Desirée Cigaran Schuck

**“Novos compostos sintéticos com ação no ciclo de vida
de parasitas da malária humana, *Plasmodium falciparum*”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2013

Desirée Cigaran Schuck

**“Novos compostos sintéticos com ação no ciclo de vida
de parasitas da malária humana, *Plasmodium falciparum*”**

Tese apresentada ao Departamento de
Parasitologia no Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação
Patógeno-hospedeiro

Orientadora: Prof^{ra}. Dr^a. Célia Regina da Silva
Garcia

Versão Original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Schuck, Desirée Cigaran.

Novos compostos sintéticos com ação no ciclo de vida de parasitas da malária humana, *Plasmodium falciparum* / Desirée Cigaran Schuck. – São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Célia Regina da Silva Garcia.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Biologia celular de plasmódios.

Versão do título para o inglês: New synthetic compounds with action on the life cycle of the human parasites *Plasmodium falciparum*.

1. Malária 2. *Plasmodium falciparum* 3. Melatonina 4. Indols
5. Hidroxinaftoquinonas 6. Citometria de fluxo I. Garcia, Profa. Dra. Célia Regina da Silva II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB015/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Desirée Cigaran Schuck.

Título da Tese: Novos compostos sintéticos com ação no ciclo de vida de parasitas da malária humana, *Plasmodium falciparum*.

Orientador(a): Profa. Dra. Célia Regina da Silva Garcia.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEPSH. 032.11

PMAZ/mcgn

São Paulo, 29 de março de 2011.

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 113ª reunião realizada em 23.03.11, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Avaliação de novos análogos da atavacona como potenciais antimaláricos*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi considerado *isento por não existir manipulação diretamente com seres humanos*.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO M.A ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilma Sra.
DESIREE CIGARAN SCHUCK
Departamento de Parasitologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **019** nas fls. **099** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Célia Regina da Silva Garcia**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*Avaliação de novos análogos da atavacona como potenciais antimaláricos*" do qual participam o(s) alunos **Disirée Cigaran Schuck**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **03.05.2011**, com validade de **3 anos**.

São Paulo, 10 de maio de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Ao meu marido Rafael pelo apoio, compreensão e amor.

Aos meus pais pela confiança e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

O trabalho desta tese só foi possível de ser realizado pois contou com o apoio fundamental de diversas pessoas, assim sendo, não posso deixar de agradecer:

A professora Célia Garcia por ter me aceito em seu laboratório e contribuído para o meu crescimento científico-profissional.

Aos colaboradores: Prof. Dr. Vitor Ferreira da Universidade Federal Fluminense pela colaboração na síntese dos compostos usados nesta pesquisa, ao Prof. Dr. Alexander Henning Ulrich pela colaboração no desenvolvimento do trabalho de citometria de fluxo e a Prof. Dra. Regina do Império Lima pelas sugestões e doação de *P. berghei* ANKA GFP usado nesta tese.

A Dra. Miriam Moraes pela amizade, dedicação e disposição de sempre estar pronta a ajudar. A Dra. Myna Nakabashi pelo apoio e suporte ao longo da pesquisa. A Dra. Laura Cruz pela colaboração, amizade e apoio. Ao Dr. Julio Garcia pela amizade e companheirismo.

Aos colegas de laboratório que contribuíram com amizade e conhecimento. Especialmente meus colegas: Dra. Fernanda Koyama, Alexandre Budu, Ma. Ramira Ribeiro, Dra. Wânia Lima, Lucas Borges, Eduardo Alves e Bruno da Cunha que estiveram comigo desde o princípio da pesquisa.

A querida Silvia Camargo por sempre estar pronta a ajudar e ouvir.

A FAPESP, CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

Ao hospital do servido público pelo fornecimento de sangue e plasma utilizados na manutenção da cultura de *Plasmodium falciparum*.

RESUMO

SCHUCK, D. C. **Novos compostos sintéticos com ação no ciclo de vida de parasitas de malária humana, *Plasmodium falciparum*** 2013 147 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2013.

Apesar dos esforços mundiais a malária ainda é uma doença com altas taxas de morbidade e mortalidade. Vários estudos demonstram o aumento da resistência aos antimaláricos mais utilizados. O emprego de novas metodologias que possibilitem a análise facilitada do efeito de compostos sintéticos ou naturais no ciclo do *Plasmodium* é um passo importante no processo de desenvolvimento de novos fármacos. Nesta tese, padronizamos o uso da citometria de fluxo utilizando marcador de DNA, que possibilita não somente avaliar a parasitemia dos eritrócitos cultivados *in vivo*, mas também determinar o estágio de desenvolvimento intraeritrocítico do *Plasmodium*. Trabalhos anteriores do nosso grupo mostraram a importância da melatonina e seus derivados naturais no ciclo celular do *Plasmodium*. Nesta tese investigamos a capacidade de moléculas sintéticas relacionadas a melatonina e a triptamina, modularem o ciclo de vida do *Plasmodium*. Avaliamos o efeito desses compostos no ciclo celular de *P. falciparum* e também mostramos que essa classe de compostos pode apresentar ação antimalárica significativa. Dentre as alterações realizadas, a presença do radical metoxi no anel indólico e a lipofilicidade dos compostos mostraram-se características importantes. Outra classe de compostos, as hidroxinaftoquinonas, vem ganhando importância com o aparecimento de resistência à drogas clássicas contra a malária. Nessa tese testamos 5 novas hidroxinaftoquinonas sintéticas em cultura *in vivo* de *P. falciparum* 3D7. Todas as drogas apresentaram atividade antimalárica, porém, dentre elas N3 destacou-se por apresentar uma atividade antimalárica na faixa nanomolar. Investigamos o mecanismo de ação de N3 e concluímos que este é capaz de inibir o potencial de membrana mitocondrial do parasita, de forma similar a outras hidroxinaftoquinonas. O potencial citotóxico de N3 em células de mamíferos HEK293 foi avaliado e o composto não mostrou toxicidade significativa. Em modelo de infecção murina utilizando *P. berghei* (ANKA GFP) testamos diferentes concentrações do composto (20, 10, 5 e 0,5 mg/Kg animal/dia). Após 4 dias de tratamento a parasitemia foi avaliada e a sobrevivência acompanhada por 30 dias. N3 não foi capaz de curar os animais infectados, apesar da inicial redução da parasitemia no quarto dia após a infecção. Nessa tese mostramos o uso da citometria de fluxo como uma ferramenta prática e poderosa na pesquisa em malária possibilitando a avaliação do ciclo do parasita. Além disso, avaliamos a importância de duas novas classes de compostos, indóis e hidroxinaftoquinonas, e mostramos a atividade de novas estruturas dessas classes que podem servir de base para o *design* de novas moléculas com atividade antimalárica.

Palavras chave: Malária. *Plasmodium falciparum*. Melatonina. Indóis. Naftoquinonas. Citometria de Fluxo.

ABSTRACT

SCHUCK, D. C. **New synthetic compounds with action on the life cycle of the human parasites *Plasmodium falciparum*** 2013 147 p. Thesis [Ph. D. thesis in Parasitology]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2012.

Despite the worldwide effort the malaria is still a devastating disease. Parasite resistance to classical antimalarials increases our need for the development of new drugs. In this study we have investigated the use of flow cytometry for analysis of *Plasmodium* DNA content, thus revealing parasitemia but also determine the intraerythrocytic developmental content (rings and trophozoites as well as shizonts as this form is multi-nucleated). Previous work from our group showed the importance of melatonin and its derivatives on *Plasmodium* cell cycle. In this thesis we have tested melatonin and synthetic related indoles molecules on *Plasmodium falciparum* cell cycle. We have evaluated the effect of these compounds on the cell cycle of *P. falciparum* and study has potential antimalarial activity. Another class of compounds, the hydroxynaphthoquinones was also studied in this thesis. We have tested 5 new synthetic hydroxynaphthoquinones on *in vivo* culture of *P. falciparum* 3D7. All hydroxynaphthoquinones showed antimalarial activity, but among them N3 showed an antimalarial activity in the nanomolar range. So we decided to investigate the mechanism of action of this compound which inhibit the parasite mitochondrial membrane potential. Therefore we examined the potential cytotoxicity of N3 on mammalian HEK293 cells and N3 showed no significant cytotoxic effect. Subsequently, we tested the compound N3 in murine infection model of *P. berghei*. We have tested different compound concentrations (20, 10, 5 and 0.5 mg / kg animal / day) at the 4th-day suppressive assay. After 4 days the parasitemia was assessed and the survival monitored for 30 days. N3 was not able to cure the infected animals, despite the initial reduction of parasitemia on 4th day post-infection. In this thesis we have demonstrated the use of flow cytometry as a useful and powerful tool in malaria research. Furthermore, we evaluated the importance of two new classes of compounds, indoles and hydroxynaphthoquinones, and show the activity of new structures of these classes that can serve as a basis for the design of new molecules with anti-malarial activity.

Key words: *Malária. Plasmodium falciparum. Melatonin. Signaling. Napthoquinones. Cytometry.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5HTP - 5-hidroxi triptofano

6-Bz-cAMP - adenosina 3',5' monofosfato cíclico N6-benzoil

8-OH-DPAT - 8-hidroxi-N-(di-n-propil)-aminotetralina

AC – adenilato ciclase

ADP – adenosina difosfato

AFMK - 1-acetil-N2-formil-5-methoxiquinuramina (N-acetyl-N-formyl-5-methoxykynuramine)

ANOVA – *analysis of variance*, análise de variância

ATP – adenosina trifosfato

cAMP – adenosina monofosfato cíclico

CCCP – *carboxicianeto m-clorofenilhidrazona*

EGTA – *ethylene glycol tetraacetic acid*

ER – retículo endoplasmático (*endoplasmatic reticulum*)

FCM- método de citometria de fluxo (flow cytometry method)

G6PD- glicose-6-fosfato-dehidrogenase

GPCR – receptor acoplado à proteína G (*G-protein coupled receptors*)

GTP – guanosina trifosfato

H89 – N-[2-(p-bromocinnamilamino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida dihidroclorida

HIOMT- hidroxindole-O-metiltransferase

IL-6- interleucina 6

InsP₃ – inositol 1,4,5-trifosfato

kDa – quilodalton (unidade de massa atômica)

LB – *Luria Bertani* meio de cultura

M – molar

Mel – melatonina

NAS - N-acetil serotonina

NAT - N-acetil transferase

OMS – organização mundial de saúde

PBS – solução salina tamponada com fosfato (*phosphate buffered saline*)

Pf – *Plasmodium falciparum*

PLC – fosfolipase C

PQ – proteína quinase

SERCA – *sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase*

TNF- fator de necrose tumoral (*tumoral necrose factor*)

UA – unidades arbitrárias

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição dos países com incidência da malária.	20
Figura 2- Distribuição dos casos confirmados de malária (por mil habitantes) no Brasil.	21
Figura 3- Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i> . Representação da fase hepática e intraeritrocítica do parasita no hospedeiro mamífero e fase sexual no hospedeiro anofilídeo.	26
Figura 4- Via de síntese do hormônio melatonina em mamíferos.	30
Figura 5- Via de sinalização proposta para o hormônio melatonina em <i>P. falciparum</i>	33
Figura 6- Estrutura química dos principais antimaláricos utilizados atualmente no tratamento da malária.	37
Figura 7- Esquema mostrando o processo de degradação da hemoglobina e formação da hemozoína (a). Em (b) a cloroquina forma um complexo com a Fe(III)Protoporfirina, impedindo a formação do cristal com moléculas de heme.	40
Figura 8- Mecanismo de ação proposto para a atovacona, que liga-se ao complexo citocromo bc1 rompendo a cadeia de elétrons o que leva a perda do potencial de membrana mitocondrial.	53
Figura 9- Padronização dos parâmetros de leitura do citômetro de fluxo. (A, B)	63
Figura 10- A) Dot Plot dos parâmetros SSC vs FL1-H de uma cultura acompanhada por 48 horas (B) Histogramas da FCM para a cultura	65
Figura 11- Esquema mostrando a síntese dos novos análogos da melatonina. R foi substituído por um radical metoxi (OMe) e R1 foi substituído por quatro diferentes radicais. ME representa a série baseada na estrutura da melatonina, TP representa a série baseada na estrutura da triptamina. A síntese foi realizada pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Vitor Ferreira, Universidade Federal Fluminense, Departamento de Química.	67
Figura 12- Ação de novos indóis sintetizados a partir da molécula da melatonina (ME) e triptamina (TP). Após incubação por 48 horas, a parasitemia foi medida por citometria de fluxo. Os dados representam a porcentagem de parasitemia em relação ao controle (tratamento com solvente). (*) One-way ANOVA (** p<0,001; **p<0,01; *p<0,05).	68
Figura 13- Ação de novos indóis sintetizados a partir da molécula da melatonina (ME) e triptamina (TP) (concentração de 500 nM) em conjunto com a molécula de melatonina (100 nM). Após incubação por 48 horas, a parasitemia foi medida por citometria de fluxo. Os dados representam a porcentagem de parasitemia em relação ao controle (solvente). (*) One-way ANOVA (** p<0,001; *p<0,05).	70
Figura 14- Curva sigmoidal dose-resposta com diferentes concentrações do composto ME02 após 48 horas de incubação em <i>P. falciparum</i> . Histogramas representando a citometria de fluxo das diferentes concentrações testadas, em azul amostra contendo o composto, em vermelho tracejado a população controle (solvente).	72
Figura 15- Curva sigmoidal dose-resposta com diferentes concentrações do composto ME02 após 48 horas de incubação em <i>P. falciparum</i> . Histogramas representando a citometria de fluxo das diferentes concentrações testadas, em azul amostra contendo o composto, em vermelho tracejado a população controle (solvente).	73
Figura 16- Curva sigmoidal dose-resposta com diferentes concentrações do composto ME02 após 48 horas de incubação em <i>P. falciparum</i> . Histogramas representando a citometria de fluxo das diferentes concentrações testadas, em azul amostra contendo o composto, em vermelho a população controle (solvente).	74

