Com a maturação completa, os eritrócitos se rompem liberando os merozoítos na circulação sanguínea, que em seguida invadem novos eritrócitos reiniciando o ciclo sanguíneo. A duração de cada ciclo esquizogônico eritrocítico depende da espécie

do parasito, sendo de 48 h para *P. falciparum*, *P. vivax*, e *P. ovale*, de 72 h para *P. malariae* e de 24 h para *P. knowlesi* (COX-SINGH et al., 2008; FRANÇA, et al., 2008; WHITE, 2008).

A ruptura dos eritrócitos infectados está relacionada com as manifestações clínicas da malária, como febres e calafrios, sendo estas causadas pela liberação de um polímero de hematina, a hemozoína, também chamado de pigmento malárico, que é altamente alergênico. O pigmento malárico é formado durante o ciclo eritrocítico, quando o parasito internaliza e degrada a hemoglobina, no seu vacúolo digestivo, sendo esta sua principal fonte de aminoácidos (SULLIVAN, 2002; FRANÇA, et al., 2008).

Alguns merozoítos que invadem as hemácias, entretanto não sofrem esquizogonia, mas se diferenciam em formas sexuadas masculinas e femininas chamadas de microgametócitos e macrogametócitos, respectivamente, que ao serem ingeridos pelo vetor durante o repasto sanguíneo dão continuidade ao ciclo.

Cada forma evolutiva do parasito possui estruturas e vias metabólicas que as distinguem, sendo de suma importância o entendimento dessas particularidades para o combate a malária, podendo ser possíveis alvos para ação de novos fármacos.

1.4 Tratamento da malária

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) o tratamento antimalárico consiste na administração de fármacos com ação antiparasitária, na posologia adequada, com intuito de promover a cura dos indivíduos parasitados, e conseqüentemente a transmissão da infecção e o surgimento e difusão de resistência (WHO, 2010).

O tratamento rápido e correto é hoje um dos alicerces para o controle da doença e tem como objetivos principais assegurar a cura clínica rápida e duradoura (OLIVEIRA-FERREIRA, et al., 2010). Para tal, a OMS definiu os esquemas terapêuticos baseando-se no quadro clínico do paciente e espécie de parasito, sendo recomendada a administração dos fármacos em monoterapia ou terapia combinada. Esta última, envolvendo derivados de Artemisinina (ACT), é a mais recomendada como estratégia para evitar o desenvolvimento de resistência (WHO, 2010). A terapia combinada contribui para proteção de drogas que possuam uma ação possivelmente mais rápida, porém uma meia-vida mais curta como os

derivados de artemisinina. O sinergismo entre os fármacos torna o tratamento mais eficaz e seguro, por reduzir a formação de resistência e o surgimento de efeitos adversos (WALSH e BELL, 2009).

Desde 2006, diante da resistência apresentada por *P. falciparum* e *P. vivax*, o Brasil tem adotado um regime terapêutico baseado na combinação de artesunato-mefloquina ou arteméter-lumefantrina, durante três dias. No sexto dia é administrada primaquina com a finalidade de eliminar as formas sexuadas (FERREIRA e SILVA-NUNES, 2010; MS, 2010; OLIVEIRA-FERREIRA, et al., 2010).

Neste contexto da combinação de fármacos para o tratamento da malária tem se aumentado os estudos a respeito da síntese de moléculas híbridas, que apresentem em sua estrutura sítios ativos de diferentes fármacos antimaláricos ligados covalentemente e que possuam diferentes mecanismos de ação. Estes híbridos possuem, devido à ação conjunta das estruturas presentes em sua molécula, maior eficácia, menor incidência de efeitos adversos e com isso menor probabilidade de desenvolver resistência (WALSH e BELL, 2009).

Assim, o tratamento medicamentoso ideal é aquele que apresenta uma combinação de fármacos eficazes incluindo, pelo menos, esquizotocidas sangüíneos e gametocitocidas, e, para os casos de *P. vivax* e *P. ovale*, hipnozoitocidas (FREITAS, et al., 2007). Além disso, é preconizado o acompanhamento sistemático dos indivíduos tratados, para avaliar a efetividade do tratamento e impedir a recidiva da doença. Além disso, é importante monitorar o surgimento de episódios de resistência com o objetivo de impedir a disseminação da malária.

1.5 Fatores que Influenciam na Resistência aos antimaláricos

A resistência, de acordo com a OMS, trata-se da capacidade de sobrevivência do parasito na presença de drogas antimaláricas nas concentrações adequadas dentro do esquema terapêutico recomendado (WHO, 2010).

Há muito tem se relatado sobre a resistência de *P. falciparum* frente aos fármacos tradicionalmente empregados no tratamento da malária. Mas o que permanece obscuro é a forma como surgiu tal resistência. Acredita-se que o emprego de terapêutica inapropriada e o uso indiscriminado de antimaláricos podem ter contribuído para a alta incidência da malária e desenvolvimento de resistência (TALISUNA, et al., 2004; FREITAS, et al., 2007; BAGAVAN, 2010). Por muitos anos,

os antimaláricos, sobretudo a cloroquina, foram usados com o intuito de promover a ação profilática. Muitas vezes foram administrados em esquemas terapêuticos inadequados, que somados a não adesão ao tratamento por parte dos indivíduos parasitados, selecionaram parasitos resistentes (TALISUNA, et al. 2004; BAGAVAN, 2010; WHO, 2010). Além disso, outros eventos podem ter contribuído para o avanço da resistência aos antimaláricos, tais como, redução da concentração da droga, administração em dosagem incorreta, baixa qualidade do medicamento usado e também interações medicamentosas, que podem afetar a biodisposição e principalmente a bioequivalência da droga (RODRIGUES, et al., 2010; WHO, 2010)

O metabolismo do hospedeiro é também de suma importância para a efetividade de um fármaco, podendo provocar alterações na distribuição, ação e excreção da droga. Isto afeta sua disponibilidade e meia-vida, influenciando, desta forma, na concentração da droga a que o parasito será exposto, bem como o tempo de exposição (BARREIRO, SILVA e FRAGA, 1996).

O tempo de permanência e a concentração da droga na circulação podem contribuir para a redução da reincidência do quadro malarígeno, além de criar um efeito protetor impedindo a reinfeção dentro de um período pós-tratamento, no qual a concentração sérica da droga está dentro da sua faixa terapêutica (WATKINS e MOSOBO, 1993; TALISUNA, et al. 2004). Portanto a concentração da droga a que o parasito está exposto influencia diretamente na efetividade do tratamento. Além destes, outros fatores como a intensidade de transmissão e a carga parasitária são importantes para o desenvolvimento de resistência (TALISUNA, et. al., 2004; WHO, 2010). Somados, esses fatores podem reduzir a atividade do fármaco, quando o parasito estiver exposto a concentrações da droga inferiores ao seu índice terapêutico, gerando uma pressão seletiva sobre o parasito (WATKINS e MOSOBO, 1993; TALISUNA, et al, 2004; BAGAVAN, 2010). A pressão exercida pela droga em subdosagem ou, em menor escala, pela influência do sistema imunológico do hospedeiro, leva o parasito a se diferenciar em suas formas sexuadas, os gametócitos, infectantes para o mosquito (FRANÇA, et al. 2008). No inseto ocorrerá a fecundação dos gametas, que pode ser monoclonal, quando são gametas de uma mesma cepa ou linhagem, ou multiclonal, cepas ou linhagens diferentes, havendo a possibilidade de recombinação gênica, produzindo multiplicidade de clones possivelmente mais resistentes (ARNOT, 1998; BABIKER E WALLIKER, 1997; TALISUNA, et al, 2004).

A velocidade, a abrangência e a intensidade da resistência dependem diretamente do número de mutações ocorridas, da frequência que ocorrem, bem como do tipo de alteração que proporcionam no sítio alvo da droga (WHO, 2010).

Em suma os principais fatores envolvidos na resistência aos antimaláricos são descritos abaixo.

Tabela 1: Fatores que influenciam na resistência aos Antimaláricos

Frequência com que ocorrem mudanças genéticas
Grau de resistência conferido pela mudança genética
Mecanismo de resistência
A proporção de agentes infecciosos transmissíveis expostos a droga (pressão seletiva)
Número de parasitos expostos a droga
A concentração da droga a que o parasito foi exposto
A farmacocinética e farmacodinâmica das drogas antimaláricas
Fatores individuais (dosagem, duração e aderência) e comunitários (qualidade, disponibilidade e distribuição) relacionados ao uso da droga
Perfil imunológico da comunidade e do indivíduo
Presença simultânea no sangue de drogas antimaláricas e outras substâncias que entram em contato com o parasito
Intensidade de transmissão da doença

Fonte: (WHO, 2010)

1.6 Mecanismo de Ação dos antimaláricos

Atualmente encontram-se disponíveis no mercado diversos tipos de drogas, dispostas em classes farmacológicas distintas, com diferentes mecanismos de ação (FREITAS et al., 1997). As principais classes englobam as aminoquinolinas, aril-aminoálcoois, antifolatos e derivados de artemisinina.

1.6.1. Aminoquinolinas

Em 1820, dois químicos franceses Pierre Joseph Pelletier e Jean Bienaime Caventou anunciaram o isolamento de um alcalóide de estrutura complexa, que deram o nome de quinina, a substância da casca de uma erva Peruana, a *Cinchona sp.* A utilização desses alcalóides no tratamento da malária se tornou comum,

utilizava-se o pó da casca, pois era mais confiável e mais agradável (KHAN et al., 2010). Os quinolínicos são compostos heterocíclicos os quais possuem como principal característica um anel benzênico fundido a um anel piridínico - anel quinolínico.

A cloroquina, derivado da quinina, era durante a segunda guerra mundial altamente eficaz contra as formas sanguíneas do parasito. Seu mecanismo de ação está relacionado com o impedimento da polimerização do grupo heme pelo plasmódio (FITCH, 2004). Durante o ciclo intraeritrocitário o parasito internaliza e degrada a hemoglobina do eritrócito como fonte de aminoácidos (GOODYER et al., 1997; SULLIVAN, 2002). O processo digestivo da hemoglobina ocorre dentro do vacúolo digestivo onde sofre ação de enzimas proteolíticas tais como as plasmepsinas e falcipainas. Nesse processo, a parte central da hemoglobina contendo ferro, a protoporfirina IX é liberada e por ser extremamente reativa, possibilita a ligação do Fe^{2+} com o oxigênio. Esse grupo denominado heme é tóxico e capaz de alterar a permeabilidade da membrana, que por sua vez gera lise e consequente morte do parasito (SULLIVAN, 2002).

Na tentativa de escapar da morte, o parasito desenvolveu uma estratégia que consiste em promover a polimerização da hematina formando um cristal conhecido como hemozoína (GINSBURG, 1999). Assim, a hemozoína, também conhecida como “pigmento malárico” deixa de ser tóxica para o plasmódio e é liberada na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, sendo altamente alergênico e potenciando os acessos febris característicos dessa doença (SCHUMANN, 2007). A hematina não polimerizada alcança o citoplasma através da passagem pela membrana do VD e é degradada pela glutatona redutase, a qual constitui uma importante proteína antioxidante para o parasito (ATAMNA e GINSBURG, 1995).

A cloroquina é uma base diprótica fraca e em pH fisiológico (7,4) pode ser encontrada nas formas não-protonada (CQ), mono-protonada (CQ+) e di-protonada (CQ++). A forma permeável às membranas é a forma não protonada, com isso a cloroquina atravessa a membrana do eritrócito e a do parasito chegando ao vacúolo digestivo (HOMEWOOD et al., 1972). Nesse compartimento ela é protonada, e uma vez que as formas protonadas não são permeáveis, a cloroquina permanece no VD, onde se acredita ligar a hematina impedindo a formação da hemozoína, que é tóxica ao parasito (SUGIOKA et al., 1987; BRAY et al., 1999).

Recentemente, um estudo feito por Biagini et al. (2012) demonstrou que uma geração única de quinolinas exibiu potente atividade contra cepas de *P. falciparum* resistentes através de uma rápida e seletiva despolarização do potencial de membrana mitocondrial do parasito. Isso influenciou o metabolismo de pirimidina com consequente morte do parasito. Essas quinolinas parecem efetuar duplo mecanismo de ação inibindo duas enzimas respiratórias: NADH-ubiquinona oxirredutase (*Plasmodium falciparum* NDH2) e citocromo bc1 (BIAGINI et al., 2012).

A cloroquina ainda é a substância de primeira escolha para o tratamento em alguns países, principalmente para tratar infecções por *P. vivax* em áreas nas quais essa droga ainda é eficaz (WHO, 2010). No entanto, em menos de 15 anos após a introdução da cloroquina como monoterapia, houve relato de cepas *P. falciparum* cloroquina-resistentes de origem Colombiana (MOORE e LANIER, 1961). Com isso, a busca por novos antimaláricos se intensificou e novas substâncias foram sintetizadas, como por exemplo, a amodiaquina (WHO, 2010).

A primaquina e a tafenoquina são 8-aminoquinolinas que possuem atividade significativa contra as formas latentes no fígado, os hipnozoítos, que são responsáveis pelas recaídas das infecções por *P. vivax* e *P. ovale*. A primaquina também é uma droga gametocítica, porém não tem efeito sobre as formas sanguíneas do plasmódio (WHO, 2010; WELLS et al., 2010). A tafenoquina é um análogo promissor da primaquina, pois além de atuar sobre os hipnozoítos apresenta administração posológica mais conveniente (KITCHENER et al., 2007).