Figura 17- Esquema de síntese de novas hidroxinaftoquinonas a partir da molécula lausona.	75
Figura 18- Curva sigmoidal dose-resposta da atividade antimalárica do composto sintético N1. Histogramas representando a citometria de fluxo das diferentes concentrações testadas, em azul amostra contendo o composto, em vermelho tracejado a população controle (tratado com o solvente).....	77
Figura 19- Curva sigmoidal dose-resposta da atividade antimalárica do composto sintético N2. Histogramas representando a citometria de fluxo das diferentes concentrações testadas, em azul amostra contendo o composto, em vermelho tracejado a população controle (tratado com o solvente).....	78
Figura 20- Curva sigmoidal dose-resposta da atividade antimalárica do composto sintético N3. Histogramas representando a citometria de fluxo das diferentes concentrações testadas, em azul amostra contendo o composto, em vermelho tracejado a população controle (tratado com o solvente).....	79
Figura 21- Curva sigmoidal dose-resposta da atividade antimalárica do composto sintético N4. Histogramas representando a citometria de fluxo das diferentes concentrações testadas, em azul amostra contendo o composto, em vermelho tracejado a população controle (tratado com o solvente).....	80
Figura 22- Curva sigmoidal dose-resposta da atividade antimalárica do composto sintético N5. Histogramas representando a citometria de fluxo das diferentes concentrações testadas, em azul amostra contendo o composto, em vermelho tracejado a população controle (tratado com o solvente).....	81
Figura 23- Citometria de fluxo de <i>P. falciparum</i> marcado com MitoTracker Red CMXRos® pós-tratamento com diferentes compostos: CCCP (10 µM, em verde), N3 (em vermelho, tracejado, A) e atovacona (em lilás, tracejado, B) nas diferentes concentrações: 100 µM; 10 µM; 1 µM; 0,1 µM; 0,01 µM; 0,001µM. C) Gráfico de barras representando a média ± D.P. da porcentagem de células com potencial de membrana positivo pós-tratamento por 1 hora com os diferentes compostos. (*) indica uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (<i>One-way ANOVA</i> , $P<0,05$).....	84
Figura 24- Efeito citotóxico da hidroxinaftoquinona N3 (em vermelho) e atovacona (em lilás) em células HEK293T. As células foram incubadas por 48 horas com os compostos em diferentes concentrações (0,128; 0,64; 3,2; 4; 80 e 400 µM) e a viabilidade celular foi avaliada pelo teste de proliferação MTT. (*) indica uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (<i>One-way ANOVA</i> , $P<0,05$).....	86
Figura 25- Variação do peso dos camundongos BALB/C que receberam quatro dias de tratamento da droga N3 (20, 10, 5 e 0,5 mg/Kg animal).	87
Figura 26- Parasitemia no quarto dia após tratamento de quatro dias de tratamento com a nova hidroxinaftoquinona N3 e Cloroquina. Média de cinco camundongos BALB/C infectados com <i>P. berghei</i> ANKA GFP. (*) <i>One-way ANOVA</i> , $p<0,05$	89
Figura 27- Evolução da infecção por <i>P. berghei</i> ANKA GFP nos dia 4, 8, 9 e 13 após o início do experimento.	90
Figura 28- Sobrevivência de camundongos infectados com <i>P. berghei</i> ANKA GFP em 30 dias após quatro dias de tratamento com a nova hidroxinaftoquinona N3 em diferentes concentrações (20; 10; 5; 0,5 mg/Kg animal).	91
Figura 29- Estrutura dos indóis sintéticos (A) série TP; (A) série ME e (C) hormônio melatonina e seus precursores.	94
Figura 30- Estruturas de compostos contendo anel indólico e que se mostram ativos no ciclo do <i>Plasmodium</i> . Luzindol, inibidor do receptor de melatonina MT1/MT2; 8-OH-DPAT inibidor do receptor de serotonina; NITD609	

espirolindolna em fase I de testes clínicos, indol-propanamida com atividade inibitória da Falciparína-2, violaceína e oxindol.....	97
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Solução estoque dos compostos utilizados nessa tese, concentração de 10 mM.	58
Tabela 2- Estrutura dos indóis sintéticos das séries TP e ME, IC ₅₀ e cLogP.	98
Tabela 3- Estrutura das hidroxinaftoquinonas sintéticas, IC ₅₀ e cLogP.	104

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Malária	19
1.2 Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	22
1.3 Sincronização do ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	27
1.4 Melatonina.....	29
1.5 Sinalização da melatonina em <i>P. falciparum</i>	30
1.6 Antimaláricos	33
1.6.1 Quinolinas.....	38
1.6.2 Antifolatos	48
1.6.3 Artemisininas	49
1.6.4 Hidroxi-naftoquinonas	51
1.7 Citometria de fluxo e <i>Plasmodium falciparum</i>	53
2 OBJETIVOS	55
3 MATERIAIS E MÉTODOS	56
3.1 <i>P. falciparum</i>: cultivo e isolamento de parasitas	56
3.2 Cultivo das células HEK293T.....	57
3.3 Citometria de fluxo como ferramenta na análise do efeito de novos compostos no ciclo intraeritrocítico do <i>P. falciparum</i> <i>in vivo</i> utilizando o marcador de DNA YOYO-1.....	57
3.4 Mudanças no potencial de membrana mitocondrial ($\Psi\Delta_{mit}$) após adição de compostos	59
3.5 Ensaio de citotoxicidade em células HEK 329T.....	59
3.6 Efeito de novos compostos em camundongos Balb/C infectados com <i>P. berghei</i> ANKA GFP	60
3.7 Análise estatística e cálculos de cLogP	61
4 RESULTADOS	62
4.1 Citometria de fluxo como ferramenta para analisar mudanças no ciclo celular de <i>Plasmodium falciparum</i>	62
4.2 Ação de compostos indólicos no ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i>	66
4.2.1 Avaliação do efeito de análogos sintéticos da melatonina e triptamina no ciclo intraeritrocítico do <i>Plasmodium falciparum</i>.	66

4.2.2 Avaliação do efeito antimalárico de análogos sintéticos da melatonina na cultura <i>in vivo</i> de <i>P. falciparum</i> 3D7.....	70
4.3 Avaliação biológica de novas hidroxi-naftoquinonas sintéticas como antimaláricos	75
4.3.1 Ação antimalárica <i>in vivo</i> de novas hidroxi-naftoquinonas sintéticas	75
4.3.2 Efeito das novas hidroxi-naftoquinonas sintéticas no $\Delta\Psi$ mitocondrial de <i>P. falciparum</i>	82
4.3.3 Citotoxicidade das novas hidroxi-naftoquinonas sintéticas em células HEK293T.....	85
4.3.4 Ação antimalárica <i>in vivo</i> de novas hidroxi-naftoquinonas sintéticas	87
5 DISCUSSÃO	93
5.1 Citometria como ferramenta no <i>screening</i> de novos fármacos	93
5.2 Ação de compostos indólicos no ciclo intraeritrocítico do <i>Plasmodium</i>	94
5.3 Avaliação biológica de novas hidroxi-naftoquinonas sintéticas como antimalárico.....	100
6 CONCLUSÕES.....	106
REFERÊNCIAS	107
APÊNDICES	141
Apêndice A- Flow Cytometry as a Tool for Analyzing Changes in <i>Plasmodium falciparum</i> Cell Cycle Following Treatment with Indol Compounds. Cytometry Part A, v.79A, p. 959-965, 2011.	141

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária

A malária é uma doença parasitária causada pelos protozoários do gênero *Plasmodium*. Em humanos essa doença pode ser causada por diferentes espécies: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, sendo que recentemente houve relatos de infecção de forma isolada por *Plasmodium knowlesi*, um parasita de símios (COX-SINGH; SINGH, 2008; MCKENZIE; BOSSERT, 1999). Cerca de 106 países possuem áreas de risco de transmissão de malária e aproximadamente 3,3 bilhões de pessoas vivem nessas regiões (**Figura 1**) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011). Em 2010, aproximadamente 216 milhões de pessoas foram infectadas pelo protozoário do gênero *Plasmodium*, levando a 650.000 casos de morte. Desses casos, aproximadamente 91% foram devido a infecções por *P. falciparum*. A região com maior risco de transmissão e morte está na África sub-saariana, responsável por 90% dos casos de morte relatados em 2010, ficando na frente do Sudeste da Ásia (6% das mortes relatadas) e Leste do Mediterrâneo (3% dos óbitos) (OMS, 2011). Crianças com menos de 5 anos compreendem 85% do total dos casos de morte seguidos por mulheres grávidas.

Figura 1- Distribuição dos países com incidência da malária.

Adaptado de: OMS (2011).

Nas Américas (América do Sul e Caribe), segundo o último relatório mundial de malária (2011), a taxa de infecção dessa doença está regredindo. Ainda assim, foram confirmados 673.000 casos de malária, com 30% da população vivendo em área de risco de transmissão, num total de 21 países. Diferente do que acontece na África, nas Américas o *P. vivax* é responsável por 70% dos casos reportados. O relatório ainda ressalta que no Brasil e Colômbia, países que reportam o maior número de casos dessa região, essa regressão no número de doentes não é tão pronunciada quanto em outros países avaliados.

O Brasil é responsável por 40% do total de casos de malária registrados na América do Sul, e 20% da população está em regiões com risco de transmissão da malária (**Figura 2**) (OMS, 2011). No país, *P. falciparum* é responsável por aproximadamente 15% dos casos relatados, sendo a grande maioria (90%) dos casos devido a infecção por *P. vivax*. Existem relatos, porém com menor frequência, de

infecções por *P. malariae* e *P. ovale*. Os principais insetos vetores no país são das espécies *Anopheles garlingi*, *A. albitarsis* e *A. aquasalis*. A transmissão ocorre predominantemente na Amazônia Legal (Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e parte do Maranhão) que compreende 61% do território brasileiro (**Figura 2**), onde ocorrem 99% das infecções (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Figura 2- Distribuição dos casos confirmados de malária (por mil habitantes) no Brasil.

Adaptado de: OMS (2011).

Além da perda de vidas humanas pelas complicações da malária, vários estudos têm mostrado o impacto econômico e social dessa doença. A sua distribuição mundial mostra uma relação direta com a economia global, sendo maior a sua prevalência nos países com menor desenvolvimento econômico e menor renda *per-capita* (SACHS; MALANEY, 2002). O relatório da comissão de macroeconomia e saúde da Organização Mundial da Saúde publicado em 2001 estimou que os danos provocados pela malária reduzem em média 1,2 % o desenvolvimento econômico dos países mais atingidos por essa doença, levando a perdas de bilhões de dólares a longo prazo. Áreas com alto risco de contágio da malária acabam inviabilizando o turismo ou novos investimentos na

região e pode ainda prejudicar a agricultura e a utilização de outros recursos naturais (GALLUP; SACHS, 2001).

1.2 Ciclo de vida do *Plasmodium*

O parasita responsável pela malária, o *Plasmodium*, possui um ciclo de vida complexo que compreende um hospedeiro invertebrado e um hospedeiro vertebrado. A fase sexuada dá-se no hospedeiro invertebrado e inicia-se com a picada de uma fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* em um hospedeiro vertebrado. Após a ingestão de sangue, no intestino do mosquito, os eritrócitos contendo os gametócitos de *Plasmodium* rompem-se dando início à maturação dos gametócitos e posterior fertilização, com a união de gametas masculinos e femininos, gerando um zigoto com mobilidade denominado oocineto (**Figura 3**). O oocineto migra através da parede do intestino e adere-se ao epitélio desenvolvendo um oocisto. Quando o oocisto rompe-se, há liberação de esporozoítos que migram até as glândulas salivares do inseto e são liberados durante a alimentação do mosquito (MENARD et al., 2008).

O ciclo assexuado inicia-se com a picada e inoculação de 10-20 esporozoítos pelo mosquito através da injeção de saliva na derme do hospedeiro vertebrado (**Figura 3**) (AMINO et al., 2006; ROSENBERG et al., 1990). Essa forma então migra pela epiderme até alcançar a corrente sanguínea ou vasos linfáticos (HELLMANN et al., 2011). Na corrente sanguínea, os esporozoítos migram para o fígado, onde atravessam o citoplasma de diversas células, utilizando proteínas da família TRAP (fosfatase ácida tartarato resistente) e o motor actina-miosina (BAUM et al., 2006). Esse processo ativa diversas vias de sinalização necessárias para a invasão e o desenvolvimento nos hepatócitos, onde iniciam um ciclo de reprodução assexuada, conhecido como ciclo pré-eritrocítico (MOTA et al., 2001).

Dentro dos hepatócitos cada esporozoíto desenvolve-se na forma de esquizonte que irá gerar aproximadamente 30.000 merozoítos (TARUN et al., 2006). O mecanismo de liberação desses merozoítos ainda não está completamente elucidado, mas Sturm (2006) mostrou que na infecção por *P. berghei*, um parasita de murinos, são formadas vesículas (merossomos) que migram do hepatócito para o lúmen dos sinusóides hepáticos. Os autores sugerem que como a membrana da vesícula é originária do hospedeiro, não é reconhecida pelas células dendríticas ou pelas células de Kupffer, e os merozoítos conseguem alcançar a corrente sanguínea sem maiores complicações. Essas

mesmas estruturas de merossomos já foram identificadas em *P. yoelii* (TARUN et al., 2006).

Em *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítos permanecem dormentes por meses no fígado. Essas formas são chamadas hipnozoítos e se desenvolvem em esquizontes após um período que pode ser de semanas a meses (COLLINS; JEFFERY, 2007). Essa forma é responsável pela recaída em alguns pacientes tratados para malária (COGSWELL, 1992).

Após a liberação dos merozoítos na corrente sanguínea, os parasitas invadem os eritrócitos dando origem ao ciclo intra-eritrocítico. Nessa fase ocorre a manifestação da doença e o parasita passa por três estágios de maturação bem definidos e conhecidos como: anel, trofozoíto e esquizonte (**Figura 3**).

A invasão dos eritrócitos pelos merozoítos é facilitada pela interação entre ligantes na superfície dos merozoítos e receptores do hospedeiro na superfície dos eritrócitos e ocorre de forma rápida levando em média poucos segundos (COWMAN; CRABB, 2006; GILSON; CRABB, 2009). O acoplamento dos merozoítos aos eritrócitos parece ocorrer aleatoriamente na superfície do parasita num primeiro momento. Posteriormente, os merozoítos reorientam-se levando a um contato mais próximo da região apical do parasita (HALDAR; MOHANDAS, 2007) levando a uma interação de proteínas do parasita e eritrócito na forma de ligante-receptor com alta afinidade. A partir desse momento o processo de invasão é irreversível (COWMAN; CRABB, 2006). Nessa região apical se encontram o micronema, a roptria e os grânulos densos. Após o primeiro contato entre membranas, forma-se uma junção entre a membrana do parasita e do hospedeiro. O parasita então move-se em direção ao interior do eritrócitos num processo de invaginação da membrana da célula do hospedeiro com a ajuda do motor miosina-actina. Ao mesmo tempo que o parasita começa a invasão da célula começa a formação do vacúolo parasitóforo, formando um ambiente favorável para o seu desenvolvimento dentro do parasita (COWMAN; CRABB, 2006).

O mecanismo de invasão possui características moleculares e celulares gerais, porém, cada espécie possui características únicas fazendo com que esse processo torne-se espécie-específico. No caso de *P. falciparum*, sabe-se que esse parasita possui diferentes vias de invasão do eritrócito (GAUR; MAYER; MILLER, 2004). Até agora cinco diferentes vias foram caracterizadas, sendo elas dependentes de

sialoglicoproteínas do eritrócito (glicoforina A, B, C/D) e receptores ainda não caracterizados X, Y e Z. Os ligantes do parasita capazes de interagir com a glicoforina B e o receptor X ainda são desconhecidos. Porém, diversos ligantes do parasita já foram caracterizados entre os principais estão: EBA-175 (CAMUS; HADLEY, 1985), e seus parálogos: BAEBL, JESEBL, EBL-1 e PEBL (BLAIR et al., 2002b; BLAIR et al., 2002a), além das proteínas ligadoras de reticulócitos PfRh1 e PfRh2b (DURASINGH et al., 2003; RAYNER et al., 2000; TAYLOR, H. M.; GRAINGER; HOLDER, 2002). Muitos desses ligantes ainda não possuem o seu respectivo receptor no eritrócito identificado.

Ao final da invasão o parasita já apresenta a forma intracelular chamada anel. Tipicamente, essa forma possui formato de disco com o citoplasma e as principais organelas (núcleo, mitocôndria, plastídeo, ribossomos e retículo endoplasmático) distribuídas em forma de rim (BANNISTER, L. H. et al., 2000). Nessa fase o parasita começa a se alimentar do citoplasma do eritrócito e hemoglobina. A partir do catabolismo da hemoglobina é formado o heme, que é convertido em um cristal marrom que acumula-se na forma de pigmento dentro do vacúolo digestivo e é chamado de hemozoína (SLOMIANNY, 1990).

A forma trofozoíto diferencia-se do formato anel basicamente pelo tamanho e formato. Durante essa fase, a exportação de proteínas do parasita para o citoplasma e membrana do eritrócito se intensifica (ELFORD; COWAN; FERGUSON, 1995), assim como a síntese proteica e de DNA (ARNOT; RONANDER; BENGTSSON, 2011). O complexo de Golgi e o retículo endoplasmático aumentam consideravelmente de tamanho e complexidade. Nessa fase também surgem os *Knobs*, que são estruturas na superfície do eritrócito que aumentam a adesão das células parasitadas ao endotélio, levando a malária cerebral e às complicações em mulheres grávidas devido à adesão a placenta (BANNISTER, L. H. et al., 2000). Nessa fase, 24 horas após a invasão começa a duplicação do DNA do parasita e 26-28h após a invasão a primeira divisão celular está completa (ARNOT; RONANDER; BENGTSSON, 2011).

Na fase de desenvolvimento esquizonte a divisão celular que se iniciou em trofozoíto se intensifica de forma significativa (WHITE; KILBEY, 1996). É possível perceber de 16-20 núcleos formados dentro da célula parasitada. A formação da hemozoína agora é bastante evidente formando uma massa grande e densa. O parasita

torna-se bastante arredondado, e o número de *Knobs* encontra-se bastante aumentado (NAGAO et al., 2008). Diversas modificações na organização do citoplasma são visíveis e já é possível perceber o formato de novos merozoítos no interior do eritrócito infectado. Ocorre divisão da mitocôndria e plastídeos e uma grande expansão do retículo endoplasmático e ribossomos.

Durante a última divisão nuclear, regiões delimitando o espaço que será ocupado pelos merozoítos se formam, distribuídos na circunferência do parasita. No final da esquizogonia, um núcleo, uma mitocôndria e um plastídeo migram para uma determinada região da célula onde se formará um merozoíto. Um anel de constrição separa cada um dos merozoítos do pigmento residual do citoplasma do esquizonte, formando os merozoítos de forma individualizada. Finalmente o vacúolo parasitóforo e a membrana do eritrócito rompem-se e os parasitas estão prontos para invadir um novo eritrócito.

Após a passagem pelas três fases de desenvolvimento, os eritrócitos rompem-se liberando novos merozoítos na corrente sanguínea para invasão de novos eritrócitos e início de um novo ciclo. Alguns parasitas na corrente sanguínea diferenciam-se em gametócitos femininos e masculinos, que irão dar prosseguimento à fase sexuada no hospedeiro. Os gametócitos são as formas capazes de infectar os mosquitos. A transição da fase assexual intraeritrocítica para os gametócitos sexuais começa aproximadamente 7-15 dias após a invasão dos eritrócitos e é necessário aproximadamente 10 dias para o gametócito desenvolver-se completamente (KUEHN; SIMON; PRADEL, 2010). O sexo do gametócito é pré-determinado, tendo já esquizontes comprometidos com o desenvolvimento gametocítico (SMITH et al., 2000), sendo que a cada gametócito masculino são gerados, em média, cinco gametócitos femininos (PAUL; BREY; ROBERT, 2002; PAUL; DOERIG; BREY, 2000). O sangue contendo gametócitos maduros ingerido pelo mosquito vetor fecha, então, o ciclo de vida desses parasitas nos seus dois hospedeiros (**Figura 3**).

Figura 3- Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*. Representação da fase hepática e intraeritrocítica do parasita no hospedeiro mamífero e fase sexual no hospedeiro anofíldeo.

Adaptado de (BANNISTER, L.; MITCHELL, 2003).

1.3 Sincronização do ciclo de vida do *Plasmodium*

Nosso conhecimento a respeito do ciclo de vida do *Plasmodium* dentro do seu hospedeiro ainda é limitado, porém, sabe-se que todos os sintomas da doença estão diretamente relacionados ao desenvolvimento do parasita na fase intraeritrocítica, que induz diversas mudanças estruturais e bioquímicas na célula hospedeira (BHATTACHARJEE et al., 2008; HALDAR; MOHANDAS, 2007; MAIER et al., 2008; OAKLEY et al., 2007). Uma característica marcante a respeito da infecção por *P. falciparum* está associada aos intervalos de pico de febre de 48 horas, como resultado da liberação sincrônica de merozoítos na corrente sanguínea (GARCIA; MARKUS; MADEIRA, 2001). Milhões de parasitas são formados após uma série de ciclos de desenvolvimento dentro dos eritrócitos, seguida da lise do eritrócito e liberação de merozoítos na corrente sanguínea que irão re-invadir novas células e recomeçar o ciclo.

Uma das principais características do ciclo de vida do patógeno da malária é a sincronia nos seus diversos estágios. A formação dos gametócitos e os estágios das formas assexuadas do ciclo intra-eritrocítico e, conseqüentemente, a periodicidade dos ataques febris, vem sendo estudados desde o início do século passado. Hawking, em 1970, sugeriu que as febres dos pacientes em estudo eram provenientes de um súbito acréscimo de merozoítos na circulação sanguínea e que o desenvolvimento dos parasitas seria sincronizado de acordo com um padrão de 24, 48, ou 72h, conforme a espécie. Sabe-se também que o ciclo sexuado também está organizado em ritmos e que é possível encontrar um pico na população de gametócitos do parasita no período da noite. Esse fenômeno de maior concentração de gametócitos próximo ao horário de alimentação do hospedeiro invertebrado possui importantes implicações adaptativas na manutenção do ciclo sexuado e foi chamado em 1974 por Garnham e Powers de “Efeito Hawking”.

Os mecanismos moleculares e celulares responsáveis pela periodicidade na infecção por *Plasmodium* constituem-se uma importante questão da biologia do parasita. Vários trabalhos demonstraram em modelos animais que quando o ritmo do parasita é perturbado em relação ao ritmo do hospedeiro, este volta a sincronizar com o ciclo circadiano do hospedeiro em poucos ciclos de re-infecção. Esses experimentos foram conduzidos em diferentes hospedeiros: aves, roedores e primatas, com as respectivas espécies *P. cathemerium*, *Plasmodium chabaudi* e *Plasmodium brasilianum* (GAUTRET; MOTARD, 1999a; b). O'Donnell et al. (2011) mostrou que em

camundongos infectados com *P. chabaudi*, quando o ritmo do hospedeiro é perturbado pela alteração dos períodos de claro/escuro, ocorrem perdas da capacidade proliferativa e produção de gametócitos em até 50%, evidenciando a importância da concomitância do ciclo do *Plasmodium* e do ciclo circadiano do seu hospedeiro. Essa coordenação temporal do parasita com o seu hospedeiro possivelmente está relacionada a utilização de fatores liberados circadianamente como hormônios (HOTTA et al., 2000) e citocinas (TNF- α ou IL-6) (KELLER et al., 2009). Além desses fatores, a temperatura do hospedeiro, que varia com o ciclo circadiano durante as 24 horas do dia e os picos febris (KWIATKOWSKI; NOWAK, 1991) podem ser fatores que contribuem com a sincronização do ciclo de vida do *Plasmodium*.

Dada a importância da sincronia e temporização do ciclo assexuado do *Plasmodium* para a manutenção do seu ciclo sexuado, é de grande interesse identificar quais seriam os mecanismos responsáveis por essa característica. Já foi observado que a sincronização da esquizogonia é perdida em cultura (TRAGER, W.; JENSEN, J., 1976), indicando sua dependência de fatores do hospedeiro. Experimentos realizados por nosso grupo (HOTTA et al., 2000), utilizando camundongos pinealectomizados cirurgicamente e farmacologicamente (utilizando o antagonista de melatonina luzindol) e infectados com *P. chabaudi* demonstraram que o parasita utiliza a melatonina, um hormônio que marca o ritmo circadiano, para sincronização dos estágios assexuados. Além disso, foi mostrado que a adição de melatonina ao meio de cultura restaura parcialmente a sincronia de *P. falciparum* de forma dose-dependente (HOTTA et al., 2000), bem como aumenta a parasitemia em 30% após adição por 8 horas em cultura sincrônica de esquizontes (BERALDO et al., 2005; BERALDO; GARCIA, 2005). De forma interessante, a adição de melatonina em uma cultura *in vitro* de *P. chabaudi* dobra a parasitemia após incubação por 18 horas, e esse efeito foi dependente da liberação de cálcio intracelular, elevação da concentração de cAMP e aumento da atividade da PKA após adição do hormônio (GAZARINI et al., 2011).

De forma oposta, nenhum efeito de modulação do ciclo ou liberação de cálcio citoplasmático é observado em *P. berghei* e *P. yoelii* (espécies consideradas assíncronas) quando tratados com melatonina (BAGNARESI et al., 2009).

Diante da importância da sincronização para o ciclo de vida do *Plasmodium*, e da relação direta da melatonina na manutenção desse ciclo de forma sincrônica,

Bagnaresi et al. (2008) mostram que a perturbação da sincronicidade do desenvolvimento intraeritrocítico do parasita em *P. chabaudi*, através da injeção de Luzindol em camundongos infectados, aumentou a sobrevivência desses animais e sinergicamente melhorou a atividade antimalárica da cloroquina de forma acentuada.

1.4 Melatonina

A melatonina é um hormônio produzido pela glândula pineal dos vertebrados que transmite o sinal de escuro baseado nos ciclos circadianos e ciclos sazonais das estações (REITER; TAN; FUENTES-BROTO, 2010). A presença da melatonina, entretanto, não é restrita aos vertebrados e pode, inclusive, ser encontrada em espécies filogeneticamente divergentes incluindo bactérias, plantas e protozoários (REITER; TAN; FUENTES-BROTO, 2010).