1.6.2 Antifolatos

No final dos anos 60, com o crescente espalhamento de cepas *P. falciparum* cloroquina-resistentes, a sulfadoxina foi combinada com a pirimetamina e comercializada pela Roche com o nome de Fansidar® e se tornou amplamente utilizada no tratamento da malária. Essas duas substâncias atuam seletivamente sobre enzimas envolvidas no ciclo dos folatos, essencial para processos bioquímicos vitais do parasito como síntese de aminoácidos, proteínas e DNA. A ação antimalárica dos antifolatos está relacionada com a inibição das enzimas diidrofolato redutase (DHFR) e dihidropteroato sintase (DHPS).

A função da enzima DHFR é catalisar a redução do diidrofolato (DHF) para tetraidrofolato (THF), o precursor do deoxitimidilato (dTMP) que por sua vez é uma

coenzima necessária para a biossíntese de aminoácidos e nucleotídeos. Portanto, a inibição da DHFR ou DHPS diminui os níveis de dTMP, interrompendo o processo de síntese de DNA (OLLIARO e YUTHAVONG, 1999).

A pirimetamina é um inibidor competitivo da diidrofolato redutase enquanto que as sulfonamidas e sulfonas agem como inibidores competitivos da diidropteroato sintase. Combinações de inibidores de DHFR e DHPS atuam sinergicamente e o sucesso da pirimetamina-sulfadoxina depende desta sinergia (SIBLEY et al., 2001).

1.6.3 Endoperóxidos

Com a crescente resistência à cloroquina e ao fansidar na década de 80, uma erva frequentemente mencionada na medicina chinesa, a *Artemisia annua*, utilizada para tratar acessos febris, foi descoberta como um importante antimalárico.

A Artemisinina, um derivado da *Artemisia annua*, foi inicialmente desenvolvida em 1972 pelos chineses durante a guerra do Vietnã. Em 1974, ensaios clínicos em grande escala foram lançados, demonstrando que a artemisinina possuía uma rápida ação, baixa toxicidade e era altamente eficaz contra *P. falciparum* cloroquina-resistente (BUTLER et al., 2010). Do mesmo modo que a quinina serviu de base para a síntese de derivados, da artemisinina surgiram os seguintes derivados: diidroartemisinina, arteéter, arteméter e artesunato.

Esses compostos são excelentes antimaláricos, pois são eficazes em ambos os estágios sexuado e assexuado de *P. falciparum* (WHITE, 2008b). Eles têm a capacidade de eliminar os parasitos, diminuem rapidamente as manifestações clínicas e reduzem a transmissão de gametócitos. No entanto, possuem meia-vida curta, o que permite alguns parasitos escaparem de sua ação. Assim é necessário combiná-los com outras drogas antimaláricas que possuem meia-vida mais longa (WHITE, 1999; SOWUNMI et al., 2006).

Por ser de origem natural, o processo de produção da artemisinina torna-se caro, pois é necessário extraí-la e modificá-la quimicamente e conseqüentemente inviabiliza a introdução da terapia combinada em países pobres.

A artemisinina e seus derivados são lactonas sesquiterpênicas e o mecanismo de ação dessas substâncias ainda é controverso (ECKSTEIN-LUDWIG

et al., 2003). Um núcleo 1,2,4-trioxano incorporado a uma ponte endoperóxido é essencial para a atividade desses compostos (MESHNICK, 2002). Várias são as hipóteses propostas para explicar seus mecanismos de ação, incluindo a alquilação do grupo heme por radicais livres, a interferência com a proteína PfATPase6 bem como o dano nas funções mitocondriais (LI e ZHOU, 2010). Historicamente, a primeira teoria sobre o efeito antimaláricos dos endoperóxidos é que eles reagem com o ferro do grupo heme e possibilita a formação de radicais livres, que por sua vez são prejudiciais ao *Plasmodium* (HONG et al., 1994; WU et al., 1996).

Outra sugestão descrita da ação da Artemisinina e seus derivados é através da inibição sobre a PfATPase6, uma bomba de cálcio ortóloga a Ca^{2+} ATPase expressa na membrana do retículo endoplasmático em mamíferos (SERCA). Com essa inibição, as vias de sinalização do parasito se comprometeriam, pois os níveis de cálcio citoplasmático aumentariam (HOTTA et al., 2000). O cálcio é um importante mensageiro intracelular e sabe-se que o *P. falciparum* requer Ca^{2+} para regular seu ciclo celular e sobrevivência, portanto um desequilíbrio da homeostasia desse cátion no vacúolo parasitóforo pode interferir com o desenvolvimento do parasito (CAMACHO, 2003).

Estudos relatam que a artemisinina também é capaz de despolarizar a membrana mitocondrial do parasito da malária. A produção de espécies reativas é induzida pela artemisinina nas mitocôndrias do *Plasmodium*, mas não nas mitocôndrias de mamíferos. A cadeia de transporte de elétrons estimula os efeitos da artemisinina, preferencialmente ativando-a, e a geração local de radicais livres promove a perda do potencial de membrana mitocondrial e interrompe suas funções normais com consequente morte celular. É evidente que detalhes nesse mecanismo ainda precisam ser refinados e respondidos com novos estudos (LI e ZHOU, 2010; WANG et al., 2010).

Klonis e colaboradores (2011) mostraram que um dos efeitos da artemisinina é diminuir a absorção de hemoglobina pelo parasito. Através do uso de inibidores das proteases falcipáínas, que são enzimas necessárias na degradação da hemoglobina, observou-se que tais inibidores exerceram efeitos antagonistas na ação da artemisinina. Tais resultados sugerem que um produto originado da digestão da hemoglobina é necessário para a atividade antimalárica da artemisinina. Em estudos anteriores, os mesmos resultados não foram vistos com as enzimas plasmepsinas (HOPPE et al., 2004; KLONIS et al., 2011).

Recentemente, Witkowski et al. (2012) observaram que a artemisinina e derivados também são capazes de interferir no metabolismo do grupo heme. Em cepas resistentes da espécie infectante de roedores *P. yoelii*, foram detectadas baixas concentrações de hemozoína, sugerindo outra via implicada na detoxificação do heme além da cristalização em hemozoína. Uma hipótese plausível seria que a via da glutatona redutase seria essa via alternativa. Altos níveis de glutatona reduzida (GSH), foram realmente encontradas nessas cepas, confirmando o envolvimento dessa via no processo de detoxificação do heme e que a via de síntese da hemozoína é um dos alvos da artemisinina (WITKOWSKI et al., 2012).

A ampla ação esquizotocida e gametocida da artemisinina torna essa droga muito eficaz na melhora clínica em pacientes com malária cerebral, pois atua em formas sanguíneas sequestradas nos capilares. A terapia combinada com artemisina e outra droga de ação lenta é recomendação da OMS no intuito de diminuir o tempo de tratamento e surgimento de resistência (NOSTEN & WHITE, 2007).

1.7 Resistência aos antimaláricos

O termo resistência foi definido pela OMS como a capacidade de um parasito em sobreviver ou multiplicar, apesar da administração e absorção de uma droga administrada em doses iguais ou maiores do que aquelas normalmente recomendadas, mas dentro da tolerância do indivíduo. A multirresistência do *P. falciparum* ocorre quando o parasito é resistente a mais de dois compostos antimaláricos de diferentes classes químicas e modos de ação (WHO, 2010).

Atualmente, a Rede Amazônica de Vigilância da Resistência às Drogas Antimaláricas (RAVREDA) criada pela Organização Pan Americana de Saúde (OPAS) juntamente com a Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela vem monitorando o surgimento de resistência no Brasil e em outros países (PAHO, 2010).

1.7.1 Resistência aos quinolínicos

Estudos epidemiológicos identificaram pelo menos seis regiões independentes do mundo onde surgiram cepas *P. falciparum* cloroquina-resistentes (CQR). No final de 1970, a CQR entrou na África, tendo se originado no sudeste Asiático e também na América do Sul (WELLEMS et al., 2009). O primeiro relato de resistência às drogas antimaláricas no Brasil aconteceu em 1907, o qual observava

a ineficácia da quinina usada como profilático em trabalhadores durante a construção da ferrovia Madeira-Mamoré em Rondônia.

A base genética da resistência à cloroquina é caracterizada basicamente por dois genes: o gene *pfcr1* que codifica um transportador CQR e o gene *pfmdr1*, que codifica o transportador de resistência à multidrogas (FIDOCK et al., 2000; SANCHEZ et al., 2010).

A PfCRT é uma proteína de 424 aminoácidos que está localizada na membrana do vacúolo digestivo (KUHN et al., 2010), sua ação na resistência à cloroquina é baseada em mutações dessa proteína que conseqüentemente, possibilitam o efluxo do fármaco do VD em cepas *P. falciparum*. Os parasitos CQR acumulam quantidades substancialmente mais baixas de CQ em seus VD do que parasitos cloroquina-sensíveis (CQS) (FITCH, 2004).

Vários estudos também indicam a correlação entre o desenvolvimento de CQR e substituições de aminoácidos, como lisina para treonina na posição 76 conhecido como K76T no gene *pfcr1*. No entanto, outros propuseram que a mutação K76T não atua sozinha, mas em conjunto com outras mutações vizinhas (VALDERRAMOS e FIDOCK, 2006; VALDERRAMOS et al., 2010; AWASTHI et al., 2012).

O gene *pfmdr1* codifica uma proteína de 162-KDa, também denominada Phg1 localizada na membrana do VD, cuja função é importar solutos para o interior do VD. Acredita-se que mutações ou alterações no número de cópias de genes dessa proteína podem influenciar o acúmulo de fármacos no vacúolo digestivo do parasito. Há crescente evidência de que os polimorfismos em aminoácidos 86, 184, 1034, 1042, e 1246 de *pfmdr1* podem ainda alterar a suscetibilidade *in vitro* de antimaláricos como a quinina, halofantrina, mefloquina e artemisinina (DURASINGH e COWMAN, 2005).

A susceptibilidade reduzida à CQ em *P. vivax* foi observada pela primeira vez em 1989, em soldados australianos que retornavam de Papua Nova Guiné, trinta anos depois dos relatos de surgimento CQR em *P. falciparum* (RIECKMANN et al., 1989). Esta diferença de tempo pode ser explicada por diferenças inerentes a cada espécie. Mais tarde, vários casos de resistência *vivax* em Papua-Nova Guiné, Indonésia, Nova Guiné, Brasil e Índia foram documentados (GARAVELLI e CORTI, 1992; MURPHY et al., 1993). Estudos recentes também relatam uma redução na susceptibilidade a CQ no Sudeste Asiáticos (RUSSELL et al., 2008). Essa

informação indica um aumento gradual nos casos de resistência à CQ por *P. vivax* (KUMAR et al., 2007).

Em relação à genotipagem molecular da resistência à CQ em *P. vivax*, genes ortólogos aos de *P. falciparum*, tais como *pvcr1* e *pvmdr1*, parecem estar ligados à quimiorresistência à CQ (NOMURA et al., 2001; BREGA et al., 2005). A caracterização molecular de isolados de *P. vivax* também foi realizada no Brasil (SÁ et al., 2005; ORJUELA-SÁNCHEZ et al., 2009).

O mecanismo de ação da cloroquina contra a fase sanguínea de *P. vivax* permanece desconhecida. A maioria do que tem sido relatado para *P. vivax* são padrões já descritos para *P. falciparum*. Assim, a busca de marcadores moleculares de resistência em *P. vivax*, naturalmente derivam de genes mutantes ortólogos a *P. falciparum*, como *pvmdr1* e *pvcr1* (SÁ et al., 2005).

1.7.2 Resistência aos antifolatos

Em *P. falciparum* mutações pontuais nos genes *dhfr* e *dhps*, os quais codificam as enzimas diidrofolato redutase e dihidropteroato sintase respectivamente são as principais causas de resistência aos antifolatos. As alterações mais comumente observadas são mudanças em aminoácidos como Ser108 para Asn108 (S108N) no gene *dhfr*, o qual promove um aumento à resistência para pirimetamina. A adição de mutações subsequentes, alterando Asn51 para Ile (N51I), Cis59 para Arg (C59R) e Ile164 para Leu (I164L), progressivamente aumentam a resistência a pirimetamina (COSTANZO e HARTL, 2011).

A resistência à sulfadoxina em *P. falciparum* ocorre devido mutações no gene *dhps* (TRIGLIA et al., 1998). Uma combinação de mutações S108N e I164L confere resistência à pirimetamina, que é intensificado quando o C59R ou N51I também estão presentes (MHARAKURWA et al., 2011).

Para *P. vivax*, a resistência à associação Sulfadoxina-Pirimetamina (SP) também está ligada a acumulo de múltiplas mutações no gene *dhfr*. No Brasil, a presença de mutações no gene *pvdhfr* também reflete a seleção de parasitos *P. vivax* SP- resistentes (GAMA et al., 2009). A ampla disseminação de SP contra *P. falciparum* teria exercido pressão seletiva para mutações na diidrofolato redutase e dihidropteroato sintase em *P. vivax* (Baird, 2009). A resistência aos antifolatos evoluíram mais rapidamente do que a resistência à cloroquina (WELLS et al., 2009).

1.7.3 Resistência aos endoperóxidos

No início dos anos 2000 estudos revelavam falhas no tratamento clínico com terapias combinadas com derivados de artemisinina (ACTs) na fronteira Tailândia e Camboja (VIJAYKADGA et al., 2006). Evidências convincentes à resistência a ACT surgiram em meados de 2009 no oeste do Camboja e noroeste da Tailândia, onde foi estabelecido artesunato como monoterapia ou a combinação artesunato-mefloquina (DONDORP et al., 2009).

A base molecular para a resposta reduzida à artemisinina em *P. falciparum* não é clara. As mutações em vários genes que codificam proteínas transportadoras são candidatas por conferir resistência artemisinina. Uma alteração de um único aminoácido L263E na pfATPase6, uma ATPase cálcio dependente, análoga a SERCA presente no retículo endoplasmático de mamíferos está associada à essa resistência (ECKSTEIN-LUDWIG et al., 2003; JAMBOU et al., 2005).

O transportador de resistência multidrogas também parece igualmente contribuir para a redução da sensibilidade à artemisinina. Mutações e amplificações do gene pfmdr1 que codifica o homólogo da glicoproteína P-1 (Pgh1) aumenta o efluxo de fármacos, conseqüentemente reduz a ação dos antimaláricos (SANCHEZ et al., 2008; SANCHEZ et al., 2010). Polimorfismos nos genes *P. falciparum* resistente a multidrogas associados a proteína 1, a qual é expressa na membrana plasmática do parasito, é também implicada na redução da susceptibilidade à artemisinina (DAHLSTRÖM et al., 2009; O'BRIEN et al., 2011).

1.8 Compostos híbridos

Atualmente, o tratamento mais eficaz contra *P. falciparum* é a combinação em dose fixa de derivados da artemisinina com outros antimaláricos como a lumefantrina. A associação de antimaláricos pode aumentar a sua eficácia, diminuir o tempo de duração do tratamento e diminuir o risco de parasitos multirresistentes (CHIYANZU et al, 2005). Por isso, pesquisas voltadas para o desenvolvimento de compostos híbridos com atividade antimalárica (VOLK et al., 2003; LOMBARD et al., 2010; MANOHAR et al., 2012) têm sido de fundamental importância nos últimos anos.

Os compostos híbridos possuem duas ou mais moléculas ligadas entre si covalentemente, atuando simultaneamente em um único alvo ou em dois alvos

diferentes (MANOHAR et al, 2012). Um dos maiores desafios para o planejamento de um composto híbrido é fazê-lo superar as propriedades dos componentes individuais de um medicamento preparado em forma de dose fixa. Particularmente os aspectos associados à resistência, potência, solubilidade, forma de administração, farmacocinética, metabolismo e toxicidade devem ser levados em consideração na fase de planejamento do composto híbrido. Outros aspectos também devem ser considerados tais como: 1) mecanismo de ação dos grupos farmacofóricos individuais; 2) tipo de ligação que será realizada entre eles; 3) distância entre os dois grupos farmacofóricos e 4) geometria molecular, se conhecida, dos farmacóforos em seus alvos de ação.

Existem inúmeras vantagens desses fármacos em comparação com as terapias combinadas convencionais. Os híbridos podem ser mais baratos, já que os riscos e o custo de desenvolvimento envolvidos são os mesmos de uma droga única, o risco de interações medicamentosas pode ser menor, podem possuir menor toxicidade, podem ser mais previsíveis em relação às propriedades farmacocinéticas e ainda podem permitir uma redução de resistência do parasito (MUREGI et al., 2012; MULLER-SCHIFFMANN et al., 2012). Outra característica importante é o mecanismo sinérgico, em que estes compostos muitas vezes podem superar as atividades da combinação dos medicamentos isolados (MUREGI et al., 2010). Um aspecto negativo dos compostos híbridos pode ser a maior dificuldade de ajustar a sua proporção para atuação em diferentes alvos de ação (MORPHY et al, 2005).

Em 2012, Manohar e cols desenvolveram uma nova classe de moléculas unindo a cloroquina, um antimalárico tradicional e a pirimetamina, que atua na inibição dihidrofolato redutase importante na biossíntese do ácido fólico, e avaliaram a atividade antimalárica desses compostos em duas cepas de *P. falciparum* cloroquina resistente (D6 e W2). Utilizaram diaminoalcanos como ligante entre os dois farmacóforos e adicionaram várias aminas secundárias (piperidina, morfina, N-metil piperazina e N-etil piperazina). Oito de quatorze moléculas testadas foram 25 vezes mais ativas para a cepa W2 e o composto apresentou CI_{50} dez vezes menor se comparado à cloroquina para as duas linhagens.

Outro exemplo interessante descrito na literatura é o relatado por Bellot e colaboradores onde três grupos farmacologicamente ativos contra o plasmódio foram associados em uma única molécula. A síntese de compostos híbridos contendo grupos 1,2,4-trioxano associado a estruturas aminoquinolínicas e

ferroceno também já foram relatadas (BELLOT et al., 2010) e esses compostos mostraram atividade significativa contra o *P. falciparum*.

Em 2009, Kouznetsov e Gómez-Barrio avaliaram a atividade antimalárica de três híbridos contendo dois farmacóforos diferentes, um anel quinolínico e um grupo tiossemicarbazona, que atua na inibição da cisteína protease. A atividade antimalárica foi avaliada em quatro linhagens de *P. falciparum* D10, W2, K1 e FP-2. Observou-se boa atividade *in vitro* desses híbridos contra K1 com valor de CI_{50} seis vezes menor em comparação à cloroquina.

Diante dos fatos expostos anteriormente a síntese de novas moléculas híbridas derivadas de quinolinas surgem como uma alternativa atraente para o preparo de novos compostos planejados por hibridação. Sua síntese é relativamente simples e suas estruturas favorecem a introdução de novas modificações.

2 JUSTIFICATIVA

O elevado número de casos clínicos e óbitos registrados anualmente fazem da malária a principal doença parasitária do mundo. Em grande parte, isso se deve às dificuldades de aplicação e manutenção das estratégias de controle da doença nas áreas onde a mesma é endêmica. Além disso, a inexistência de uma vacina eficiente e segura, bem como o desenvolvimento de resistência dos plasmódios aos medicamentos utilizados na terapêutica antimalárica, contribuem para a gravidade da situação. Segundo a OMS (2011), somente no ano de 2011 foram registrados 94 milhões de casos clínicos de malária e cerca de 345 mil mortes, grande parte no continente africano, onde *P. falciparum* é a espécie prevalente. No Brasil, no ano de 2011 foram registrados 330 mil episódios clínicos da doença e 74 mortes (MS, 2012). Cerca de 85% dos casos clínicos foram atribuídos a *P. vivax*, espécie até recentemente considerada não letal, e cerca de 15% a *P. falciparum*.

A multirresistência aos antimaláricos vem sendo registrada no Brasil desde a década de 60 e tem como causa o uso incorreto e/ou descontrolado dos medicamentos que compõem o arsenal terapêutico. Atualmente, a resistência a cloroquina, por exemplo, é relatado em áreas onde *P. falciparum* ocorre e casos de resistência de *P. vivax* começam a ser observados em todo o mundo. Casos de resistência, sobretudo de *P. falciparum*, a quinina, mefloquina, sulfadoxina-pirimetamina, dentre outros, também já foram registrados, suscitando esforços científicos multinacionais para adequação dos esquemas de tratamento, tornando-os mais eficazes e de baixo custo para os países endêmicos. As dificuldades encontradas são o número restrito de drogas com atividade sobre as formas sanguíneas dos plasmódios e a alta toxicidade dessas drogas para uso humano.

Como alternativa para a descoberta rápida de novas drogas com atividade antimalárica, tem-se atualmente incentivado o desenvolvimento de moléculas a partir de modificações estruturais daquelas que integram ou que já integraram o arsenal terapêutico antimalárico.

3 OBJETIVOS

Avaliar a atividade antimalárica de moléculas sintéticas derivadas de quinolina em cultura de *P. falciparum*.

3.1 Específicos

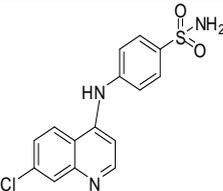
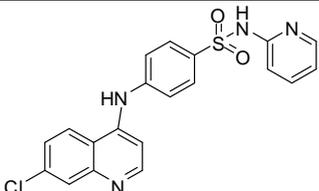
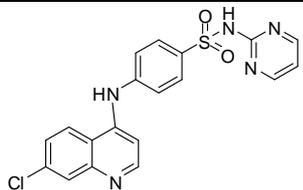
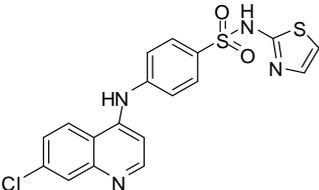
- 1- Avaliar, *in vitro*, a atividade de moléculas derivadas de quinolinas sobre formas sanguíneas assexuadas de *P. falciparum* cloroquina sensível (cepa 3D7), com a finalidade de determinar sua efetividade;
- 2- Avaliar a citotoxicidade dos análogos de quinolinas em células HeLa e em células mononucleares do sangue periférico (PBMC);
- 3- Determinar o índice de seletividade e especificidade dos compostos para *P. falciparum*.

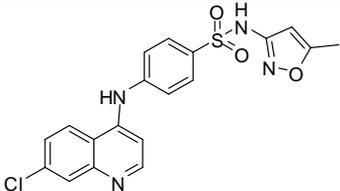
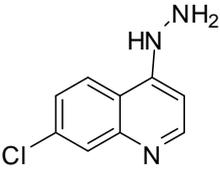
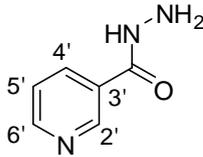
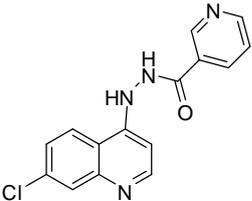
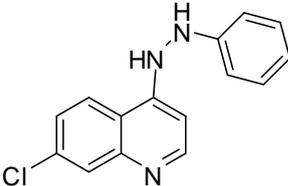
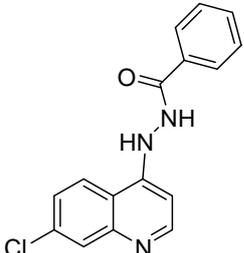
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Compostos testados

Todos os compostos avaliados neste estudo são derivados de quinolinas (Quadro 1), e foram sintetizadas no Laboratório de Síntese Orgânica do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora chefiado pelo Prof. Dr. Adilson David da Silva. No total foram testados 10 compostos derivados de quinolinas sendo 5 híbridos de quinolina-sulfonamida. As estruturas dos compostos bem como seus rendimentos são apresentadas a seguir:

Quadro 1: Estruturas e rendimentos de cada composto fornecidos pelo Dr. Adilson David da Silva-UFJF.

Código	Estrutura/Nomenclatura*	Rendimento (%)*
RMP099	 <p>4-(<i>p</i>-aminobenzenosulfonamida)-7-cloroquinolina</p>	86
RMP100	 <p>4-[(<i>p</i>-aminobenzenosulfonamida-<i>N</i>¹-(2'-piridinil)]-7-cloroquinolina</p>	71
RMP101	 <p>4-[(<i>p</i>-aminobenzenosulfonamida-<i>N</i>¹-(2'-diazinil)]-7-cloroquinolina</p>	62
RMP102	 <p>4-[(<i>p</i>-aminobenzenosulfonamida-<i>N</i>¹-(2'-tiazolil)]-7-cloroquinolina</p>	82

RMP103	 <p>4-[(<i>p</i>-aminobenzenosulfonamida-<i>N</i>¹-(5'-metil-3'-isoxazolil))]-7-cloroquinolina</p>	80
RMP105	 <p>7-cloro-4-hidrazinilquinolina</p>	76
RMP107	 <p>Nicotinohidrazida</p>	81
RMP109	 <p>4-(nicotinohidrazida)-7-cloroquinolina</p>	78
RMP112	 <p>4-(fenilhidrazinil)-7-cloroquinolina</p>	82
RMP113	 <p>4-(benzohidrazida)-7-cloroquinolina</p>	62

Os rendimentos das reações de sínteses apresentados indica o quanto de produto final é tido no final do processo produtivo em relação à quantidade inicial de reagentes utilizados.

4.2 Solubilização dos compostos para testes de atividade biológica

Para realização dos testes biológicos os compostos foram solubilizados de acordo com as especificações fornecidas pelo Prof. Dr. Adilson David da Silva-UFJF. Inicialmente as moléculas foram diluídas em solvente dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) a uma concentração de 10mg/mL (solução estoque). A droga de referência (cloroquina) foi diluída em meio RPMI 1640 (Invitrogen). Todas as soluções foram estocadas a 4°C até o momento do uso.

No momento do ensaio quimioterápico, as drogas teste foram diluídas a várias concentrações em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) contendo 5% de albumax (para os testes antimaláricos) ou soro fetal bovino (para os testes de citotoxicidade), sendo que estas diluições não eram estocadas, sendo feitas sempre no momento de uso e descartadas após os testes.

4.3 Ensaios Biológicos

4.3.1 Cultivo de células HeLa

A citotoxicidade de todas as moléculas foi avaliada *in vitro*, utilizando-se células HeLa – células de colo uterino. Essa linhagem celular nos foi gentilmente cedidas pelo Professor Doutor Fernando de Pilla Varotti da Universidade Federal de São João Del Rey.

Anteriormente ao estudo de citotoxicidade os criotubos armazenados em nitrogênio líquido foram retirados e as células descongeladas sob agitação em banho-maria a 37°C. Após descongelamento, o criotubo foi aberto em capela bacteriológica e todo o conteúdo foi transferido para um tubo de centrifugação de 15 mL (Sarstedt, Germany) contendo 8 mL de meio RPMI1640 completo. Iniciou-se a centrifugação por 800g durante 5 minutos.

A seguir, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 5 mL de meio de RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab). A suspensão foi transferida para uma garrafa plástica, tratada para promover adesão celular (Sarstedt, Germany) e mantida em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. O meio foi então trocado a cada 48 horas para garantir a renovação dos nutrientes. Contaminações foram monitoradas por meio de análise em microscópio invertido em aumento de 40x (Nikon). Quando a cultura atingiu 80% de confluência as células foram tripsinizadas (tripsina 1:250, Sigma) o que permitiu sua remoção. Então, as

células foram recolhidas em um tubo de centrifuga de 15 mL contendo meio RPMI 1640 completo seguindo-se centrifugação por 800g por 5 minutos. O sobrenadante foi, então descartado e o sedimento ressuspendido em 1 mL de meio RPMI completo. A viabilidade celular foi averiguada por meio do uso do Azul de Trypan (Sigma-Aldrich), um corante vital que marca células mortas. O número de células viáveis foi averiguada por meio de contagem em câmara de Neubauer (aumento de 20x).