Nos vertebrados, a melatonina pode ser sintetizada por diversos tipos celulares, embora a produção em mamíferos ocorra principalmente na glândula pineal (GUERRERO; REITER, 2002; TAN et al., 1999). O precursor da melatonina é a serotonina, um neurotransmissor derivado do aminoácido triptofano (**Figura 4**). Na glândula pineal, inicialmente o aminoácido triptofano é transformado em 5-hidroxitriptofano pela enzima triptofano 5-hidroxilase, essa molécula então sofre carboxilação formando a serotonina através da ação da 5-hidroxitriptofano carboxilase. A serotonina então é acetilada e depois metilada gerando a melatonina. O passo limitante na produção desse hormônio é a expressão da enzima N-acetiltransferase (NAT), que ocorre durante a fase escura, sendo a sua produção inibida na presença de luz (GASTEL et al., 1998). A informação a respeito da luminosidade externa é captada pelos pigmentos fotorreceptores da retina, sendo transmitido para o núcleo supraquiasmático via trato retinohipotalâmico (VAN ESSEVELDT; LEHMAN; BOER, 2000). Sua expressão na fase escura é aumentada entre 70-100 vezes e praticamente nula na fase clara. A serotonina é acetilada pela NAT produzindo assim a N-acetil serotonina (NAS). A NAS, por sua vez, é metilada pela enzima hidroxindole-O-metiltransferase (HIOMT) produzindo por fim a melatonina (5-metoxi acetil triptamina) (ARENDT et al., 1995).

Figura 4- Via de síntese do hormônio melatonina em mamíferos.

Baseado em: Macchi e Bruce, 2004.

1.5 Sinalização da melatonina em *P. falciparum*

Em *P. falciparum*, a melatonina induz uma complexa via de sinalização (**Figura 5**). Hotta et al. (2000) mostraram que em *P. chabaudi* o tratamento com luzindol e U73122, inibidor da PLC, inibem o aumento de Ca^{2+} citosólico após adição de melatonina bem como inibem o aumento da parasitemia causado pela adição desse hormônio. Da mesma forma, após depletar os estoques de Ca^{2+} do retículo endoplasmático pela adição de tapsigargina, um inibidor específico da Ca^{2+} ATPase do retículo endoplasmático, melatonina não mais promove o aumento de Ca^{2+} citosólico. Esses resultados reunidos levam a hipótese de que o hormônio estaria se ligando a um receptor de membrana acoplado a proteína G, que ativaria uma PLC, levando ao aumento de InsIP_3 , que subsequentemente aumentaria o Ca^{2+} citosólico a partir do

retículo endoplasmático resultando nos efeitos posteriores dependentes de aumento de Ca^{2+} .

Seguindo essa hipótese, Beraldo et al. (2005) testaram o efeito da melatonina nos níveis de AMPc e a participação da quinase PKA nessa via de sinalização. Melatonina foi capaz de aumentar os níveis de AMPc e elevar a atividade da enzima PKA em 50%. Adicionalmente, a inibição dessa quinase utilizando o inibidor PKI aboliu o efeito da melatonina no ciclo celular de *P. falciparum*. O aumento de AMPc, tanto pela inibição da AMP fosfodiesterase como pela adição do análogo funcional 6-Bnz-AMPc, levou a modulação do ciclo celular do parasita de forma similar a da adição da melatonina. A utilização do inibidor da PLC, U73122, aboliu o incremento de AMPc após a adição da melatonina, levando a conclusão de que a sinalização de melatonina em *Plasmodium* envolve uma via de sinalização complexa que inclui a interação dos segundos mensageiros Ca^{2+} e AMPc de forma orquestrada.

Além da melatonina, outros derivados indólicos são capazes de interferir no ciclo celular do parasita. Os derivados n-acetil-serotonina, serotonina e triptaminas são capazes de aumentar a concentração de cálcio citoplasmático e a proporção de esquizontes de uma cultura assincrônica após incubação em *in vitro* de *P. falciparum* (BERALDO; GARCIA, 2005), sendo esses efeitos bloqueados pela adição de luzindol (antagonista do receptor de melatonina) e U73122 (inibidor da PLC). Budu et al. (2007) mostraram que o AFMK (produto de degradação da melatonina) é capaz de elevar os níveis de Ca^{2+} citoplasmático, aumentar a parasitemia e sincronizar o ciclo celular de *P. falciparum* e *P. chabaudi*. Além disso, nesse mesmo trabalho, ao longo do ciclo intraeritrocítico houve um acréscimo de AFMK após incubação com melatonina em *P. chabaudi*, principalmente nos estágios maduros de desenvolvimento (trofozoíto e esquizonte).

A partir dos trabalhos relatados anteriormente acredita-se que a melatonina aumenta a concentração de Ca^{2+} citosólico através do aumento de IP_3 . Recentemente Alves et al. (2011) reportou a produção de IP_3 a partir de hemácias infectadas com *P. falciparum* e tratadas com melatonina. Este artigo é importante pois também demonstra a produção de IP_3 com uso do composto caged- IP_3 em parasitas dentro da hemácia.

Buscando entender quais componentes moleculares estariam envolvidos na sinalização da melatonina, Koyama et al. (2012) mostraram que o tratamento com esse

hormônio regula positivamente a expressão de genes da via ubiquitina/proteassoma (UPS), e que de forma interessante, o tratamento com luzindol bloqueia a resposta de ubiquitinação após o tratamento com o melatonina.

Ainda neste trabalho foi avaliada uma linhagem de parasita nocaute para a proteína quinase PfPK7. A quinase 7 de *P. falciparum* é uma proteína que não possui ortólogos entre os mamíferos e possui um domínio conservado bastante similar a das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKK). Inibidores clássicos de quinases não foram capazes de bloquear a atividade da PfPK7, que também não fosforila proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) em *P. falciparum* (DORIN et al., 2005).

A produção de uma linhagem nocaute de *P. falciparum* da PfPK7 resultou em um fenótipo com capacidade proliferativa reduzida (DORIN-SEMBLAT et al., 2008). Durante a fase de desenvolvimento intraeritrocítica, o parasita nocaute para PfPK7 resulta em esquizontes com um número significativamente menor de merozoítos. Na fase sexuada, esse parasita perdeu a capacidade de produzir oocistos nos mosquitos vetores. A reposição da PfPK7 reestabelece a taxa de crescimento intraeritrocítica do parasita, bem como a capacidade de produzir oocistos em mosquitos.

Koyama et al. (2012) mostraram que após a adição da melatonina o parasita nocaute PfPK7 perde a capacidade de modular o ciclo intraeritrocítico e diminuiu drasticamente a capacidade de aumentar o cálcio intracelular em resposta à adição do hormônio. Adicionalmente, PfPK7 não apresentou modulação dos genes do UPS pós tratamento com o hormônio. Todas essas respostas à adição da melatonina foram reestabelecidas na linhagem com reposição da expressão de PfPK7. Os resultados apresentados por Koyama et al (2012) revelaram dois componentes importantes da cascata de sinalização do hormônio e do mecanismo de desenvolvimento intraeritrocítico do parasita.

Seguindo o objetivo de descrever os componentes e efetores moleculares responsáveis pela sinalização do hormônio melatonina, Lima et al. (2012) mostraram que o fator de transcrição PfNK- $\gamma\beta$ possui a sua expressão regulada pelo hormônio melatonina e AMPc. Além do aumento da expressão gênica, a ubiquitinação desse fator de transcrição é aumentada na presença da melatonina. Através do uso de inibidores de proteassoma foi possível bloquear a invasão de novos eritrócitos, havendo uma

interrupção do processo de maturação e liberação dos merozoítos contidos nos esquizontes, reforçando a importância da ubiquitinação para o ciclo celular do *Plasmodium* e na cascata de sinalização do hormônio melatonina (Lima et al, 2012).

Figura 5- Via de sinalização proposta para o hormônio melatonina em *P. falciparum*.

Adaptado de (KOYAMA; CHAKRABARTI; GARCIA, 2009).

1.6 Antimaláricos

Atualmente não existem vacinas comerciais disponíveis para malária, de forma que medicamentos eficazes são imprescindíveis para o controle dessa doença.

A primeira droga utilizada no tratamento da malária foi o quinino, produto extraído da casca da árvore *Cinchona calisaya* (quina-quina). Sua utilização marcou o primeiro uso com sucesso de um composto químico no tratamento de doenças infecciosas e representou um marco importante na medicina do século 17. O seu uso medicinal foi descrito pela primeira vez no início dos anos 1600, durante uma viagem de jesuítas aos Andes da América do Sul. Dizem os relatos, que uma tribo na América

do sul utilizava-se de uma água embebida com a casca da quina-quina e que essa água de sabor amargo era capaz de curar os ataques febris que acometiam a tribo. Essa história disseminou-se na Europa e o quinino foi introduzido na região em 1638. Até 1820, o quinino era consumido a partir das cascas da árvore que eram secas, maceradas e misturadas numa solução alcóolica. Porém, em 1820, Pierre Joseph Pelletier e Joseph Caventou isolaram e purificaram o quinino a partir da casca da árvore (ACHAN et al., 2011). Essa substância foi o principal tratamento da malária até meados de 1920, quando antimaláricos sintéticos surgiram (GUERRA, 1977b; a).

Até o início do século passado, a demanda da Europa de cascas de quina-quina era suprida por plantações dessa árvore em Java. Entretanto, em virtude da primeira guerra mundial, a Europa não conseguiu mais importar as cascas da quina-quina e soldados que lutavam no sul da Europa começaram a perecer de malária. Logo, percebeu-se a necessidade de obter-se compostos antimaláricos sintéticos, de forma que a Europa não fosse mais dependente dos suplementos de cascas para a produção de medicamentos antimaláricos (BUTLER; KHAN; FERGUSON, 2010). Farmacêuticos e químicos alemães então criaram o mepacrina, com uma estrutura simplificada do quinino. Mepacrina é uma droga eficaz contra a malária, porém, possuindo como efeito colateral colorir a pele na cor amarela. Quando a segunda guerra estourou, os suplementos de mepacrina alemão não chegavam mais aos Estados Unidos e as plantações de quina-quina em Java estavam nas mãos dos japoneses. Foi então, que como uma arma de guerra, os japoneses lançaram uma propaganda enganosa dizendo que além da pele amarela, a mepacrina, agora também produzida pelos americanos, causava infertilidade (BUTLER; KHAN; FERGUSON, 2010; GREENWOOD, B. M. et al., 2005; GREENWOOD, D., 1995). Rapidamente os soldados americanos negaram-se a tomar essa droga e a malária mais uma vez castigava os soldados no *front*. Mais uma vez a guerra foi o estímulo para a procura de uma nova droga sintética eficaz contra a malária. Químicos americanos então trabalharam em cima da estrutura da mepacrina e da sontoquina e descobriram uma molécula mais eficaz e de síntese mais simplificada, surgia então a cloroquina (MOST; LONDON; ET AL., 1946), que teve papel importante na vitória dos americanos sobre os japoneses no *front* (BUTLER; KHAN; FERGUSON, 2010; GREENWOOD, B. M. et al., 2005; GREENWOOD, D., 1995).

A guerra impulsionou o desenvolvimento de diversos novos fármacos ao longo da história, e vários derivados do quinino diferentes da cloroquina surgiram principalmente nos Estados Unidos e China, entre eles: lumefantrine, piperquina e pironaridina na China e amodiaquina, mefloquina e halofantrine nos Estados Unidos (GREENWOOD, B., 2010). Essas drogas atuam no parasita da mesma forma que o quinino, durante o ciclo intraeritrocítico, bloqueando a polimerização do heme, um produto tóxico proveniente da degradação da hemoglobina.

Após a segunda guerra, na década de 1950, o uso da cloroquina e do inseticida DDT (dicloro-difeniltricloroetano), que mata o mosquito vetor, fez com que a malária fosse erradicada progressivamente dos países desenvolvidos. O uso do DDT era amplamente distribuído e os casos de malária caíram drasticamente. Porém, complicações no uso do DDT devido a sua toxicidade e o aparecimento de mosquitos resistentes em certos países levou à interrupção do uso desse inseticida (SADANAND, 2010). Nessa mesma época a cloroquina começou a apresentar diminuição da sua eficiência como antimalárico. Na década de 1970, começaram a surgir regiões resistentes a essa droga na América do Sul e Sudeste da Ásia, espalhando-se gradativamente a todas as áreas onde a malária é prevalente (Sadanand 2010).

Mais uma vez na história a guerra foi o impulso para o desenvolvimento de um novo tratamento para malária. O projeto que levou a descoberta das artemisininas foi iniciado em resposta as mortes massivas de soldados Norte Coreanos na guerra do Vietnã. Em 1967 um projeto chamado “projeto 523” tinha como objetivo descobrir novos e eficientes antimaláricos a longo prazo, além de desenvolver para uso imediato no campo de batalha combinações de drogas já existentes que fosse efetivas contra a malária (CUI; SU, 2009).

Foi desenvolvido um tratamento que consistia de três etapas utilizando antifolatos: 7 dias de pirimetamina e dapsona como profilático; pirimetamina e sulfadoxina por 10 dias e piperquina e sulfadoxina por 30 dias. Esse tratamento mostrou-se efetivo no exército. Paralelamente foram iniciados *screenings* nas ervas utilizadas pela medicina tradicional chinesa o que levou a identificação de aproximadamente 10 plantas com boa atividade antimalárica, entre elas a qinghao (*Artemisia annua*).

Na medicina chinesa essa erva era indicada em casos de ataques febris há pelo menos 2000 anos. O projeto 523 testou extratos dessa planta obtidos em baixas temperaturas em malária murina e obtiveram 100% de eficiência. Ao longo da década de 1970 vários testes clínicos foram conduzidos na China utilizando diferentes métodos de extração dos compostos ativos e em 1975 a estrutura da artemisinina foi definida utilizando análise de cristais através de raio-x. A publicação da estrutura da artemisinina possibilitou a produção de diferentes derivados dessa droga, entre eles o artesunato (1987), artemeter (1987), e a dihidroartemisinina (1992), (CUI; SU, 2009; LI, Y.; WU, 1998).

O isolamento desse composto foi uma das grandes descobertas do século 20 e mudou as indicações de tratamento para a malária. As artemisininas atualmente são essenciais em qualquer programa de controle que vise eliminar a malária. Infelizmente já existem relatos de casos de resistência a essa droga na divisa entre a Tailândia e Camboja (NOEDL et al., 2008; NOEDL; SOCHEAT; SATIMAI, 2009). Apesar do padrão ouro de tratamento para malária ser a terapia combinada com artemisininas (ACT) o alto preço ainda é um limitante do seu uso em países pobres. Atualmente existe um esforço mundial, financiado principalmente pela fundação Bill e Melinda Gates em obter compostos sintéticos com ação similar a da artemisininas (BUTLER; KHAN; FERGUSON, 2010).

Os antimaláricos utilizados atualmente são derivados de basicamente seis classes de drogas: quinolinas (4-aminoquinolinas, aril-aminoálcoois e 8-aminoquinolinas), antifolatos, artemisininas, inibidores da cadeia respiratória e antibióticos (**Figura 6**) (SCHLITZER, 2008).

Figura 6- Estrutura química dos principais antimaláricos utilizados atualmente no tratamento da malária.

Adaptado de (WELLS; ALONSO; GUTTERIDGE, 2009).

1.6.1 Quinolinas

As quinolinas formam a classe de drogas que incluem os fármacos mais conhecidos no tratamento da malária. São divididas em três grupos: (1) 4-aminoquinolinas, que incluem a cloroquina e amodiaquina, (2) aril-aminoálcoois que compreendem o quinino, a mefloquina e a halofantrina e (3) 8-aminoquinolinas que compreende as drogas pamaquine, primaquina e tafenoquina com capacidade única contra a forma hipnozoíto de *P. vivax*. Esses grupos diferem nas características químicas das suas estruturas, sendo as 4- e 8- aminoquinolinas bases fracas, diprotonadas e hidrofílicas em pH neutro, enquanto os aril-aminoálcoois são bases fracas e lipossolúveis em pH neutro.

Essas drogas formam complexos com a ferriprotoporfirina IX (FPPIX), inibindo a formação da hemozoína. A FPPIX é formada em grandes quantidades durante a digestão da hemoglobina pelo parasita, e é extremamente tóxica ao parasite como será visto adiante.

A cloroquina é a principal droga dessa classe e a que apresentou melhores resultados no combate a malária no passado. Essa droga é quase completamente absorvida quando ingerida, além de ser bem tolerada pelos pacientes e possuir um baixo custo de produção. O seu mecanismo de ação, assim como das outras quinolinas, ainda não está completamente elucidado mas é bastante claro que ele interfere na formação da hemozoína.

Durante o desenvolvimento intraeritrocítico o parasita consome grandes quantidades de hemoglobina da célula hospedeira com o objetivo de obter aminoácidos (**Figura 7a**). O parasita não possui síntese *de novo* de aminoácidos, dessa forma a digestão da hemoglobina é primordial para o fornecimento de aminoácidos para seu crescimento e maturação (DOWNIE; KIRK; MAMOUN, 2008). Durante o processo de digestão, a hemoglobina é enviada para o vacúolo digestivo através de vesículas, onde é digerida pela ação de enzimas proteolíticas (plasmepsinas I-IV, falcipainas e zinco protease falcilisina) (FRANCIS; SULLIVAN; GOLDBERG, 1997). Como produto desse processo de degradação são gerados pequenos peptídeos e aminoácidos livres, que são transportados pela membrana do vacúolo até o citoplasma, e moléculas de heme (Fe(II)protoporfirina IX) que permanece dentro do vacúolo digestivo. A oxidação do

Fe^{2+} central do heme produz a Fe(III)protoporfirina IX (FPPIX) e grandes concentrações dessa molécula são tóxicas para o parasita. O parasita então une essas moléculas de FPPIX através da ligação Fe^{2+} central da molécula com o grupo lateral carboxilado da molécula seguinte, formando um polímero insolúvel inerte chamado hemozoína (PAGOLA et al., 2000; SLATER et al., 1991). Três hipóteses tentam explicar os mecanismos de formação desse cristal: (1) essa reação ocorreria espontaneamente no vacúolo digestivo (VD) (DORN et al., 1995); (2) a proteína II rica em histidina estaria envolvida no processo acelerando a reação (SULLIVAN; GLUZMAN; GOLDBERG, 1996) ou (3) a reação seria catalisada pela enzima heme polimerase (SLATER; CERAMI, 1992).

Figura 7- Esquema mostrando o processo de degradação da hemoglobina e formação da hemozoína (a). Em (b) a cloroquina forma um complexo com a Fe(III)Protoporfirina, impedindo a formação do cristal com moléculas de heme.

Adaptado de (DING; BECK; RASO, 2011; SCHLITZER, 2007).

Devido ao seu caráter básico fraco a cloroquina acumula-se no vacúolo digestivo (AIKAWA, 1972a; b; SULLIVAN; GLUZMAN; GOLDBERG, 1996), e liga-se às moléculas de FPPIX (BRAY et al., 1999; BRAY; JANNEH; WARD, 1999; GLIGORIJEVIC et al., 2006) e inibe a formação da hemozoína (PAGOLA et al., 2000; SLATER; CERAMI, 1992; SLATER et al., 1991; SULLIVAN et al., 1996; SULLIVAN et al., 1998) (**Figura 7b**). Dessa forma, a cloroquina permite que a FPPIX atue no parasita e danifique a sua membrana levando o mesmo a morte (SUGIOKA et al., 1987; SUROLIA, I., 2000; SUROLIA, N.; PADMANABAN, 1991). Sabe-se que a cloroquina é ativa apenas em estágios de desenvolvimento do parasita que degradam a hemoglobina e formam a hemozoína (anel, trofozoíto, esquizontes jovens) (SLATER; CERAMI, 1992; SULLIVAN et al., 1998). Os mecanismos moleculares envolvidos na inibição da formação da hemozoína ainda não estão completamente elucidados, porém diversos pontos relacionados ao mecanismo de ação são amplamente aceitos: (1) após a entrada no vacúolo digestivo, onde o ambiente é ácido, a cloroquina é protonada e torna-se impermeável a membranas, acumulando-se nessa organela; (2) o complexo heme-cloroquina inibe proteases dentro do vacúolo parasitóforo (GLUZMAN et al., 1994); (3) a cloroquina forma um complexo com as moléculas de heme que se encontram no VD, esse complexo liga-se a cadeia de hemes que está em formação e impede a polimerização de mais moléculas de heme (SULLIVAN et al., 1996); (4) a degradação do heme via glutathione é inibida pela cloroquina (FAMIN; KRUGLIAK; GINSBURG, 1999; GINSBURG et al., 1998; ZHANG, J.; KRUGLIAK; GINSBURG, 1999)

Ginsburg et al. (1998) formularam uma hipótese que une vários dos aspectos relacionados acima com o possível mecanismo de ação da cloroquina em *Plasmodium*. Segundo os autores, após a digestão da hemoglobina dentro do vacúolo digestivo e da liberação do heme na organela inicia-se a formação da hemozoína. Hemes não polimerizados deixam o VD e são degradados no citosol do parasita pela glutathione (GSH). Quando a cloroquina é utilizada, esta atua de duas formas distintas: (1) forma complexos com o heme, impedindo a polimerização dessas moléculas; (2) inibe a ação da GSH impedindo a degradação do heme livre. Moléculas de heme então irão se acumular nas membranas do parasita, tornando-as permeáveis à cátions, perturbando a homeostase do parasita e levando-o a morte (CHOU; FITCH, 1980; 1981; FAMIN; KRUGLIAK; GINSBURG, 1999).

Outra droga da classe das 4-aminoquinolinas é a amodiaquina. Derivada da cloroquina numa tentativa de superar os problemas de resistência dessa droga elas diferem-se basicamente no aumento da lipofilicidade da cadeia lateral da molécula através da adição de um anel aromático. Em 1980, agranulocitoses severas, seguidas de mortes, foram relatadas em viajantes que usaram amodiaquina no tratamento profilático a malária (HATTON et al., 1986; NEFTEL et al., 1986). Tais efeitos colaterais parecem estar relacionados ao uso prolongado do medicamento (3 a 10 semanas de uso) e a frequência do aparecimento desses efeitos colaterais pode chegar a 1 em 2100 quando a droga é utilizada entre 5-14 semanas (SCHLITZER, 2008). A organização mundial da saúde retirou essa droga dos antimaláricos recomendados. Atualmente a OMS não indica seu uso como profilático, e recomenda a amodiaquina apenas nos casos em que o risco da infecção por malária seja maior que os potenciais efeitos colaterais da droga (OLLIARO et al., 1996).

Como pontos favoráveis a amodiaquina possui boa eficiência no tratamento de casos de malária em certas regiões da África onde o tratamento com cloroquina encontra resistência, baixo custo de produção e é bastante palatável, inclusive para crianças (OLLIARO et al., 1996). Apesar de compartilhar o mesmo mecanismo de ação da cloroquina, a amodiaquina é relativamente eficiente em cepas resistentes a cloroquina (MULLER, O. et al., 1996) e o seu uso combinado com Artesunato mostrou-se extremamente promissor (ADJUIK et al., 2004; KREMSNER; KRISHNA, 2004). Por outro lado, vários relatos de resistência a monoterapia com amodiaquina já foram relatados na África, América do Sul e Ásia (KHALIQ et al., 1987; KREMSNER et al., 1988; MUTABINGWA et al., 2005).

Outra quinolina importante, a piperquina, é uma bisquinolina que basicamente consiste na união de duas moléculas de 4-aminoquinolinas. Essa droga foi sintetizada na China na década de 1960 e foi amplamente utilizada nesse país até o final da década de 1980 (DAVIS et al., 2005). O tratamento com piperquina apresentou parasitas resistentes ao tratamento nas localidades em que foi extensivamente utilizada como monoterapia, porém, um estudo com cepas cloroquina-resistentes mostrou que a piperquina pode ser 6 vezes mais sensível em cepas resistentes que a cloroquina (VENNERSTROM et al., 1992).

A partir da década de 1990 cientistas chineses passaram a estudar o uso da piperquina combinado com a artemisinina obtendo altos índices de cura e boa tolerabilidade. Estudos recentes na Ásia e África em cepas resistentes a múltiplas-drogas mostrou que a combinação piperquina e dihidroartemisinina é bastante eficiente no controle da infecção, alcançando índices de cura de até 90% (ASHLEY et al., 2005; BASCO; RINGWALD, 2003; VALECHA et al., 2010). Devido ao sucesso nos ensaios clínicos essa combinação atualmente é considerada tratamento de primeira-linha em casos de malária não-complicada.

Acredita-se que a atividade da piperquina contra cepas cloroquina-resistentes está relacionada ao tamanho da molécula, que possivelmente não se encaixa dentro do sítio de ligação da proteína PfCRT na membrana do vacúolo digestivo, impedindo assim o transporte da droga para fora do vacúolo. Devido a sua semelhança estrutural com a cloroquina, pode-se supor que ambas compartilhem mecanismos de ação similares. Warhurst et al. (2007) testaram essa hipótese realizando experimentos de inibição da formação da cadeia de heme *in vivo* utilizando cloroquina, piperquina e hidroxipiperquina. Todas 4-aminoquinolinas foram capazes de inibir a formação da hemozoína, e a estrutura de ambas bisquinolinas parece propiciar o bloqueio do transporte da droga do vacúolo através de interações hidrofóbicas da droga com PfCRT.

Dentre os aril-aminoálcoois o mais conhecido é o quinino. Como foi dito anteriormente, seu uso no tratamento da malária já possui mais de 400 anos e ainda hoje é uma das drogas mais importantes no tratamento da malária severa. O quinino é rapidamente absorvido, tendo seu pico na concentração plasmática entre 1-3 horas após a sua administração (SUPANARANOND et al., 1991). Essa é uma das principais drogas utilizada no tratamento da malária severa devido a sua disponibilidade para aplicação por via intravenosa e intramuscular (DAVIS et al., 1990). Apesar da sua boa atividade antimalárica essa droga possui efeitos colaterais importantes, sendo um dos motivos do seu uso limitado aos casos mais severos. A união de vários sintomas oriundos do seu uso é chamado de cinchonismo e incluem: náuseas, dor de cabeça, zumbido no ouvido, surdez, visão dupla, arritmia cardíaca causada por severa hipoglicemia (devido ao aumento na liberação de insulina) (SCHLITZER, 2008). O aumento na liberação da insulina seguida de hipoglicemia e arritmia cardíaca é mais

delicado no tratamento em gestantes, tornando o tratamento da malária severa mais complicado nesses casos (TAYLOR, W. R.; WHITE, 2004).