4.3.2 Obtenção de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC)

Os linfócitos humanos foram obtidos de um doador saudável, após consentimento livre e esclarecido. Para tal, coletou-se o sangue periférico em tubos previamente identificados, os quais foram mantidos em temperatura ambiente (entre 15° e 30°C) até o seu processamento. Em seguida, o sangue foi diluído em solução salina (PBS 1X) na proporção de 1:1, sendo então cuidadosamente dispensado sobre o gradiente de ficol (Gibco) na proporção de 2:1 (2 partes de sangue:1 parte de ficol). Então, as amostras foram centrifugadas a 500g durante 17 minutos para posterior coleta do anel de células mononucleares. As células foram, então, lavadas 2 vezes em solução salina para retirada total do ficol. Ao final da 2ª lavagem, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento de células ressuspendido em 1 mL de meio RPMI completo. Em seguida, foi realizada a contagem do número de células viáveis em câmara de Neubauer utilizando-se azul de trypan (corante vital).

4.3.3 Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em triplicatas, empregando-se o método do MTT. Este se baseia na absorção do sal brometo 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol (MTT) pela célula. Uma vez absorvido, este sal sofre a ação a nível mitocondrial por ação da enzima succinato desidrogenase sendo, então, reduzido a um cristal de cor violeta, insolúvel em água, conhecido como formazan. O formazan é solubilizado em DMSO e sua intensidade de formação é calculada por meio de leitura da absorbância a 550nm utilizando-se espectrofotômetro (BOELONI, et al, 2013). Quanto maior for a absorbância obtida menos tóxico é o composto avaliado.

Para a realização dos testes de viabilidade celular, as células (HeLa ou PBMC) foram distribuídas em placas de 96 poços (4×10^5 células/poço) com meio

RPMI 1640 (contendo glicose 0,11M, Hepes 25mM, Hypoxantina 0,36mM, Gentamicina 40mg), enriquecido com Soro Fetal Bovino (SFB) a 1% e incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ à 37°C por 24h. Após este período o sobrenadante foi descartado e adicionados 100µL de meio de cultura completo contendo diferentes concentrações dos compostos teste (HeLa: 1000µg, 100µg, 10µg, 1µg e 0,1µg e PBMC: 500µg/mL, 250µg/mL, 125µg/mL, 62,5µg/mL, 31,25µg/mL, 15,625µg/mL, 7,8125µg/mL).

Após 48 horas de incubação as placas foram lavadas com PBS 1X e adicionados 100µL do sal tetrazólico MTT na concentração de 5mg/mL. Após 4h de incubação com o MTT, o sobrenadante foi retirado e 50µL de DMSO foram adicionados em cada poço para solubilizar os cristais de formazan. As microplacas foram, então, lidas em espectrofotômetro a 570nm. A concentração citotóxica 50 (CC₅₀), dose letal que inibe em 50% o crescimento das células na presença dos compostos testes, foi determinada em comparação com células cultivadas na ausência de qualquer droga.

A citotoxicidade foi expressa em porcentagem de sobrevivência obtida pela razão: $(A/B) \times 100$, onde (A) é a leitura obtida nos poços com células expostas aos compostos e (B) é a leitura dos poços controle sem adição de droga.

4.3.4 Cultura de *P. falciparum*

Para o presente estudo foram utilizados parasitos da cepa cloroquina-sensível (3D7), de *P. falciparum*, rotineiramente cultivadas em meio RPMI 1640 completo (contendo glicose 0,11M, Hepes 25mM, Hypoxantina 0,36mM, Gentamicina 40mg) suplementado com 0,2% de albumax (Invitrogen, EUA). A cultura foi realizada em garrafas de 25 cm² mantendo-se um hematócrito de 2% de hemácias humanas do tipo O⁺. Para o crescimento dos parasitos forçou-se a obtenção de uma atmosfera pobre em O₂ por meio da combustão de uma vela de parafina branca, pura e inodora em dessecador. Então, as garrafas foram mantidas a uma temperatura de 37°C. Rotineiramente, a manutenção da cultura foi realizada trocando-se diariamente o meio RPMI 1640 completo e mantendo-se o hematócrito a 2% através da reposição com hemácias frescas, que foram cedidas por voluntários do Laboratório de Parasitologia-ICB-UFJF. Imediatamente após a coleta, as hemácias foram lavadas com PBS e centrifugadas a 800g por 5 minutos. A seguir, o sobrenadante e uma fina camada de células brancas que recobrem o sedimento de

hemácias foram descartados, para a remoção completa das células do sistema imunológico.

4.3.4.1 Teste de Viabilidade da Cultura

A viabilidade dos parasitos mantidos em cultura foi avaliada diariamente através de esfregaços finos, fixados com metanol, corados com Giemsa 0,93% e observados em microscópio óptico, com objetiva de imersão (100X-Figura 3). Dessa forma, foi determinada a porcentagem de parasitemia (calculada pelo número de hemácias infectadas num universo total de 1000 hemácias) e observados os aspectos morfológicos, como o número de vacuolizações e as formas evolutivas de *P. falciparum*; também foram monitoradas possíveis contaminações. Somente foram utilizados parasitos que atendessem morfológicamente aos requisitos para teste.

4.3.4.2 Sincronização dos parasitos

Em culturas *in vitro* de *P. falciparum* normalmente observam-se diferentes estágios evolutivos do desenvolvimento: trofozoíto jovem ou anel, trofozoíto maduro, esquizontes. No entanto, os testes quimioterápicos requerem o uso de formas jovens. Por causa disso, antes de cada experimento os parasitos foram submetidos ao método de sorbitol (LAMBROS e VANDERBERG, 1979). Para tal, todo o volume contido na garrafa foi transferido para um tubo de centrifugação de 15mL, seguindo-se centrifugação por 5 minutos a 800g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de hemácias diluído em 10 mL de sorbitol a 10% (Sigma-Aldrich). Os parasitos foram mantidos em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. Após esse tempo, realizou-se novo processo de centrifugação, sendo a seguir, desprezado o sobrenadante. O sedimento foi diluído em meio RPMI 1640 suplementado com 0,2% de albumax e o hematócrito corrigido para 2%. Então, foi confeccionado um esfregaço sanguíneo para determinação da parasitemia constituída somente de formas jovens (anéis) de *Plasmodium* (Figura 3).

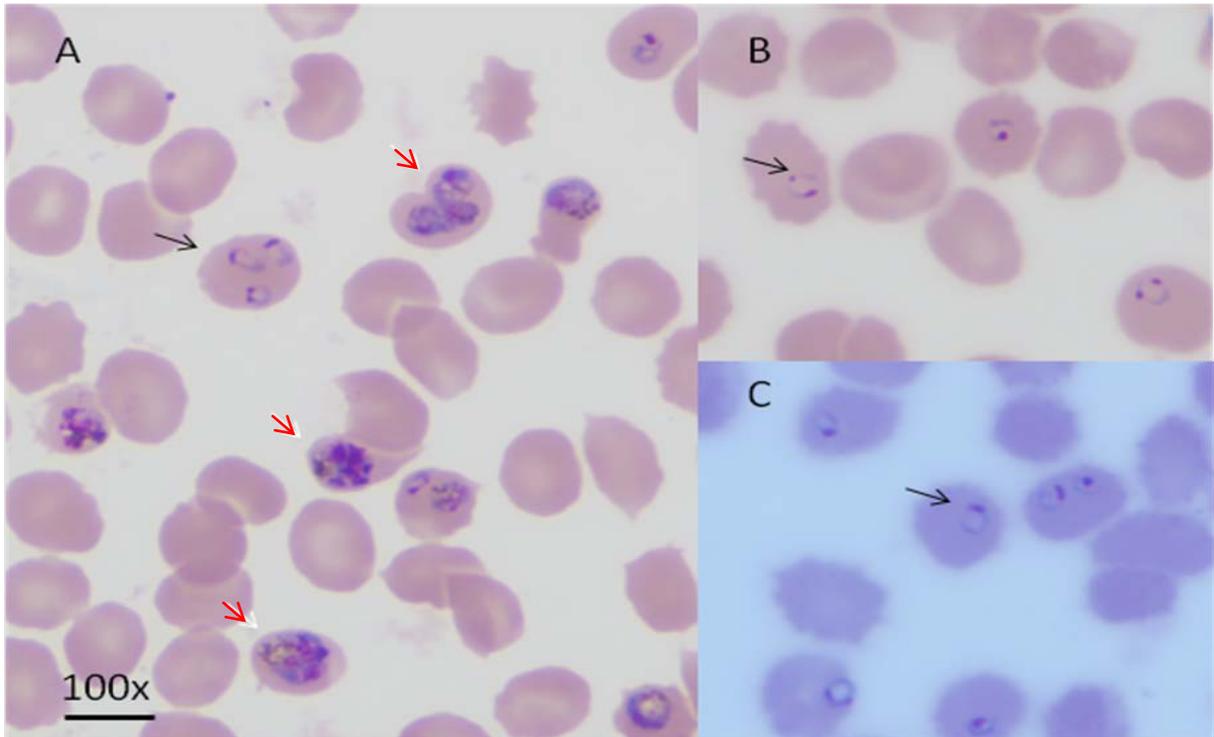


Figura 3: Formas evolutivas de *P. falciparum* (cepa 3D7) observadas em cultura antes (A) e após (B e C) sincronização. Seta preta= formas jovens (anéis); seta branca: formas maduras de *P. falciparum* (trofozoito maduro ou esquizontes).

4.3.4.3 Testes de Antimaláricos “*in vitro*”

Inicialmente realizou-se uma triagem com os fármacos estudados, com intuito de selecionar aqueles que possuíam melhor atividade antimalárica. Para tal, cada fármaco foi avaliado em triplicada em concentrações fixas da droga: 50 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$. Estes testes foram feitos em placa de cultura com 96 orifícios, sendo em cada orifício adicionado 180 μL de cultura, a um hematócrito de 2% e parasitemia de 1% e 20 μL do fármaco na concentração definida. As placas foram incubadas a 37°C, sendo após um período de 24 horas realizada a troca do meio e adição de mais 20 μL do fármaco por poço. Decorridas mais 24 horas, o sobrenadante foi descartado sendo confeccionados esfregaços a partir de cada poço para determinação da parasitemia por análise microscópica. Os resultados obtidos foram comparados com os de teste padrão positivo e negativo.

Feita a triagem inicial, as moléculas que apresentaram melhor atividade foram testadas em uma série de diluições (50 $\mu\text{g/mL}$; 25 $\mu\text{g/mL}$; 12,5 $\mu\text{g/mL}$; 6,25 $\mu\text{g/mL}$; 3,12 $\mu\text{g/mL}$; 1,56 $\mu\text{g/mL}$; 0,78 $\mu\text{g/mL}$; 0,39 $\mu\text{g/mL}$ e 0,19 $\mu\text{g/mL}$), pelo mesmo

método descrito anteriormente com o objetivo de determinar o seu CI_{50} (concentração inibitória 50). Este valor corresponde a dose letal mínima que inibe em 50% o crescimento dos parasitos na presença dos compostos testes, ou seja, metade da concentração inibitória máxima do crescimento parasitário, sendo obtido pela comparação com células cultivadas sem a presença de compostos.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, sendo as lâminas contendo os esfregaços codificadas. A parasitemia foi calculada por meio da fórmula:

Redução da parasitemia (%) = $100 - ((A/B) \times 100)$, onde (A) é a Parasitemia do composto e (B) é a parasitemia do controle.

Com os resultados de CI_{50} obtidos, os compostos tiveram sua atividade avaliada segundo as diretrizes da OMS, que corroboram com os estudos realizados por Pink et al (2005), onde a classificação para a atividade plasmodial de uma droga é tida como: alta atividade quando o CI_{50} for $<5\mu\text{g/mL}$, promissora CI_{50} de $5\mu\text{g/mL}$ a $15\mu\text{g/mL}$, baixa atividade CI_{50} de 15 a $50\mu\text{g/mL}$ e inativa quando $CI_{50} > 50\mu\text{g/mL}$.

4.4 Índice de Seletividade

O índice de seletividade (IS) corresponde à relação entre as atividades citotóxicas e antiparasitárias de cada composto. O IS foi obtido por meio da razão:

$$IS = CC_{50} \text{ linhagem celular} / CI_{50} \text{ } P. \textit{falciparum}$$

Valores maiores que 10 foram considerados indicativos de alta seletividade, o que significa que o composto não é tóxico, enquanto valores abaixo de 10 foram considerados drogas com baixa seletividade, ou seja, tendem a serem tóxicas (WENINGER, et. al., 2001; BÉZIVIN, TOMASI et al, 2003).

4.5 Análise estatística

As curvas de CI_{50} e CC_{50} foram confeccionadas usando-se o programa OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). A determinação do CI_{50} e CC_{50} foi realizada através de decaimento exponencial de primeira ordem.

5 RESULTADOS

5.1 Atividade citotóxica das moléculas em células HeLa e PBMC

A toxicidade das moléculas derivadas de quinolina foi avaliada em células HeLa e PBMC sendo os testes realizados em triplicata em três experimentos independentes. A citotoxicidade foi avaliada pelo método do MTT após 72 horas de cultivo utilizando-se diferentes concentrações dos compostos. A figura 4 ilustra a frequência de células HeLa vivas após exposição com cada composto. Observa-se que dentre todas as moléculas testadas RMP112 e RMP113, mostraram-se citotóxicas a partir da concentração de 100 µg/mL, quando somente 10% das células permaneceram viáveis. Para todas as demais, viabilidade inferior a 50% somente foi observada na concentração de 1000µg/mL. A droga de referência (cloroquina) não foi citotóxica em nenhuma das concentrações testadas. A concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) obtida para cada molécula testada encontra-se descrita na tabela 2. Pelos dados, observa-se que todas as drogas derivadas de quinolinas apresentaram valores elevados de CC₅₀ (>34,3µg/ml) sugerindo seu baixo efeito citotóxico em células HeLa.

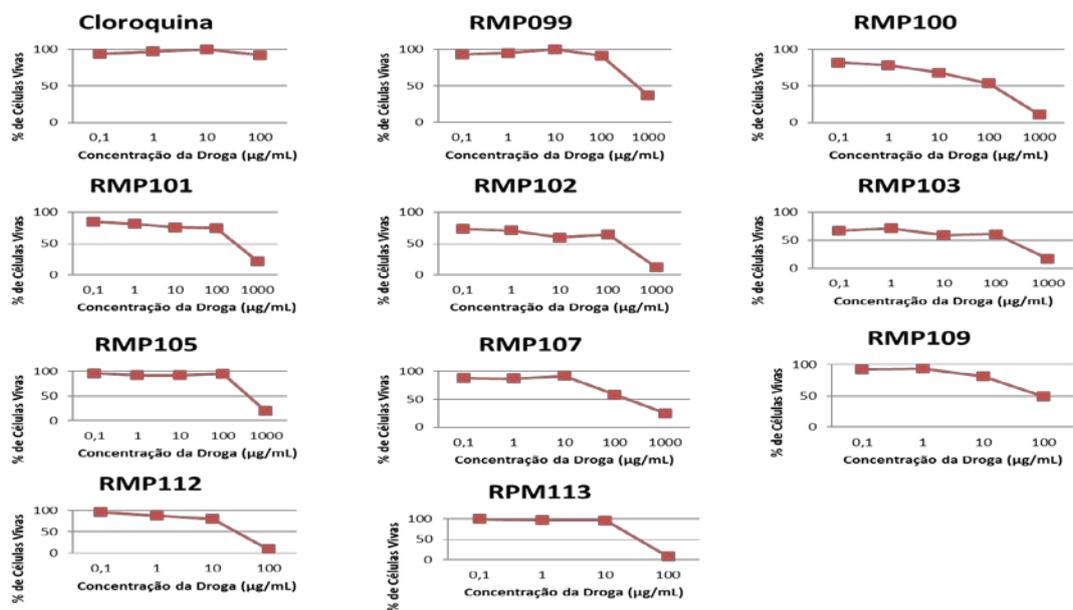


Figura 4: Frequência de células HeLa viáveis após exposição a diferentes concentrações dos compostos avaliados.

Considerando-se que HeLa é uma célula imortalizada, podendo ser mantida em cultivo por períodos indefinidos de tempo, optou-se por verificar o padrão de

citotoxicidade das moléculas sobre PBMC. Os resultados encontram-se descritos na tabela 2. Pode-se observar, portanto, que semelhante ao observado para HeLa as moléculas aqui avaliadas não foram tóxicas já que o padrão de citotoxicidade é semelhante ou inferior ao observado para a droga de referência.

Tabela 2: Concentração Citotóxica (CC₅₀) obtida para as moléculas derivadas de quinolinas em células HeLa e PBMC.

Moléculas	HeLa CC₅₀ (µg/ml)	PBMC CC₅₀ (µg/ml)
RMP099	286,35	>500
RMP100	109,08	234,92
RMP101	279,77	>500
RMP102	238,11	>500
RMP103	111,52	>500
RMP105	359,95	ND
RMP107	122,39	ND
RMP109	83,5	ND
RMP112	34,3	ND
RMP113	75,6	ND
CQ	>100	>100

CQ=cloroquina ND=não determinada

5.2 Atividade antimalárica das drogas avaliadas

Uma vez determinado o potencial citotóxico dos compostos iniciou-se os testes antimaláricos *in vitro* contra *P. falciparum* (cepa 3D7-cloroquina sensível) por meio de ensaio quimioterápico tradicional. Inicialmente realizou-se uma triagem com as concentrações de 50 e 25µg/mL a fim de se verificar a redução no desenvolvimento do parasito após 48 horas de cultura. Os resultados encontram-se descritos na tabela 3. Observa-se que a maior parte das drogas testadas apresentou ação antimalárica próxima a droga padrão, destacando-se como mais ativas as moléculas conjugadas a um grupo hidrazina, RMP105, RMP109, RMP112 e RMP113.

As moléculas que apresentaram redução no desenvolvimento parasitário igual ou superior a 50% em qualquer uma das concentrações foram selecionadas para os experimentos quimioterápicos visando a determinação da CI₅₀.

Tabela 3: Inibição do crescimento *in vitro* de *P. falciparum* (%) por drogas derivadas de quinolinas.

Moléculas	% de inibição crescimento 50µg/mL	% de inibição do crescimento 25µg/ml
RMP099*	82	88
RMP100*	85	89
RMP101*	80	72
RMP102*	84	90
RMP103*	63	61
RMP105*	97	85
RMP107*	60	50
RMP109*	95	85
RMP112*	100	89
RMP113*	90	82
CQ	>98	>96

*drogas selecionadas para os testes quimioterápicos

CQ=cloroquina-droga de referência

As moléculas selecionadas na triagem inicial foram, então, tituladas em concentrações decrescentes (50µg/mL a 0,39µg/mL ou 0,19µg/mL) para determinação da concentração inibitória de 50% (CI₅₀; Tabela 4). A determinação do CI₅₀ foi realizado através de decaimento exponencial de primeira ordem por meio do programa OriginPro 8.0, sendo as curvas obtidas apresentadas a seguir (Figura 4). Pelos dados observa-se que exceto as RMP103 e RMP107, cujo CI₅₀ foi superior a 23 e 50µg/mL, respectivamente, todas as demais foram efetivas contra *P. falciparum* em baixas concentrações. Destacam-se, no entanto, como moléculas promissoras as RMP105, RMP109, RMP112 e RMP113 dado os valores de CI₅₀ observados. Dentre essas, destaca-se RMP105 cujo CI₅₀ foi inferior a 0,19µg/mL, portanto similar ao obtido para a droga de referência (tabela 4).

A análise dos gráficos apresentados na figura 5 permite inferir que em algumas drogas a atividade antimalárica é dose-dependente. Nesse caso, tal tendência fica evidente para os compostos RMP101, RMP102, RMP103 e RMP109.

Tabela 4: Concentração Inibitória 50 (CI₅₀) das drogas derivadas de quinolinas em cultura de *P. falciparum* (cepa 3D7).

Moléculas	<i>P. falciparum</i> CI₅₀ (µg/ml)
RMP099	2,18
RMP100	3,64
RMP101	16,3
RMP102	5,97
RMP103	23,85
RMP105	<0,19
RMP107	>50,0
RMP109	1,76
RMP112	0,46
RMP113	0,89
CQ	<0,19

CQ=cloroquina

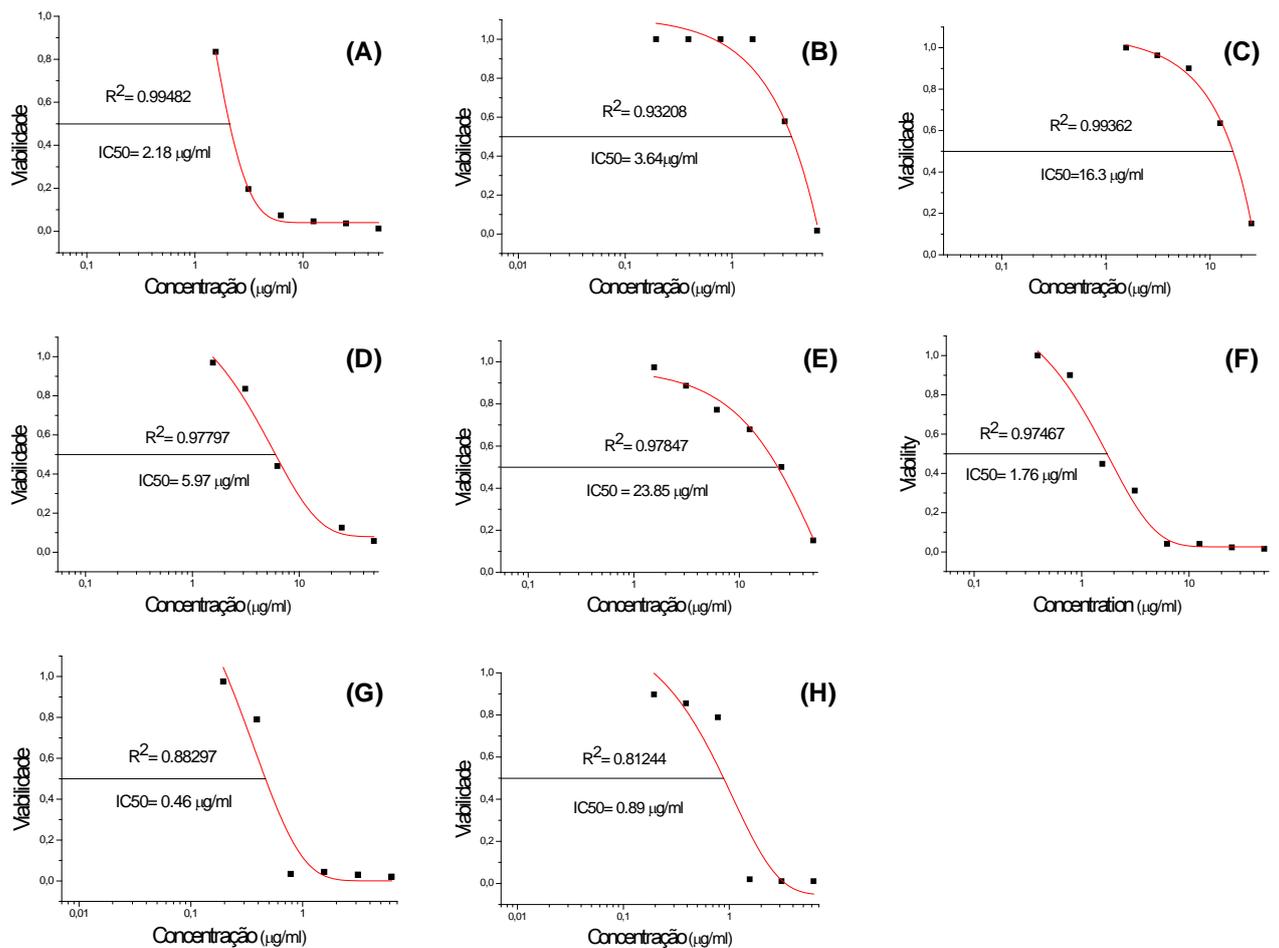


Figura 5: Curvas dose-resposta dos compostos RMP099 (A), RMP100 (B), RMP101 (C), RMP102 (D), RMP103 (E), RMP109 (F), RMP112 (G) e RMP113 (H) contra *P. falciparum* (cepa 3D7). As curvas dose-resposta dos compostos RMP107 e a RMP 105 não são apresentadas por estas apresentarem valores fora da faixa estudada.

Portanto, com base no resultado de CI_{50} descrito na tabela 3 e nas diretrizes da OMS para a avaliação da atividade antimalárica, pode-se concluir que cerca de 60% das drogas testadas apresentaram alta atividade (CI_{50} variando de $<0,195\mu\text{g/mL}$ a $3,12\mu\text{g/mL}$), 10% são promissoras (CI_{50} de $5,06\mu\text{g/mL}$), 20% possuem baixa atividade na inibição do crescimento parasitário (CI_{50} de $16,3\mu\text{g/mL}$ a $23,85\mu\text{g/mL}$) e 10% são inativas ($\text{CI}_{50}>50\mu\text{g/mL}$).

Quando se analisa a atividade citotóxica desses compostos na linhagem celular humana HeLa observa-se que as drogas derivadas de quinolinas exibem baixa toxicidade. Em relação aos valores do índice de seletividade desses

compostos percebe-se que todos, a exceção de RMP103 e RMP107, foram seletivos para o parasito, ou seja, apresentaram $IS > 10$ (Tabela 5). Observa-se ainda que maior potencial de seletividade é observado para as moléculas que possuem o grupo hidrazina em sua estrutura (RMP105 a RMP113). Dentre todas as moléculas testadas, RMP105 apresenta-se pelo menos 1800 vezes mais ativa contra *P. falciparum* que para células HeLa, valor esse superior ao observado para a cloroquina.

Tabela 5: Índice de Seletividade (IS) das drogas derivadas de quinolinas.

Moléculas	Atividade		IS
	<i>P. falciparum</i> (CI_{50} $\mu\text{g/ml}$)	HeLa (CC_{50} $\mu\text{g/ml}$)	
RMP099	2,18	286,35	131,3
RMP100	3,64	109,08	29,96
RMP101	16,3	279,77	17,16
RMP102	5,97	238,11	39,88
RMP103	23,85	111,52	4,67
RMP105	<0,19	359,95	>1800
RMP107	>50,0	122,39	>2,44
RMP109	1,76	83,5	47,44
RMP112	0,46	34,3	74,57
RMP113	0,89	75,6	84,94
CQ	<0,19	>100	>526

IS=índice de seletividade

CQ=cloroquina

As moléculas que apresentaram melhor atividade e maiores índices de seletividade, a saber, a RMP105, RMP109, RMP112 e a RMP113, foram então testadas em cultura de *P. falciparum* W2, cepa esta cloroquina resistente, seguindo a mesma metodologia empregada para 3D7 (Tabela 6).

Tabela 6: Concentração Inibitória 50 (CI₅₀) das drogas derivadas de quinolinas em cultura de *P. falciparum* (cepa W2).