Devido aos sintomas colaterais o quinino foi muito menos utilizado que a cloroquina ou a combinação sulfadoxina-pirimetamina fazendo com que o aparecimento de resistência seja mais pontual. Na Ásia e Oceania relatos importantes de resistência ao quinino devido a monoterapia ou má aplicação da combinação do quinino e tetraciclina levou ao aparecimento rápido de parasitas resistentes (CHONGSUPHAJAISIDDHI; SABCHAREON; ATTANATH, 1983; PUKRITTAYAKAMEE et al., 1994; SUEBSAENG; WERNSDORFER; ROONEY, 1986) porém, casos desse tipo são raros na América do Sul. No Brasil, estudos clínicos de isolados obtidos na Amazônia mostraram diminuição na susceptibilidade e resistência ao quinino (SEGURADO; DI SANTI; SHIROMA, 1997; ZALIS et al., 1998). Já na África, apesar de desaconselhado pela organização mundial de saúde, a adoção do quinino como tratamento de segunda-linha da malária em aproximadamente 29 países possivelmente é responsável pela redução na sensibilidade do parasita a essa droga bem como ao aparecimento de cepas resistentes (YEKA et al., 2009). Diversos estudos com isolados clínicos ou viajantes infectados na África mostram um aumento no aparecimento de cepas resistentes nesse continente (BALIRAINÉ et al., 2011; JELINEK et al., 1995; PALMIERI et al., 2004; PRADINES et al., 2010). A recomendação atual é que sempre que necessário utilize-se o quinino em combinação com os antibióticos tetraciclina, deoxiciclina, clindamicina ou sulfadoxina-pirimetamina para tratamentos de casos não-complicados de malária (SUH; KAIN; KEYSTONE, 2004).

A mefloquina foi desenvolvida a partir de análogos do quinino durante a segunda guerra, mas seu uso terapêutico começou na década de 1980 visando o tratamento de cepas multi-resistentes a drogas. Estudos realizados com isolados africanos no Camarões mostrou que a mefloquina foi eficiente no controle de 119 cepas cloroquina-sensíveis e cloroquina-resistentes (RINGWALD; BICKII; BASCO, 1996). Foi intensamente utilizada na Ásia, onde a resistência a essa droga surgiu rapidamente. Estudos realizados em 2003 mostraram que a sua eficiência pode chegar a apenas 62% em determinadas áreas da Tailândia (VIJAYKADGA et al., 2006). O estudo também avaliou o uso da terapia combinada com artesunato e constatou redução na eficiência dessa combinação. Possivelmente essa perda de eficiência está associada ao uso da

mefloquina como monoterapia por diversos anos na Tailândia (VIJAYKADGA et al., 2006). Suas características farmacológicas possibilitam seu uso profilático com doses semanais, porém, o relato de casos de problemas psiquiátricos (insônia, depressão e ataques de pânico) associados a sua utilização tornou inaceitável seu uso por viajantes.

Outra droga descoberta durante a segunda guerra e desenvolvida apenas na década de 1980 é o halofantrine. Essa é uma droga altamente lipofílica, sendo recomendado seu uso com o consumo de comidas gordurosas. Sua estrutura é bastante semelhante a da mefloquina e estudos realizados na Tailândia com parasitas resistentes a mefloquina mostram que essas drogas possuem resistência-cruzada (KETRANGSEE et al., 1992; WONGSRICHANALAI et al., 1992). Assim como a mefloquina, essa droga é bastante ativa em cepas resistentes a cloroquina, apresentando um IC_{50} médio de 1,2 nM em cepas resistentes do Camarão (RINGWALD; BICKII; BASCO, 1996). Apesar da efetividade em cepas resistentes a resistência cruzada com a mefloquina e problemas na absorção devido a grande lipofilicidade podem acelerar o aparecimento de cepas resistentes a halofantrine (BRASSEUR et al., 1993; BRYSON; GOA, 1992; CARME et al., 1993).

Apesar de ser melhor tolerada por pacientes, por não apresentar os efeitos colaterais gástricos e psiquiátricos da mefloquina, o uso de halofantrine é associado a sérios riscos cardíacos. Um estudo realizado na fronteira da Tailândia com a Birmânia monitorou a atividade cardíaca de pacientes após o uso de mefloquina e halofantrine. O tratamento com mefloquina não apresentou nenhum efeito cardíaco enquanto o tratamento com halofantrine induziu um prolongamento dose-dependente no intervalo PR-QT em todos 61 pacientes que receberam tratamento, inclusive com relato de óbito (NOSTEN et al., 1993). Devido a esse importante efeito colateral, essa droga foi retirada de circulação de diversos países e seu uso encontra-se bastante limitado.

Lumefantrine é uma droga estruturalmente similar ao halofantrine, desenvolvida na década de 1970 por pesquisadores chineses. Apesar dessa semelhança estrutural, o tratamento com lumefantrine não apresenta as complicações cardíacas ocasionadas pelo halofantrine (VUGT et al., 1999). Devido ao seu efeito sinérgico com artemisininas, em 1992 na China, foi realizado seu registro de uso terapêutico associado ao artemeter. Em 1999 essa associação foi registrada sob o nome de Coartem pela Novartis e passou a ser amplamente utilizada na África (CUI; SU, 2009; MAKANGA et al., 2011). O fato do

lumefantrine nunca ter sido utilizado como monoterapia constitui uma vantagem no retardamento do aparecimento de resistência. Estudos recentes, entretanto, têm demonstrado que a associação de artemeter e lumefantrine seleciona genótipos que podem alterar a resposta a essas combinação (DOKOMAJILAR et al., 2006; SISOWATH et al., 2005). As artemisininas são compostos com uma meia-vida de eliminação curta (1-6 horas) enquanto o lumefantrine apresenta uma meia-vida longa (3-6 dias) (EZZET; MULL; KARBWANG, 1998; TEJA-ISAVADHARM et al., 2010). Essa diferença no tempo de eliminação gera um período de monoterapia com lumefantrine ao final do tratamento, o que pode levar a seleção de genótipos resistentes.

Apesar das semelhanças estruturais e da mesma organela como alvo de ação as 4-aminoquinolinas e aril-aminoálcoois não compartilham o mesmo mecanismo de ação na sua atividade antimalárica. Mutações no gene do transportador PfCRT que conferem resistência a cloroquina aumentam a suscetibilidade ao quinino e a mefloquina (SIDHU; VERDIER-PINARD; FIDOCK, 2002), indicando que possivelmente existem dois diferentes alvos no vacúolo digestivo do parasita.

Suportando essa hipótese, mostrou-se que em cepas cloroquina-sensíveis o tratamento com quinino e mefloquina não apresentou as alterações típicas encontradas no tratamento com cloroquina, como o excesso de FPPIX não-dimerizada (CHOU; FITCH, 1992) ou o acúmulo de hemoglobina (OLLIARO et al., 1989). Interessantemente, observou-se que esses aril-aminoálcoois quando adicionados após o tratamento com cloroquina são capazes de reverter o acúmulo de hemoglobina (FITCH et al., 2003), e a inibição da polimerização do heme (CHOU; FITCH, 1992; 1993; FITCH; CHOU, 1997). Provavelmente esse efeito antagonista está relacionado a inibição da endocitose pelo quinino e mefloquina, bloqueando o transporte da hemoglobina até o vacúolo digestivo (FAMIN; GINSBURG, 2002; HOPPE et al., 2004). Basicamente, as 4-aminoquinolinas alterariam o transporte das vesículas contendo hemoglobina até o vacúolo digestivo, além de inibir a formação da hemozoína através da interação com a FPPIX (HOPPE et al., 2004; ZHANG, J.; KRUGLIAK; GINSBURG, 1999). Por outro lado, os aril-aminoálcoois inibiriam a formação das vesículas, além de também inibir a formação da hemozoína, porém de forma menos preponderante (EGAN; ROSS; ADAMS, 1994; HOPPE et al., 2004).

A principal droga pertencente a classe das 8-aminoquinolinas é a primaquina. Essa droga possui uma ação única em gametócitos e formas infectivas do fígado conferindo uma capacidade profilática superior a essa droga. A primaquina é ativa em todas as espécies de *Plasmodium*, e possui um papel determinante na cura completa da infecção por *P. vivax* e *P. ovale* devido a sua atividade singular nos hipnozoítos, formas responsáveis pelas recaídas tardias da doença (BAIRD, 2004; KROTOSKI et al., 1986; PUKRITTAYAKAMEE et al., 2004; UDOMSANGPETCH et al., 2008). Além disso, sua atividade em gametócitos confere a essa droga a capacidade de diminuir a taxa de transmissão da infecção de humanos para mosquitos, diminuindo dessa forma a propagação da doença (PUKRITTAYAKAMEE et al., 2004). Apesar do exposto, a primaquina não possui atividade significativa nas formas intra-eritrocíticas.

O mecanismo de ação exato da primaquina nas formas hepáticas e gametócitos ainda não foi esclarecido. Alguns trabalhos mostram que o metabolismo da mitocôndria do parasita é perturbado após a administração da primaquina, e é hipotetizado que talvez essa droga interfira na função da ubiquinona.

Em relação aos casos de resistência à primaquina, estes são pouco frequentes, e avaliações *in vivo* não encontram correlação em casos clínicos (VALE; MOREIRA; GOMES, 2009). Alguns casos de relapsos no tratamento de *P. vivax* foram relatados na Ásia e América do Sul (AJDUKIEWICZ; ONG, 2007). O principal problema associado ao uso da primaquina é um efeito colateral sério nos eritrócitos de pacientes com deficiência nos níveis da glicose-6-fosfato-dehidrogenase (G6PD). O uso dessa droga em pessoas com deficiência na enzima G6PD causa anemia hemolítica apresentando altos índices de óbito. Essa deficiência é prevalente na África, exigindo cautela no uso da primaquina nessa população e sendo altamente aconselhável o teste do paciente em relação à G6PD (BEUTLER; DUPARC; GROUP, 2007). Apesar das características antimaláricas únicas da primaquina várias vezes o tratamento com essa droga é abandonado devido a impossibilidade de se testar a deficiência de G6PD (WHITE, 2008).

1.6.2 Antifolatos

A classe dos antifolatos pertence aos antimaláricos mais utilizados na atualidade, porém o rápido aparecimento de resistência ao seu tratamento tem prejudicado a sua eficiência. Os antifolatos utilizados no tratamento da malária estão divididos em duas classes: inibidores da dihidropteroato sintase (DHPS) e os inibidores da dihidrofolato redutase (DHFR). A combinação dessas duas classes de droga é sinérgica e geralmente são usados em combinação no tratamento da infecção por *Plasmodium*.

A inibição da via dos folatos resulta na diminuição da síntese das pirimidinas, resultando na redução da síntese de DNA, além da diminuição da produção de serinas e metioninas. Um fato importante no sucesso do uso de antifolatos como antimaláricos é o fato de que em humanos não existe a enzima DHPS e a DHFR é bastante diferente possibilitando a criação de inibidores seletivos.

Diferente das quinolinas que não possuem o mecanismo de ação completamente elucidado, a interação dos inibidores da via do folato com o seu alvo é bastante conhecido. Os inibidores da DHFR mimetizam o substrato natural dessa enzima, o dihidrofolato, e compete com o substrato pelo sítio ativo da DHFR, evitando que o DHF (dihidrofolato) seja reduzido a THF (tetrahidrofolado, co-fator necessário para biossíntese da timidilato, purinas e certos aminoácidos), (PARENTI et al., 2004; RASTELLI et al., 2000). Já as sulfanamidas, inibidores da DHPS, mimetizam o ácido p-aminobenzóico (PABA), bloqueando a formação da dihidropteroato (ZHANG, Y.; MESHNICK, 1991).

Devido a sinergia entre as duas classes de inibidores eles usualmente são utilizados em combinação no tratamento da malária. A sulfadoxina + pirimetamina formam uma combinação barata e bem tolerada, comercializada pelo nome Fansidar. Essas drogas apresentam uma meia vida longa (superior a 80 horas) protegendo o paciente por um longo período de tempo após o final do tratamento. Reações dermatológicas importantes fizeram com que essa combinação fosse desaconselhada como agente profilático em viajantes (MULLER, H. E., 1986). A distribuição rápida da resistência a essa combinação nas regiões endêmicas da malária é preocupante, pois em vários países é a única opção barata e efetiva às 4-aminoquinolinas (cloroquina e amodiaquina). Os primeiros relatos de resistência na África começaram na década de

1980 e atualmente encontra-se focos de resistência por todo continente africano (LANDGRAF et al., 1994; NZILA et al., 2000). Além da África, altos níveis de resistência ao tratamento com sulfadoxina-pirimetamina podem ser encontrados na Ásia e América do Sul (MASIMIREMBWA et al., 1999; VASCONCELOS et al., 2000).

Além desses anti-folatos, outros representantes dessa classe são utilizados no combate da malária. Proguanil, o primeiro antifolato usado como antiparasitário, atualmente é utilizado numa combinação com a atovacona (Malarone), agindo de forma sinérgica na mitocôndria. O cloroproguanil, cujo metabólito clorocicloguanil inibe a atividade da DHFR, é vendido em combinação com dapsona, um inibidor da DHPS. Pode-se encontrar dapsona também em combinação com a pirimetamina como antimalárico.