Moléculas	<i>P. falciparum</i> W2 CI₅₀ (µg/ml)
RMP105	<0,39
RMP109	1,57
RMP112	<0,39
RMP113	0,58
CQ	<0,39
ART	<0,39

CQ: Cloroquina; ART: Artesunato

Os resultados demonstram que tais compostos apresentaram atividade frente à cepa W2, condizente com as drogas de referência Artesunato e Cloroquina. Destacando-se as RMP105 e a RMP112 por apresentarem IC50 inferior a 0,39, e assim melhor atividade.

6 DISCUSSÃO

A malária é ainda um fator limitante na qualidade de vida de grande parte da população mundial, influenciando também negativamente no desenvolvimento de muitos países, por provocar grande morbidade e milhares de óbitos (WHO, 2011). Neste cenário, influenciado pelo crescente número de relatos sobre a resistência a antimaláricos, não somente por *P. falciparum*, mas também por *P. vivax*, torna-se urgente a busca por novas alternativas quimioterápicas, a principal base do controle da doença (BAGAVAN, 2010; FERREIRA e SILVA-NUNES, 2010; OLIVEIRA-FERREIRA, et al., 2010).

Atualmente, um grande número de técnicas *in vitro* está disponível para investigar a eficácia de uma droga frente a um agente nocivo (NOEDL et al, 2003). Dentre elas, pode-se citar técnicas baseadas na detecção de enzimas do parasito (PIPER et al, 1999), ácidos nucleicos (JOHNSON et al, 2007; KARL et al, 2009; NDIAYE et al, 2010) e contagem por microscopia ótica. Apesar de serem técnicas que envolvem metodologias distintas, todas objetivam avaliar a inibição do crescimento intraeritrocítico do parasito após exposição a determinada droga. Tais metodologias apresentam como principais vantagens a rapidez na triagem de um grande número de fármacos e, sobretudo, dispensa o uso de animais de laboratório. Em contrapartida, o cultivo *in vitro* de *P. falciparum* é uma técnica extremamente laboriosa, está sujeita a contaminações e possui alto custo, mas sua utilização para testes iniciais de triagens de fármacos é indispensável do ponto de vista custo-benefício.

A OMS tem preconizado a adoção de terapias baseadas na combinação de fármacos para o tratamento da malária humana (WHO, 2010). Para que ocorram tais associações os fármacos devem apresentar evidências concretas de ação seletiva e segura, facilitando o tratamento e tornando-o mais eficaz (PIOLA, et al, 2010; WHO, 2011). Uma vantagem da adoção das combinações de antimaláricos é a maior adesão ao tratamento, por serem os fármacos administrados juntos em uma mesma forma farmacêutica, e em doses menores, o que reduz o seus efeitos adversos sem, contudo, alterar sua eficácia (WALSH e BELL, 2009). As associações mais usadas de antimaláricos baseiam-se na combinação de derivados de artemisinina e derivados quinolínicos, como artesunato-mefloquina ou artemeter-lumefantrina (FERREIRA e SILVA-NUNES, 2010).

Outra alternativa para a obtenção de novos compostos com ação antimalárica tem sido o estudo de moléculas híbridas, formadas pela ligação covalente de dois ou mais grupos farmacofóricos (MANOHAR et al, 2012) visando aumentar sua eficácia, diminuir o tempo de duração do tratamento, diminuir o risco de surgimento de parasitos multirresistentes e ser uma opção mais barata que a associação medicamentosa (CHIYANZU et al, 2005)

Sendo assim, os compostos estudados neste trabalho, híbridos derivados de quinolina, foram testadas quanto a sua capacidade antiplasmodial e citotóxica, a fim de selecionar compostos que apresentassem índices de seletividade maiores que 10, considerados de alta seletividade (BÉZIVIN et al., 2003). A combinação de alta atividade antimalárica e baixa citotoxicidade credencia tais compostos com uma alternativa promissora no arsenal terapêutico antimalárico.

6.1 Atividade antimalárica dos derivados de Quinolina sobre cultura de *P. falciparum* cepa 3D7

Historicamente, a cloroquina, um derivado quinolínico, foi o mais importante antimalárico utilizado no tratamento da malária falciparum, sobretudo por sua eficácia e alta tolerância, sendo seguro inclusive para administração em gestantes (GINSBURG et al, 2005). Atualmente, *P. falciparum* mostra-se totalmente resistente ao tratamento com cloroquina, mas o arsenal terapêutico atual envolve drogas derivadas de quinolina tais como amodiaquina e mefloquina (TILLEY et al, 2006, MS, 2012). Por isso, muito se tem feito na tentativa de se desenvolver moléculas de origem sintética, derivadas ou conjugadas a quinolinas, no intuito de serem aplicadas na terapêutica antimalárica.

Dentre os 10 compostos estudados, 9 foram considerados ativos, com $CI_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$. Apenas o composto RMP107 foi inativo (Tabela 4 e 5). Os compostos RMP105, RMP109, RMP112 e RMP113, todos portadores de um grupo hidrazina, foram os mais ativos, com CI_{50} variando de 1,76 a $0,19 \mu\text{g/ml}$, semelhantes ao CI_{50} da cloroquina ($< 0,19 \mu\text{g/ml}$).

A ação antimalárica de compostos sintéticos com grupamentos hidrazinas já foi demonstrada por Gemma e colaboradores (2012), e tiveram sua ação associada à inibição da *P. falciparum* subtilisina-like protease 1 (PfUB1), uma serina protease envolvida na ruptura dos eritrócitos durante a saída dos merozoítos. A inibição deste

alvo de ação específico do parasito poderia explicar a ação mais efetiva do composto RMP 105, além de reforçar a obrigatoriedade do grupamento hidrazina na molécula. Outro possível mecanismo, sugerido por Coimbra e colaboradores (2011) em estudo em diferente espécie de *Leishmania*, está relacionada à capacidade dessas moléculas interagirem com o DNA podendo afetar a sobrevivência do parasito (COIMBRA et al, 2011).

Os compostos RMP109, RMP112 e RMP113 possuem um anel heteroaromático ou aromático na sua composição. Observa-se, pelo desenho estrutural, que a presença de um átomo de nitrogênio no anel aromático parece diminuir a atividade antimalárica. Por outro lado, a presença de um átomo de oxigênio entre o anel piridínico e o anel aromático não interfere na atividade dos compostos. Kumar e colaboradores (2009) demonstraram que a adoção de anéis aromáticos em compostos tetraoxanos aumentou sua ação antimalárica, sem interferir na ação citotóxica em células Vero (célula epitelial de rim de macaco).

Outra ação descrita para compostos com anéis aromáticos foi proposta por Zishiri e colaboradores (2011), que avaliaram moléculas derivadas da dibementina, capazes de reverter o fenótipo cloroquina-resistente de cepas de *P. falciparum*. Esta ação possibilitaria o emprego destes compostos em associações com a cloroquina, garantindo a eficácia desta.

Apesar das moléculas contendo um grupamento hidrazina terem sido as mais efetivas no controle do crescimento *in vitro* de *P. falciparum* e mais seletivas para o parasito, as moléculas contendo um grupo sulfonamida, à exceção de RMP103 (CI₅₀=23,85, IS=4,67), também mostram-se promissoras. Estudos similares utilizando moléculas conjugadas a sulfonamidas vêm demonstrando boa atividade dessas moléculas tanto em cepa cloroquina-resistente de *P. falciparum* quanto formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (SOUZA et al, 2004).

Apesar dos experimentos terem sido conduzidos em cepa de *P. falciparum* sensível à cloroquina, os resultados sugerem que grande parte das moléculas testadas podem ser promissoras para o desenvolvimento de futuros fármacos e, assim, poderiam contribuir para o aumento do arsenal terapêutico antimalárico. Experimentos conduzidos em cepas de *P. falciparum* resistente à cloroquina devem, no entanto, ser realizados uma vez que existem evidências de que moléculas ativas em cepa cloroquina-sensível podem não apresentar qualquer atividade em cepas resistentes (AYUKO et al, 2009).

Deve-se ressaltar ainda que os compostos empregados nesse estudo são de fácil e rápida obtenção, sendo o rendimento alto ao final da síntese (quadro 1). Se considerarmos que a malária atinge, sobretudo, países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos que, portanto, dispõem de recursos escassos para serem investidos na compra de medicamentos antimaláricos, moléculas de baixo custo e alto rendimento devem se tornar o foco para futuras pesquisas.

6.2 Atividade Citotóxica dos derivados quinolínicos sobre células HeLa e linfócitos humanos.

Para a avaliação da citotoxicidade em células de mamíferos, foram escolhidas células HeLa e linfócitos humanos. Diante dos resultados obtidos pode-se inferir que os compostos estudados em sua grande maioria não foram citotóxicos para HeLa e para células de mamíferos (tabela 2).

Dentre os 10 compostos estudados, 7 apresentaram valores de CC_{50} superiores a 100 $\mu\text{g/mL}$, variando de 109 a 359 $\mu\text{g/mL}$.

A fim de se determinar compostos com ação antimalárica mais seletiva, foram analisados comparativamente os resultados alcançados dos valores de CI_{50} em *P. falciparum* e CC_{50} em HeLa, determinando o Índice de Seletividade (IS). Os compostos que apresentaram um índice maior ou igual a 10, não foram considerados tóxicos para uso humano, baseado no estudo realizado por WENINGER e colaboradores (2001).

Neste aspecto, os resultados mostram que as moléculas estudadas foram altamente seletivas para *P. falciparum* em relação à HeLa, com exceção das RMP103 e RMP107, que apresentaram índice de seletividade inferior a 10.

Dentre a série testada, o composto RMP 105, mais ativo em *P. falciparum*, também foi o mais seletivo ($IS > 1800$), reforçando sua ação contra alvos específicos do parasito (GEMMA et al., 2012). Os compostos RMP109, RMP112 e RMP113 apresentaram IS que variaram de 47,44 a 84,94, reforçando sua ação antimalárica seletiva.

De um modo geral, as moléculas testadas foram altamente seletivas, destacando-se RMP099 e RMP105, com IS superiores a 100, ou seja, estes compostos tendem a ser cem vezes mais tóxicos para o parasito que para as células humanas, o que contrasta com a maioria das drogas derivadas de quinolina, que apresentam baixo índice terapêutico (ACHAN et al, 2011).

Este trabalho reforça a importância do desenvolvimento de moléculas híbridas como potenciais candidatas a antimaláricos. Estes compostos foram sintetizados utilizando-se metodologias simples com rendimentos variando entre 62% a 86%. A grande maioria dos compostos foram ativos e seletivos contra *P. falciparum*, configurando-se como uma classe promissora de compostos com ação antimalárica.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo nos permitem concluir que:

- 1) Todas as moléculas testadas mostram baixa citotoxicidade para células HeLa e PBMC;
- 2) A exceção de RMP107, todas as demais moléculas avaliadas demonstram atividade antimalárica *in vitro* contra *P. falciparum* (cepa 3D7-cloroquina sensível) destacando-se RMP105, cujo CI_{50} foi similar ao observado para a droga de referência (cloroquina);
- 3) A exceção de RMP103 e RMP107, todas as demais foram altamente seletiva para *P. falciparum* ($IS > 10$), destacando-se RMP105 ($IS > 1800$);
- 4) As curvas de dose resposta sugerem que a atividade antimalárica observada é dose-dependente;
- 5) Pode-se inferir, pelos dados obtidos, que as moléculas testadas sobretudo aquelas contendo o grupo hidrazina em sua estrutura, são moléculas altamente promissoras a integrar medicamentos que auxiliem no combate à malária, pois apresentam alta atividade antimalárica e baixo potencial tóxico. Outros estudos são necessários, no entanto, para avaliar a efetividade das mesmas em cepas de *P. falciparum* cloroquina resistente, bem como testes de toxicidade em outras células humanas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ACHAN, J.; TALISUNA, A. O.; ERHART, A.; YEKA, A.; TIBENDERANA, J. K.; BALIRAINÉ, F. N.; ROSENTHAL, P. J.; D'ALESSANDRO, U. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. **Malaria Journal**, v. 10, p. 144, 2011.

AMINO, R.; THIBERGE, S.; SHORTE, S.; FRISCHKNECHT, F.; MÉNARD, R. Quantitative imaging of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. **Comptes Rendus Biologies**, v. 329, p. 858-862, 2006.

ARNOT, D. Unstable malaria in Sudan: the influence of the dry season. Clone multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections in individuals exposed to variable levels of disease transmission. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, p. 580-585, 1998.

ATAMNA, H.; GINSBURG, H. Heme degradation in the presence of glutathione. A proposed mechanism to account for the high levels of non-heme iron found in the membranes of hemoglobinopathic red bloods cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 24876-24883, 1995.

AWASTHI, G.; SATYA, G. B.; DAS, A. Pfcrt haplotypes and the evolutionary history of chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 129-134, 2012.

AYUKO, T. A.; NJAU, R. N.; CORNELIUS, W.; LEAH, N.; NDIEGE, I. O. *In vitro* antiplasmodial activity and toxicity assessment of plant extracts used in traditional malaria therapy in the Lake Victoria Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 689-694, 2009.

BABIKER, A.; WALLIKER, D. Current views on the population structure of *Plasmodium falciparum*: implications for control. **Parasitology Today**, v. 13, p. 262-267, 1997.

BARREIRO, E. J.; SILVA, J. F. M.; FRAGA, C. A. M. Noções Básicas do Metabolismo de Fármacos. **Química Nova**, p. 6, 1996.

BAGAVAN, A.; RAHUMAN, A. A.; KAMARAJ, C.; KAUSHIK, N. K.; MOHANAKRISHNAN, D.; SAHAL, D. Antiplasmodial activity of botanical extracts against *Plasmodium falciparum*. **Parasitology Research**, 2010.