1.6.3 Artemisininas

O maior avanço do último século na busca por um tratamento eficaz a malária foi o isolamento da artemisinina na China. Como dito anteriormente, a artemisinina é isolada a partir da planta chinesa *Artemisia annua*. Essa droga pertence à classe das lactonas sesquiterpênicas e possui uma ação eficiente em praticamente todas as cepas conhecidas de *P. falciparum* (DING; BECK; RASO, 2011). A artemisinina é eficaz em todos os estágios intraeritrocíticos de desenvolvimento do *Plasmodium* e uma importante característica dessa classe de drogas é seu efeito nos gametócitos jovens, o que diminui a taxa de transmissão do *Plasmodium* (KUMAR; ZHENG, 1990; TARGETT, 2011). Além disso, ela consegue rapidamente chegar ao plasma fazendo com que a sua administração reduza rapidamente a parasitemia no paciente.

Por se tratar de uma droga semi-sintética sua produção envolve um primeiro passo de extração do composto ativo a partir do extrato vegetal e posterior modificação química que aprimora as propriedades farmacológicas dessa droga (DING; BECK; RASO, 2011). Essa forma de síntese encarece a produção e faz com que seja dependente da disponibilidade da *Artemisia annua*. Os principais derivados semi-sintéticos da artemisinina utilizados na terapia combinada com artemisininas (ACT) são o artemeter, artesunato e a dihidroartemisinina. Todos esses compostos compartilham o mesmo metabólito ativo, a dihidroartemisinina (SCHLITZER, 2007). Atualmente está

em teste o uso de *Saccharomyces cerevisiae* modificada geneticamente para produzir o ácido artemisinico, precursor da artemisinina (RO et al., 2006).

Apesar da eficiente atividade antimalárica o maior problema associado a terapia com artemisinina está relacionado as altas taxas de recrudescência devido a sua meia-vida ser entre 1-3 horas (EASTMAN; FIDOCK, 2009). Em virtude dessa característica farmacológica o tratamento com artemisininas deve ser feito sempre em combinação com outras drogas.

Apesar da importância atual no tratamento da malária as artemisininas ainda não possuem o seu mecanismo de ação elucidado e diferentes hipóteses são discutidas na literatura. Sabe-se que a característica estrutural chave para a ação antimalárica das artemisininas é a ponte endoperóxido na sua estrutura (DING; BECK; RASO, 2011). Basicamente quatro modelos tentam explicar o seu mecanismo de ação e todos concordam que as artemisininas precisam ser ativadas através da clivagem da ponte endoperóxido. As hipóteses sugerem que as artemisininas estariam interferindo em diferentes vias, entre elas: i) via de detoxificação do heme; ii) alquilação de proteínas do *Plasmodium* iii) inibição da PFATPase6; iv) funcionamento da mitocôndria.

A primeira hipótese postula que o Fe^{2+} contido na molécula do heme cliva a ponte endoperóxido no vacúolo digestivo produzindo radicais livres de artemisininas que em contrapartida alquilam moléculas do heme e interferem na sua detoxificação (Meunier e Robert, 2010). Além disso, Hartwig et al. (2009) utilizando artemisinina fluorescente, mostraram que a mesma acumula-se no vacúolo digestivo.

A segunda hipótese diz que moléculas de Fe^{2+} não-relacionados ao heme estariam ativando a artemisinina, que alquilaria proteínas do parasita que levariam a sua morte. Experimentalmente, LI, J.; ZHOU (2010) e HAYNES; KRISHNA (2004) mostram que artemisininas que não interagiram com moléculas do heme também são ativadas e exibem propriedades antimaláricas.

Já na terceira hipótese, os autores ressaltam a semelhança estrutural das artemisininas com a tapsigargina, que também é uma lactona sesquiterpênica. Sabe-se que a tapsigargina é um inibidor da Ca^{2+} ATPase de retículo sarco-endoplasmático de mamíferos, o que levou Eckstein-ludwig et al. (2003) propor que as artemisininas poderiam inibir ortólogo da SERCA em *Plasmodium*, a proteína PfATPase6. Eckstein-

Ludwig et al. (2003) mostrou que as artemisininas foram capazes de inibir a atividade da PfATPase6 expressas no sistema heterólogo de *Xenopus*. Os controles cloroquina e a deoxiartemisinina (composto inativo, sem ponte endoperóxido) não foram capazes de interferir na atividade dessa ATPase, mostrando a especificidade da atividade dessa droga.

Wang et al. (2010) mostraram que as artemisininas induzem a despolarização da membrana mitocondrial em *P. berghei*. Além disso, utilizando microscopia confocal, os autores mostram que a droga co-localiza-se com a mitocôndria do parasita. Foi medida a produção de ROS pelas artemisininas na mitocôndria, e ficou evidente que essa produção levaria a ativação da artemisinina, o que levaria a interferência no funcionamento da mitocôndria.

Em relação a resistência ao tratamento com artemisininas ainda não existem relatos preocupantes. Em 2006, na fronteira entre a Tailândia e Camboja dois estudos avaliando aproximadamente 100 pacientes relataram diminuição da eficácia de artemisininas no tratamento do *Plasmodium falciparum* em uma pequena porcentagem dos pacientes avaliados (DONDORP et al., 2011; DONDORP et al., 2009; NOEDL; SOCHEAT; SATIMAI, 2009).

1.6.4 Hidroxinaftoquinonas

As hidroxinaftoquinonas têm sido investigadas extensivamente nos últimos 50 anos por conta de sua atividade antimalárica (SRIVASTAVA; ROTTENBERG; VAIDYA, 1997). O hidrolapachol foi a primeira molécula descoberta dessa classe que possuía atividade contra o parasita da malária. Essa descoberta, que emergiu numa época de grande interesse em antimaláricos, resultou na produção de uma grande família de diferentes análogos do hidrolapachol. Entretanto, o advento da cloroquina como um antimalárico oral barato, biologicamente estável e de baixa dosagem, associado aos problemas de estabilidade de algumas hidroxinaftoquinonas e as altas doses terapêuticas, levou ao desinteresse no aprimoramento e desenvolvimento de novas naftoquinonas (FIESER; BERLINER; ET AL., 1948; FIESER et al., 1967b; FIESER et al., 1967a). Porém, com o aparecimento de diversas cepas resistentes a cloroquina, as propriedades antimaláricas dessas substâncias voltaram a ser de interesse científico e levaram a descoberta do mecanismo de ação dessas drogas, que inibem efetivamente o

transporte de elétrons no sítio da ubiquinona (coenzima Q) (**Figura 8**) (FRY et al., 1984; Porter; Folker, 1974).

A hidroxinaftoquinona com atividade antimalárica mais promissora desenvolvida é a atovacona. Seu mecanismo de ação é através da inibição da cadeia respiratória mitocondrial do parasita. Fry; Pudney et al. (1992) isolaram o mitocôndria de *P. falciparum* e *P. yoelli* e mostraram que essa droga possui ação potente e específica quando comparada ao mitocôndria isolado de fígado de camundongos. Além disso, a atovacona inibiu a atividade da citocromo c redutase, mostrando que seu alvo no mitocôndria é o complexo da citocromo-bc1 (**Figura 8**). Estruturalmente a atovacona é semelhante a ubiquinona (coenzima Q), componente fundamental da cadeia respiratória mitocondrial (KESSEL et al., 2007; SRIVASTAVA et al., 1999). A ubiquinona transporta elétrons até o complexo da citocromo bc1, e esse transporte é dependente da ligação da ubiquinona ao sítio de ligação Q₀ da citocromo. A ação da atovacona é nesse sítio, bloqueando o transporte de elétrons, levando ao colapso do potencial de membrana mitocondrial (SRIVASTAVA; ROTTENBERG; VAIDYA, 1997; SRIVASTAVA et al., 1999). Esse colapso levaria a uma inibição das enzimas mitocondriais, entre elas a diidro-orotato desidrogenase (DHOD), essencial para a síntese de pirimidinas em *Plasmodium* (HAMMOND; BURCHELL; PUDNEY, 1985).

Apesar da eficiência da atovacona em inibir o funcionamento mitocondrial do *Plasmodium*, quando administrada sozinha, essa droga apresenta altos índices de recrudescência (CHIODINI et al, 1995). Comercialmente a atovacona é vendida em associação com proguanil (Malarone, GSK) que atua sinergicamente, potencializando o efeito antimalárico e evitando a recrudescência.

A atovacona possui uma excelente atividade antimalárica, mas possui baixa biodisponibilidade e liga-se a proteínas plasmáticas (DRESSMAN; REPPAS, 2000). Buscando melhorar a biodisponibilidade dessa droga, diversos análogos de atovacona foram sintetizados e estão descritos na literatura (DANOUN et al., 1999; EL HAGE et al., 2009; HUGHES et al., 2010; HUGHES et al., 2011). As mudanças são feitas principalmente nos grupos substituintes das naftoquinonas, especialmente na cadeia lateral alquilada, pois é sabido que modificando essa porção altera-se a atividade da droga e reverte-se a resistência a atovacona (HUGHES et al., 2011).

Atualmente já existem relatos de resistência a atovacona, e alguns já estão relacionados às mutações no gene da citocromo b (AFONSO et al., 2010; LEGRAND et al., 2007; PERRY et al., 2009). Esta situação é alarmante, uma vez que a atovacona é utilizada como adjuvante em tratamentos de casos complicados ou severos de malária. Hughes et al. (2011) mostrou que novas hidroxinaftoquinonas com modificações no anel quinonoídico tiveram uma boa performance contra cepas de *P. falciparum* atovacona-resistentes. Essas mesmas drogas foram capazes de inibir o complexo da citocromo-bc1 de leveduras, bem como complexos mutantes resistentes a atovacona nesses organismos.

Figura 8- Mecanismo de ação proposto para a atovacona, que liga-se ao complexo citocromo bc1 rompendo a cadeia de elétrons o que leva a perda do potencial de membrana mitocondrial.

1.7 Citometria de fluxo e *Plasmodium falciparum*

A microscopia é considerada o método padrão para avaliação da parasitemia, porém, trata-se de um método trabalhoso e muitas vezes subjetivo. A variação na análise na maioria das vezes deve-se a diferentes métodos de leituras das lâminas ou mesmo a qualidade dos esfregaços analisados. A citometria de fluxo (FCM) é uma

metodologia robusta para avaliação de eritrócitos infectados assim como para a discriminação dos diferentes estágios de desenvolvimento do *Plasmodium* de forma menos subjetiva (GRIMBERG et al., 2009; LI, Q. et al., 2007; SHAPIRO; MANDY, 2007; SHAPIRO; ULRICH, 2010; THERON et al., 2010). Diferentes metodologias de detecção do parasita da malária por FCM foram desenvolvidas levando em conta a vantagem de o eritrócito não possuir DNA. Diferentes marcadores como laranja de acridina (BHAKDI et al., 2007; SAITO-ITO et al., 2001), hidroetidina (CHEVALLEY et al., 2010; VAN DER HEYDE et al., 1995), SYTO 61 (FU et al., 2010) e Laranja de Tiazol (JOUIN et al., 2004) já foram empregados para a determinação da parasitemia de culturas de *P. falciparum* por citometria de fluxo. Alguns trabalhos anteriores utilizando YOYO-1 mostraram que esse marcador possui alta afinidade por DNA e consegue perfeitamente discriminar eritrócitos infectados de eritrócitos não infectados. (BARKAN; GINSBURG; GOLENSER, 2000; CAMPO et al., 2011; LI, Q. et al., 2007). Nesse trabalho um dos marcadores usados foi o marcador de ácidos nucleicos YOYO-1, que não é fluorescente quando em solução (HIRONS; FAWCETT; CRISSMAN, 1994), porém, quando complexado com dsDNA aumenta a sua fluorescência em até 1000 vezes (Yarmoluk, Kovalska et al., 2008). Uma das facilidades desse marcador é que este pode ser excitado usando-se laser de 488 nm, equipamento padrão na maioria dos citômetros. Além disso é 500 vezes mais sensível que brometo de etídeo e possui uma menor variabilidade na marcação do que outros intercalantes de DNA como iodeto de propídeo ou Hoescht (MARIE; VAULOT; PARTENSKY, 1996; RYE et al., 1992).

Além dos marcadores tradicionais de DNA, é possível usar para citometria marcadores de células viáveis (WYATT; GOFF; DAVIS, 1991). Dentre eles, um de fácil utilização é a hidroetidina. Esse composto penetra as membranas e em células metabolicamente ativas é oxidado a brometo de etídeo, que possui afinidade por ácidos nucleicos (JOUIN et al., 2004). Da mesma forma que na utilização de YOYO-1 não é necessário equipamentos que possuam UV, uma vez que o marcador pode ser excitado utilizando laser de 488 nm. A hidroetidina mostrou-se muito eficiente em distinguir células infectadas de não-infectadas e capaz de distinguir as diferentes formas do parasita (VAN DER HEYDE et al., 1995). Wyatt et al. (1991) mostraram que com o emprego desse marcador vital é possível obter resultados comparáveis aos da incorporação de [³H] hipoxantina, sem as dificuldades relacionadas a radioatividade.