BAIRD, J. K. Resistance to therapies for infection by *Plasmodium vivax*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, p. 508-534, 2009.

BELLOT, F.; COSLEDAN, F.; VENDIER, L.; BROCARD, J.; MEUNIER, B.; ROBERT, A. Trioxaferroquinas as New Hybrid Antimalarial Drugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 4103–4109, 2010.

BÉZIVIN, C.; TOMASI, S.; LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT, F.; BOUSTIE, J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**, v. 10, p. 499-503, 2003.

BIAGINI, G. A.; FISHER, N.; SHONE, A. E.; MUBARAKI, M. A.; SRIVASTAVA, A.; HILL, A.; ANTOINE, T.; WARMAN, A. J.; DAVIES, J.; PIDATHALA, C.; AMEWU, R. K.; LEUNG, S. C.; SHARMA, R.; GIBBONS, P.; HONG, D. W.; PACOREL, B.; LAWRENSON, A. S.; CHAROENSUTTHIVARAKUL, S.; TAYLOR, L.; BERGER, O.; MBEKEANI, A.; STOCKS, P. A.; NIXON, G. L.; CHADWICK, J.; HEMINGWAY, J.; DELVES, M. J.; SINDEN, R. E.; ZEEMAN, A. M.; KOCKEN, C.H.; BERRY, N.G.; O'NEILL, P.M.; WARD, S. A. Generation of quinolone antimalarials targeting the *Plasmodium falciparum* mitochondrial respiratory chain for the treatment and prophylaxis of malaria. **Proceedings of the National Academy Sciences U S A**, v. 109, p. 8298-8303, 2012.

BOELONI, J. N.; OCARINO, N. M.; GOES, A. M.; SERAKIDES, R. Triiodotironina não aumenta a diferenciação osteogênica reduzida pela idade de células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 57, 2013 .

BRAS, J. L.; DURAND, R. The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. **Fundamental and Clinical Pharmacology** v. 17, p. 147–153, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de terapêutica da malária. **Brasília: Ministério da Saúde, 2001.**

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária PNCM / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Brasília: Ministério da Saúde, 2003.**

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia prático de tratamento da malária no Brasil / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Brasília: Ministério da Saúde, 2010.**

BRAY, P. G.; JANNEH, O.; RAYNES, K. J.; MUNGTHIN, M.; GINSBURG, H.; WARD, S. A. Cellular uptake of chloroquine is dependent on binding to ferriprotoporphyrin IX and is independent of NHE activity in *Plasmodium falciparum*. **Journal of Cell Biology, v. 145, p. 363-376, 1999.**

BREGA, S.; MESLIN, B.; DE MONBRISON, F.; SEVERINI, C.; GRADONI, L.; UDOMSANGPETCH, R.; SUTANTO, I.; PEYRON, F.; PICOT, S. Identification of the *Plasmodium vivax* mdr-like gene (pvmdr1) and analysis of single-nucleotide polymorphisms among isolates from different areas of endemicity. **Journal of Infectious Diseases, v. 191, p. 272-277, 2005.**

BUTLER, A. R.; KHAN, S.; FERGUSON, E. A brief history of malaria chemotherapy. **The Journal of Royal College of Physicians Edinburgh, v. 40, p. 172-177, 2010.**

CAMACHO, P. Malaria parasites solve the problem of a low calcium environment. **Journal Cell Biology, v. 161, p. 17-19, 2003.**

CHIYANZU, I. CLARCKSON, C., SMITH, P. J., LEHMAN, J., GUT, J., ROSENTHAL, P. J., CHIDALE, K. Design, synthesis and anti-plasmodial evaluation in vitro of new 4-aminoquinoline isatin derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry, v. 13, p. 3249-3261, 2005.**

COIMBRA, E. S.; DA SILVA, A. D.; DIAS, R. M. P.; CORRALES, R. C. N. R.; BISPO, M. L. F.; KAISER, C. R.; DE SOUZA, M. V. N. Amodiaquine analogs. Synthesis and anti-leishmanial activity. **Mediterranean Journal of Chemistry, v. 3, p. 106-113, 2011.**

COSTANZO, M. S., HARTL, D. L. The evolutionary landscape of antifolate resistance in *Plasmodium falciparum*. **Journal of Genetic, v.90, p. 187-190, 2011.**

COX-SINGH, J.; SINGH, B. Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance? **Trends in Parasitology, v. 24, p. 406-410, 2008.**

DAHLSTROM, S.; FERREIRA, P. E.; VEIGA, M. I.; SEDIGHI, N.; WIKLUND, L.; MÅRTENSSON, A.; FÄRNERT, A.; SISOWATH, C.; OSÓRIO, L.; DARBAN, H.; ANDERSSON, B.; KANEKO, A.; CONSEIL, G.; BJÖRKMAN, A.; GIL, J. P. *Plasmodium falciparum* multidrug resistance protein 1 and artemisinin-based combination therapy in Africa. **Journal of Infectious Disease**, v. 200, p. 1456-1464, 2009.

DONDORP, A. M.; NOSTEN, F.; YI, P.; DAS, D.; PHYO, A. P.; TARNING, J.; LWIN, K. M.; ARIEY, F.; HANPITHAKPONG, W.; LEE, S. J.; RINGWALD, P.; SILAMUT, K.; IMWONG, M.; CHOTIVANICH, K.; LIM, P.; HERDMAN, T.; AN, S. S.; YEUNG, S.; SINGHASIVANON, P.; DAY, N. P. J.; LINDEGARDH, N.; SOCHEAT, D.; WHITE, N. J. Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, p. 455-467, 2009.

DURASINGH, M. T.; COWMAN, A. F. Contribution of the pfmdr1 gene to antimalarial drug-resistance. **Acta Tropica**, v. 94, p. 181-190, 2005.

ECKSTEIN-LUDWIG, U.; WEBB, R. J.; VAN GOETHEM, I. D.; EAST, J. M.; LEE, A. G.; KIMURA, M.; O'NEILL, P. M.; BRAY, P. G.; WARD, S. A.; KRISHNA, S. *Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 424, p. 957-961, 2003.

FERREIRA, M. U.; SILVA-NUNES, M. Evidence-based public health and prospects for malaria control in Brazil. Malaria control in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 4, p. 533-545, 2010.

FIDOCK, D. A.; NOMURA, T.; TALLEY, A. K.; COOPER, R. A.; DZEKUNOV, S.M.; FERDIG, M. T.; URSOS, L. M.; SIDHU, A. B.; NAUDÉ, B.; DEITSCH, K. W.; SU, X. Z.; WOOTTON, J. C.; ROEPE, P. D.; WELLEMS, T. E. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. **Molecular Cell**, v. 6, p. 861-871, 2000.

FITCH, C. D. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. **Life Sciences**, v. 74, p. 1957-1972, 2004.

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: Aspectos Históricos e Quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, p. 1271-1278, 2008.

FREITAS, L. F.; CHAVES, G. C.; WANNMACHER, L. G. S. Malária não complicada por *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* no Brasil: evidências sobre fármacos isolados e associações medicamentosas empregados em esquemas terapêuticos

recomendados pelo protocolo terapêutico oficial. **Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 23, p. 2285-2294, 2007.**

GAMA, B. E.; OLIVEIRA, N. K.; SOUZA, J. M.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; FERREIRA-DA-CRUZ, M. F. Characterisation of *pvm*dr1 and *pvdhfr* genes associated with chemoresistance in Brazilian *Plasmodium vivax* isolates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104, p. 1009-1011, 2009.**

GARAVELLI, P. L.; CORTI, E. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*: the first case in Brazil. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 86, p. 128, 1992.**

GEMMA, S.; GIOVANI, S.; BRINDISI, M.; TRIPALDI, P.; BROGI, S.; SAVINI, L.; FIORINI, I.; NOVELLINO, E.; BUTINI, S.; CAMPIONI, G.; PENZO, M.; MICHAEL J.; BLACKMAN, M. J. Quinolylhydrazones as novel inhibitors of *Plasmodium falciparum* serine protease PfSUB1. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, v. 22, p. 5317–5321, 2012.**

GINSBURG, H.; WARD, S. A.; BRAY, P. G. Integrated Model of Chloroquine Action. **Parasitology Today, v. 15, p. 357-360, 1999.**

GOODYER, I. D.; POUVELLE, B.; SCHNEIDER, T. G.; TRELKA, D. P.; TARASCHI, T. F. Characterization of macromolecular transport pathways in malaria-infected erythrocytes. **Molecular and Biochemical Parasitology, v. 87, p. 13-28, 1997.**

HAY, S. I.; GUERRA, C. A.; TATEM, A. J.; ATKINSON, P. M.; SNOW, R. W. Urbanization, malaria transmission and disease burden in Africa. **Nature Reviews, v. 3, p. 81-90, 2005.**

HAY, S. I.; GUERRA, C. A.; TATEM, A. J.; NOOR, A. M.; SNOW, R. W. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. **Lancet, v. 4, p. 327-336, 2004.**

HOMEWOOD, C. A.; WARHURST, D. C.; PETERS, W.; BAGGALEY, V. C. Lysosomes, pH and the anti-malarial action of chloroquine. **Nature, v. 235, p. 50-52, 1972.**

HONG, Y. L.; YANG, Y. Z.; MESHNICK, S. R. The interaction of artemisinin, with malarial hemozoin. **Molecular and Biochemical Parasitology, v. 63, p.121-128, 1994.**

HOPPE, H. C.; VAN SCHALKWYK, D. A.; WIEHART, U. I.; MEREDITH, S. A.; EGAN, J.; WEBER, B. W. Antimalarial quinolines and artemisinin inhibit endocytosis in *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 2370-2378, 2004.

HOTTA, C. T.; GAZARINI, M. L.; BERALDO, F. H.; VAROTTI, F. P.; LOPES, C.; MARKUS, R. P.; POZZAN, T.; GARCIA, C. R. Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites. **Nature Cell Biology**, v. 2, p. 466-468, 2000.

JOHNSON, J. D.; DENNULL, R. A.; GERENA, L.; LOPEZ-SANCHEZ, M.; RONCAL, N. E.; WATERS, N. C. Assessment and continued validation of the malaria SYBR green I-based fluorescence assay for use in malaria drug screening. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, p. 1926-1933, 2007.

KARL, S.; WONG, R. P.; ST PIERRE, T. G.; DAVIS, T. M. A comparative study of a flow-cytometry-based assessment of *in vitro Plasmodium falciparum* drug sensitivity. **Malaria Journal**, v. 8, p. 294, 2009.

KITCHENER, S.; NASVELD, P.; EDSTEIN, M. D. Tafenoquine for the treatment of recurrent *Plasmodium vivax* malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.76, p. 494-496, 2007.

KLONIS, N.; CRESPO-ORTIZ, M. P.; BOTTOVA, I.; ABU-BAKAR, N.; KENNY, S.; ROSENTHAL, P. J.; TILLEY, L. Artemisinin activity against *Plasmodium falciparum* requires hemoglobin uptake and digestion. **Proceeding of the National Academy Science U S A**, v. 108, p. 11405-11410, 2011.

KOUZNETSOV, V. V.; GÓMEZ-BARRIO, A. Recent developments in the design and synthesis of hybrid molecules based on aminoquinoline ring and their antiplasmodial evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 3091-3113, 2009.

KUHN, Y.; SANCHEZ, C. P.; AYOUB, D.; SARIDAKI, T.; VAN DORSSELAER, A.; LANZER, M. Trafficking of the phosphoprotein PfCRT to the digestive vacuolar membrane in *Plasmodium falciparum*. **Traffic**, v. 11, p. 236-249, 2010.

KUMAR, A.; VALECHA, N.; JAIN, T.; DASH, A. P. Burden of Malaria in India: Retrospective and Prospective View. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, p. 69-78, 2007.

KUMAR, N.; KHAN, S. I.; RAJALAKSHMI, P.; KUMARADHAS C; RAWAT, D. S. Synthesis, antimalarial activity and cytotoxicity of substituted 3,6-diphenyl-[1,2,4,5]tetraoxanes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 5632-5638, 2009.

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronizatiion of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **Journal of parasitology**, v. 65, p. 418-420, 1979.

LI, J.; ZHOU, B. Biological actions of artemisinin: insights from medicinal chemistry studies. **Molecules**, v. 15, p. 1378-1397, 2010.

LOMBARD, M.C; N'DA, D. D.; BREYTENBACH, J. C.; SMITH, P. J.; LATEGAN, C. A. Artemisinin–quinoline hybrid-dimers: Synthesis and in vitro antiplasmodial activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 6975-6977, 2010.

MACHADO, R. L.; POVOA, M. M.; CALVOSA, V. S.; FERREIRA, M. U.; ROSSIT, A. R.; DOS SANTOS, E. J.; CONWAY, D. J. Genetic structure of *Plasmodium falciparum* populations in the Brazilian Amazon region. **Journal of Infectious Disease**, v. 190, p. 1547-1555, 2004.

MANOHAR, S.; RAJESH, U. C.; KHAN, S. I.; TEKWANI, B. L.; RAWAT, D. S. Novel 4-Aminoquinoline-Pyrimidine Based Hybrids with Improved in Vitro and in Vivo Antimalarial Activity. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v.3. p. 555-559, 2012.

MARQUES, A. C. Migration and the Dissemination of Malaria in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, Suppl. II, p. 17-30,1986.

MESHNICK, S. R. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. **Int. Journal of Parasitology**, v. 32, p. 1655-1660, 2002.

MHARAKURWA, S.; KUMWENDA, T.; MKULAMA, M. A.; MUSAPA, M.; CHISHIMBA, S.; SHIFF, C. J.; SULLIVAN, D. J.; THUMA, P. E.; LIU, K.; AGRE, P. Malaria antifolate resistance with contrasting *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase (DHFR) polymorphisms in humans and Anopheles mosquitoes. **Proceeding of National Academy Science U S A**, v. 108, p. 18796-18801, 2011.

MOORE, D. V.; LANIER, J. E. Observations on two *Plasmodium falciparum* infections with na abnormal response to chloroquine. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.10, p. 5-9, 1961.

MORAIS, S. A.; URBINATTI, P. R.; SALLUM, M. A. M.; KUNIY, A. A.; MORESCO, G. G.; FERNANDES, A.; NAGAKI, S. S.; NATAL, D. Brazilian Mosquito (DIPTERA: CULICIDAE) Fauna. I. Anopheles Species from Porto Velho, Rondônia State, Western Amazon, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, p. 331-335, 2012.

MORPHY, R., RANKOVIC, Z. Designed Multiple Ligands. An Emerging Drug Discovery Paradigm. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.48, p. 6523-6541, 2005.

MÜLLER-SCHIFFMANN, A.; HEINRICH-STICHT. H.; KORTH, C. Hybrid Compounds-From Simple Combinations to Nanomachine. **Biodrugs**, v.26, p. 21-31, 2012.

MUREGI, F. W.; ISHIH, A. Next-Generation Antimalarial Drugs: Hybrid Molecules as a New Strategy in Drug Design. **Drug Development Research**, v. 71, p. 20-32, 2010.

MURPHY, G. S.; BASRI, H.; ANDERSEN, E. M.; BANGS, M. J.; MOUNT, D. L.; GORDEN, J.; LAL, A. A.; PURWOKUSUMO, A. R.; HARJOSUWARNO, S. Vivax malaria resistant to treatment and prophylaxis with chloroquine. **Lancet**, v. 341, p. 96-100, 1993.

NDIAYE, D.; PATEL, V.; DEMAS, A.; LEROUX, M.; NDIR, O.; MBOUP, S.; CLARDY, J.; LAKSHMANAN, V.; DAILY, J. P.; WIRTH, D. F. A non-radioactive DAPI-based high-throughput in vitro assay to assess *Plasmodium falciparum* responsiveness to antimalarials-increased sensitivity of *P. falciparum* to chloroquine in Senegal. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, p. 228-230, 2010.

NOEDL, H.; FAIZ, M. A.; YUNUS, E. B.; RAHMAN, M. R.; HOSSAIN, M. A.; SAMAD, R.; MILLER, R. S.; PANG, L. W.; WONGSRICHANALAI, C. Drug-resistant malaria in Bangladesh: an in vitro assessment. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, p. 140-142, 2003.

NOMURA, T.; CARLTON, J. M.; BAIRD, J. K.; DEL PORTILLO, H. A.; FRYAUFF, D. J.; RATHORE, D.; FIDOCK, D. A.; SU, X.; COLLINS, W. E.; MCCUTCHAN, T. F.; WOOTTON, J. C.; WELLEMS, T. E. Evidence for different mechanisms of chloroquine resistance in 2 *Plasmodium* species that cause human malaria. **Journal of Infectious Disease**, v. 183, p.1653-1661, 2001.

NOSTEN, F.; WHITE, N.J. Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria. **The American Journal of tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, p. 181-192, 2007.

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

OLLIARO, P. L.; YUTHAVONG, Y. An Overview of Chemotherapeutic Targets for Antimalarial Drug Discovery. **Pharmacology Therapeutics**, v. 81, p. 91-110, 1999.

ONG, C. W. M.; LEE, S. Y.; KOH, W. H.; OOI, E.-E.; TAMBYAH, P. A. Case Report: Monkey Malaria in Humans: A Diagnostic Dilemma with Conflicting Laboratory Data. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, p. 927-928, 2009.

ORJUELA-SÁNCHEZ P.; DE SANTANA FILHO, F. S.; MACHADO-LIMA, A.; CHEHUAN, Y. F.; COSTA, M. R.; ALECRIM, M. D.; DEL PORTILLO, H. A. Analysis of single-nucleotide polymorphisms in the crt-o and mdr1 genes of *Plasmodium vivax* among chloroquine-resistant isolates from the Brazilian Amazon region. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 3561-3564, 2009.

P.A.H.O. Ravreda-AMI: Amazon Network for the Surveillance of Antimalarial Drug Resistance. **Ravreda**, 2010.

PIOLA, P.; NABASUMBA, C.; TURyakIRA, E.; DHORDA, M.; LINDEGARDH, N.; NYEHANGANE, D.; SNOUNOU, G.; ASHLEY, E. A.; MCGREADY, R.; NOSTEN, F.; GUERIN, P. J. Efficacy and safety of artemether–lumefantrine compared with quinine in pregnant women with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: an open-label, randomised, non-inferiority trial. **Lancet Infectious Disease**, v.10, p. 762-769, 2010.

PIPER, R.; LEBRAS, J.; WENTWORTH, L.; HUNT-COOKE, A.; HOUZÉ, S.; CHIODINI, P.; MAKLER, M. Immunocapture diagnostic assays for malaria using *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, p. 109-118, 1999.

RIECKMANN, K. H.; DAVIS, D. R.; HUTTON, D. C. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? **Lancet**, v. 2, p. 1183-4, 1989.

ROCHA, M. N. A.; FERREIRA, E. A. P.; SOUZA, J. M. Aspecto Histórico da Malária. **Revista Paraense de Medicina**, v. 20, 2006.

RODRIGUES, L. A.; HENRIQUES, G.; BORGES, S. T.; HUNT, P.; SANCHEZ C. P. Experimental Evolution of Resistance to Artemisinin Combination Therapy Results in Amplification of the *mdr1* Gene in a Rodent Malaria Parasite. **Plos One**, v. 5, p. e11593, 2010.

RUSSELL, B.; CHALFEIN, F.; PRASETYORINI, B.; KENANGALEM, E.; PIERA, K.; SUWANARUSK, R.; BROCKMAN, A.; PRAYOGA, P.; SUGIARTO, P.; CHENG, Q.; TJITRA, E.; ANSTEY, N. M.; PRICE, R. N. Determinants of *in vitro* drug susceptibility testing of *Plasmodium vivax*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 52, p. 1040-1045, 2008.

SÁ, J. M.; NOMURA, T.; NEVES, J. D.; BAIRD, J. K.; WELLEMS, T. E.; DEL PORTILLO, H. A. *Plasmodium vivax*: allele variants of the *mdr1* gene do not associate with chloroquine resistance among isolates from Brazil, Papua, and monkey-adapted strains. **Experimental Parasitology**, v. 109, p. 256-259, 2005.

SANCHEZ, C. P.; ROTMANN, A.; STEIN, W. D.; LANZER, M. Polymorphisms within PfMDR1 alter the substrate specificity for anti-malarial drugs in *Plasmodium falciparum*. **Molecular Microbiology**, v. 70, p. 786-798, 2008.

SANCHEZ, C. P.; DAVE, A.; STEIN, W. D.; LANZER, M. Transporters as mediators of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 1109-1118, 2010.

SCHUMANN, R. R. Malarial fever: hemozoin is involved but Toll-free. **Proceeding Natural Academic Sciences USA**, v. 104, p.1743-1744, 2007.

SIBLEY, C. H.; HYDE, J. E.; SIMS, P. F.; PLOWE, C. V.; KUBLIN, J. G.; MBERU, E. K.; COWMAN, A. F.; WINSTANLEY, P. A.; WATKINS, W. M.; NZILA, A. M. *Pyrimethamine-sulfadoxine* resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? **Trends in Parasitology**, v. 17, p. 582-588, 2001.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v.27, p. 308-312, 2004.

SOWUNMI, A.; ADEDEJI, A. A.; GBOTOSHO, G. O.; FATEYE, B. A.; HAPPI, T. C. Effects of pyrimethamine-sulphadoxine, chloroquine plus chlorpheniramine, and amodiaquine plus pyrimethamine-sulphadoxine on gametocytes during and after treatment of acute, uncomplicated malaria in children. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 887-893, 2006.

STURM, A.; AMINO, R.; SAND, C. V.; RETZLAFF, S.; RENNENBERG, A.; KRUEGER, A.; POLLOK, M.; MÉNARD, R.; HEUSSLER, V. T. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. **Science**, v. 313, p. 1287, 2006.

SUGIOKA, K.; SHIOMOSEGAWA, Y.; NAKANO, M. Estrogens as natural antioxidants of membrane phospholipid peroxidation. **FEBS Letters**, v. 210, p. 37-39, 1987.

SULLIVAN, D. J. Theories on malarial pigment formation and quinoline action. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1645-1653, 2002.

TALISUNA, A. O.; BLOLAND, P.; D'ALESSANDRO, U. History, Dynamics, and Public Health Importance of Malaria Parasite Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 235-254, 2004.

TILLEY, L.; BRAY, P.G.; DAVIS, T. M. E. Prospects for the treatment of drug-resistant malaria parasites. **Future Microbiology**, p. 127, 2006.

TRIGLIA, T.; WANG, P.; SIMS, P. F.; HYDE, J. E.; COWMAN, A. F. Allelic exchange at the endogenous genomic locus in *Plasmodium falciparum* proves the role of dihydropteroate synthase in sulfadoxine-resistant malaria. **The Embo Journal**, v. 17, p. 3807-3815, 1998.

VALDERRAMOS, S. G.; FIDOCK, D. A. Transporters involved in resistance to antimalarial drugs. **Trends Pharmacol Science**, v. 27, p. 594-601, 2006.

VALDERRAMOS, S. G.; VALDERRAMOS, J. C.; MUSSET, L.; PURCELL, L. A.; MERCEREAU-PUIJALON, O.; LEGRAND, E.; FIDOCK, D. A. Identification of a mutant PfCRT-mediated chloroquine tolerance phenotype in *Plasmodium falciparum*. **Plos Pathogens**, v. 6, p. e1000887, 2010.

VIJAYKADGA, S.; ROJANAWATSIRIVEJ, C.; CHOLPOL, S.; PHOUNGMANEE, D.; NAKAVEJ, A.; WONGSRICHANALAI, C. In vivo sensitivity monitoring of mefloquine monotherapy and artesunate-mefloquine combinations for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Thailand in 2003. **Tropical Medicine and International Health**, v. 11, p. 211-219, 2006.

VOLK, C. A.; KOOK, M. Viscosamine: The First Naturally Occurring Trimeric 3-Alkyl Pyridinium Alkaloid. **American Chemical Society**, v. 5, p. 3567-3569, 2003.

WALSH, J. J.; BELL, A. Hybrid Drugs for Malaria. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, p. 2970-2985, 2009.

WANG, J.; HUANG, L.; LI, J.; FAN, Q.; LONG, Y.; LI, Y.; ZHOU, B. Artemisinin directly targets malarial mitochondria through its specific mitochondrial activation. **Plos One**, v. 5, p. e9582, 2010.

WATKINS, W. M.; MOSOBO, M. Treatment of *Plasmodium falciparum* malaria with pyrimethamine-sulfadoxine: selective pressure for resistance is a function of long elimination half-life. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, p. 75-78, 1993.

WENIGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G. J.; DEHARO, E.; ARAGO, R.; MUÑOZ, V.; CALLAPA, G.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 193-200, 2001.

WELLEMS, T. E.; HAYTON, K.; FAIRHURST, R. M. The impact of malaria parasitism: from corpuscles to communities. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, p. 2496-505, 2009.

WELLS, T. N.; ALONSO, P. L.; GUTTERIDGE, W. E. New medicines to improve control and contribute to the eradication of malaria. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, p. 879-91, 2009.

WELLS, T. N. C.; BURROWS, J. N.; BAIRD, J. K. Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. **Trends in Parasitology**, v. 26, p. 145-151, 2010.

WHITE, N. J. Delaying antimalarial drug resistance with combination chemotherapy. **Parasitologia**, v. 41, p. 301-308, 1999.

WHITE, N. J. *Plasmodium knowlesi*: The Fifth Human Malaria Parasite. **Clinical and Infectious Disease**, v. 46, p. 172-173, 2008.

WITKOWSKI, B.; LELIÈVRE, J.; NICOLAU-TRAVERS, M. L.; IRIART, X.; NJOMNANG, S. P.; BOUSEJRA-ELGARAH, F.; MEUNIER, B.; BERRY, A.; BENOIT-VICAL, F. Evidence for the contribution of the hemozoin synthesis pathway of the murine *Plasmodium yoelii* to the resistance to artemisinin-related drugs. **Plos One**, v. 7, p. e32620, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2010a.**

_____. Guidelines for the treatment of malaria -- 2nd edition. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2010b.**

_____. Global Strategic Plan. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2005.**

_____. World Malaria Report: 2010. Who Global Malaria Programme. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2010c.**

_____. World Malaria Report: 2011. Who Global Malaria Programme. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2011.**

_____. World Malaria Report: 2011. Who Global Malaria Programme. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2012.**

WU, W.-M.; YAO, Z.-J.; WU, Y.-L.; JIANG, K.; WANG, Y.-F.; CEHN, H.-B.; SHAN, F.; LI, Y. Ferrous ion induced cleavage of the peroxy bond in qinghaosu and its derivatives and the DNA damage associated with this process. **Chemical Communications, v. 18, p. 2213-2214, 1996**

YAMAUCHI, L. M.; COPPI, A.; SNOUNOU, G.; SINNIS, P. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. **Cellular Microbiology, v. 9, p. 1215–1222, 2007.**

ZISHIRI, V. K.; HUNTER, R.; SMITH, P. J.; TAYLOR, D.; SUMMERS, R.; KIRK, K.; MARTIN, R. E.; EGAN, T. J. A series of structurally simple chloroquine chemosensitizing dibemethin derivatives that inhibit chloroquine transport by PfCRT. **European Journal of Medicinal Chemistry, v. 46, p. 1729e1742, 2011.**