2 OBJETIVOS

Buscando avaliar novos compostos que possuam atividade no ciclo de vida do *Plasmodium* e que possam servir de base para futuro desenvolvimento de novos antimaláricos, os objetivos desse trabalho foram:

- Padronizar a avaliação da parasitemia e fases de desenvolvimento intraeritrocítico através do uso da citometria de fluxo e marcadores fluorescentes.
- Testar uma série de 10 compostos sintéticos baseados na estrutura do hormônio melatonina, avaliando a capacidade desses compostos em modular o ciclo intraeritrocítico do *Plasmodium falciparum* bem como avaliar compostos que possam exibir atividade antimalárica.
- Testar a atividade antimalárica de uma série de 5 compostos sintéticos baseados na estrutura da lausona, bem como avaliar citotoxicidade *in vivo*, mecanismo de ação e atividade *in vivo* no modelo murino de infecção com *P. berghei*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *P. falciparum*: cultivo e isolamento de parasitas

O parasita *P. falciparum* (cepa 3D7) foi mantido em cultura contínua em estufa de cultura ajustada em 37° C. Como meio de cultura foi utilizado RPMI 1640 (GIBCO by Life Technologies) com 0,04% de sulfato de gentamicina (Sigma-Aldrich, USA), 0,05% de hipoxantina (Sigma-Aldrich, USA), 0,23% de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich, USA) suplementado com 10% de soro humano de acordo com TRAGER, W.; JENSEN, J. B. (1976). A cultura foi mantida sob atmosfera de 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂. As hemácias e plasma humano A⁺ ou O⁺ foram doadas pelo Centro de Hemoterapia do Hospital do Servidor para manutenção dos parasitas em cultura. Visando inativar o sistema complemento dos soros doados, as bolsas de soro humano foram inativadas antes do uso através da incubação a 55°C por uma hora. Diariamente foi acompanhada a parasitemia, através da realização de esfregaços corados com Panótico (Rápido LB) e exame das lâminas por microscopia. As garrafas foram mantidas numa parasitemia média de 5%, nunca superior a 10%.

Quando necessário, a cultura foi sincronizada utilizando D-sorbitol (Sigma-Aldrich, USA) para lisar de forma seletiva as formas maduras do *Plasmodium* (LAMBROS; VANDERBERG, 1979). A cultura foi centrifugada a 2000 rpm durante 5 minutos. O meio de cultura retirado e adicionado 10 ml da solução estéril de D-sorbitol 5%. As células então são incubadas por 15 minutos a 37° C e novamente centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. A solução de D-sorbitol é retirada e as células ressuspensas em meio de cultura são devolvidas a estufa para cultura. A parasitemia e sincronia foram monitoradas através de lâminas coradas com o corante Panótico (Rápido LB).

3.2 Cultivo das células HEK293T

Células HEK293T foram cultivadas em meio DMEM (Life Technologies, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml), em estufa com 5% de CO₂ a 37° C.

O meio de cultura das garrafas foi trocado a cada três ou quatro dias. Quando necessário, as células foram repicadas na proporção de 1:4. O procedimento consiste em retirar o meio da garrafa, lavar as células com HBSS (5,4 mM KCl, 0,3 mM Na₂PO₄, 0,4 mM KH₂PO₄, 4,2 mM NaHCO₃, 0,5 mM MgCl₂, 0,6 mM MgSO₄, 5,6 mM D-glucose, 136,9 mM NaCl) e soltar as células do substrato com 0,25% tripsina (Cultilab). A suspensão foi diluída em meio de cultura, acrescido de 10% FCS e distribuída em várias garrafas, no caso de expansão ou uma fração é transferida para outra garrafa, no caso de subcultura.

3.3 Citometria de fluxo como ferramenta na análise do efeito de novos compostos no ciclo intraeritrocítico do *P. falciparum* *in vivo* utilizando o marcador de DNA YOYO-1.

Após a incubação com os novos compostos as células infectadas com *P. falciparum* foram fixadas em formaldeído 2% (v/v) (Sigma-Aldrich, Stenheim, Alemanha) diluído em PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM NaH₂PO₄, pH 7,4; Sigma-Aldrich, Stenheim, Alemanha) por 24 horas a temperatura ambiente num volume de 200 µl. Essas células então foram lavadas duas vezes com PBS (centrifugação 2000 rpm), permeabilizadas e marcadas ao mesmo tempo num volume de 200 µl utilizando Triton X-100 0,1% (v/v) (Sigma-Aldrich, Stenheim, Alemanha) e 5 nM de YOYO-1 (Molecular Probes, Eugene, EUA) durante 30 minutos. Após o tempo de incubação as amostras foram transferidas para tubos de FACS (Becton, Dickinson and Company, New York, EUA) e adicionado 800 µl de PBS a cada amostra. A parasitemia e a proporção de cada um dos estágios foram determinados através de citometria de fluxo utilizando o equipamento FACS Calibur. A excitação da fluorescência foi feita com o laser Argon (488 nm) e a emissão da fluorescência (aproximadamente 510 nm) foi coletada no fotomultiplicador FL-1 (530/30nm). O *gating* inicial foi realizado utilizando células infectadas não-marcadas e células não-infectadas marcadas como controle para determinar a autofluorescência dos eritrócitos. A parasitemia foi determinada através do dot plot (*side scatter* (SSC) versus

fluorescência (FL-1)) de 10^5 células adquiridas utilizando o *software* Cellquest (Becton, Dickinson and Company, New York, EUA). As análises foram realizadas no programa FlowJo (versão 7.6, Tree Star INC, Ashland, EUA). As configurações do equipamento foram obtidas após padronização e são as seguintes: FSC (escala log, E-1), SSC (escala log, 269), FL-1 (escala log, 530) e a compensação FL1- 0,8% FL2 e FL1- 23,6% FL2.

Os compostos apresentados nessa tese foram diluídos em etanol absoluto (série TP e ME) ou DMSO (hidroxinaftoquinonas) conforme a Tabela 1. As diluições dos experimentos foram feitas em meio de cultivo.

Tabela 1- Solução estoque dos compostos utilizados nessa tese, concentração de 10 mM.

Composto	Peso Molecular	Peso (g)	Volume/Solvente
ME02	260,15	0,0026	1 ml/ etanol absoluto
ME03	288,18	0,0029	1 ml/ etanol absoluto
ME04	294,13	0,0029	1 ml/ etanol absoluto
ME05	248,27	0,0025	1 ml/ etanol absoluto
ME06	190,11	0,002	1 ml/ etanol absoluto
MEL	232,12	0,0023	1 ml/ etanol absoluto
TP01	202,25	0,002	1 ml/ etanol absoluto
TP02	230,14	0,0023	1 ml/ etanol absoluto
TP03	258,17	0,0026	1 ml/ etanol absoluto
TP04	264,12	0,0026	1 ml/ etanol absoluto
TP05	218,1	0,0022	1 ml/ etanol absoluto
N1	188,18	0,0019	1 ml/ DMSO
N2	264,28	0,0026	1 ml/ DMSO
N3	294,27	0,0029	1 ml/ DMSO
N4	209,27	0,0021	1 ml/ DMSO
N5	230,26	0,0023	1 ml/ DMSO
Atovacona	366,84	0,0037	1 ml/ DMSO

3.4 Mudanças no potencial de membrana mitocondrial ($\Psi\Delta_{mit}$) após adição de compostos

Os parasitas foram retirados da cultura, centrifugados por 1 minuto a 2000 rpm, e ressuspensos em meio de cultura padrão, descrito na seção 3.1, contendo 5 μ M de Mitotracker Red CMXROS (Molecular Probes, Eugene, EUA). Os parasitas foram incubados por 30 minutos, a 37° C, no escuro. Após o período de incubação foi adicionado os compostos N3 e atovacona (Sigma-Aldrich, Stenheim, Alemanha), a partir de um estoque 20 mM em DMSO, nas seguintes concentrações: 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 e 100 μ M. Os compostos permanecem incubador por 30 minutos, a 37° C, no escuro e após o tempo de incubação as células marcadas são centrifugadas por 1 minuto a 2000 rpm e é adicionado 1 ml de PBS. As amostras são transferidas para tubos de FACS e procede-se a leitura no citômetro de fluxo FACS Calibur. A excitação da fluorescência foi feita com o laser Argon (488 nm) e a emissão da fluorescência (aproximadamente 567 nm) foi coletada no fotomultiplicador FL-2 (585/42 nm). O *gating* das células com potencial de membrana positivo foi determinado através do *dot plot* (*side scatter* (SSC) versus fluorescência (FL-2)) de 10⁵ células do controle (DMSO) marcado com Mitotracker Red CMXROS. Já a região de células com membrana mitocondrial despolarizada foi definida através do *dot plot* (*side scatter* (SSC) versus fluorescência (FL-2)) de 10⁵ células dos controles (CCCP, desacoplador do potencial de membrana mitocondrial). A aquisição foi realizada utilizando o software Cellquest. As análises foram realizadas no programa FlowJo. As configurações do equipamento foram obtidas após padronização e são as seguintes: FSC (escala log, E-1), SSC (escala log, 269), FL-2 (escala log, 630) e a compensação FL1- 0,8% FL2 e FL1- 23,6% FL2.

3.5 Ensaio de citotoxicidade em células HEK 293T

A citotoxicidade das hidroxinaftoquinonas em células de mamíferos foi avaliada através do ensaio de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol brometo, um cristal amarelo) Mossman (1983), um método tradicional para avaliação da proliferação celular e citotoxicidade. O MTT é incorporado pelas células e é reduzido formando o formazan, um cristal de cor azul que se acumula no endossomo e lisossomo das células. A redução do MTT ocorre através da ação de desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, sendo sua produção associada a atividade fisiológica de células vivas. Para o ensaio foram semeadas 10⁵ células/poço adicionado meio de cultura completo e

incubado a 37 °C em estufa de CO₂ 5%. Após as 24 horas o meio foi removido e substituído por meio contendo 0,1% SBF (450 µl/poço) com diferentes concentrações do composto N3 e atovaquona nas seguintes concentrações: 0,128; 0,64; 3,2; 4; 80 e 400 µM. As células foram então incubadas por 48 horas. Após o período de incubação, foi adicionado meio de cultivo contendo MTT (5 mg/L) diluído 5 vezes. As células foram incubadas por 3 horas em estufa de cultivo contendo 5% de CO₂ a 37° C. Após o período de incubação a solução contendo MTT foi retirada cuidadosamente e as células ressuspensas em 100 µl de DMSO. As células então foram incubadas com agitação suave por 15 minutos até a completa solubilização do cristal de formazan. A absorbância foi então lida num espectrofotômetro na faixa de 570 nm.

3.6 Efeito de novos compostos em camundongos Balb/C infectados com *P. berghei* ANKA GFP

Grupos de cinco camundongos machos Balb/C foram intraperitonealmente infectados com 10⁶ células infectadas com *P. berghei* ANKA GFP, cedidos gentilmente pela Prof. Dra. Maria Regina D'Imperio Lima. Quatro horas após a infecção foi iniciado o tratamento com a hidroxinaftoquinona N3 (nas concentrações 20; 10; 5 e 0,5 mg/Kg/dia) e uma solução 7%(v/v) Tween-80+ 3% DMSO (v/v) em PBS como controle. Os compostos foram administrados através de injeção intraperitoneal, e as doses foram administradas no mesmo horário nos três dias seguintes, exatamente 24, 48 e 72 horas após a infecção. Foram também avaliados grupos controles, que não foram infectados, mas que receberam as mesmas quantidades do composto N3.

De acordo com o ensaio de supressão de parasitemia em 4 dias descrito em (FIDOCK ET AL., 2004), no quarto dia após a infecção foi coletado sangue da cauda de cada camundongo. Pontos adicionais no oitavo, nono e décimo terceiro dia foram coletados. O sangue coletado da cauda do camundongo foi lavado com PBS, centrifugado por 1 minuto a 8700 g a 4 °C. As células transferidas para tubos de FACS e adicionado 800 µl de PBS. A parasitemia foi determinada através de citometria de fluxo utilizando o equipamento FACS Calibur. A excitação da fluorescência foi feita com o laser Argon (488 nm) e a emissão da fluorescência (aproximadamente 525 nm) foi coletada no fotomultiplicador FL-1 (530/30nm). O *gating* inicial foi realizado utilizando células não-infectadas e células infectadas contendo parasitas expressando a

proteína fluorescente verde (GFP). A parasitemia foi determinada através do dot plot (*side scatter* (SSC) versus fluorescência (FL-1)) de 10^5 células adquiridas utilizando o software Cellquest. As análises foram realizadas no programa FlowJo. Os camundongos foram monitorados por 30 dias, sendo as mortes registradas diariamente.

3.7 Análise estatística e cálculos de cLogP

A parasitemia e distribuição das diferentes fases de desenvolvimento do *Plasmodium* obtidas nos diferentes experimentos foram analisadas utilizando o teste de múltipla variância (ANOVA) seguido do pós-teste de comparação múltipla de Newman-Keuls ou Student-test seguido do pós-teste de Dunnet. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados para cada ensaio. Todas as análises foram feitas no programa GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, EUA).

O coeficiente de partição (cLogP) dos ativos sintetizados e apresentados nessa tese foi calculado utilizando-se o *software* Osiris property explores (<http://www.organic-chemistry.org/prog/>).

4 RESULTADOS

4.1 Citometria de fluxo como ferramenta para analisar mudanças no ciclo celular de *Plasmodium falciparum*

Buscando padronizar a análise por citometria de fluxo de formas jovens (mononucleadas) e maduras (multinucleadas) de *P. falciparum* (3D7) utilizamos o marcador de DNA YOYO-1 (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Esse marcador é impermeável às membranas celulares e possui alta afinidade aos ácidos nucleicos. Quando ligado a fita dupla de DNA aumenta sua fluorescência em aproximadamente 100 vezes (YARMOLUK; KOVALSKA; LOSYTSKYY, 2008). Os marcadores assimétricos vem sendo utilizados devido as suas propriedades espectrais: possuem alto coeficiente de extinção na região do espectro visível, baixa intensidade de fluorescência intrínseca e aumento significativo da fluorescência quando ligados aos ácidos nucleicos (YARMOLUK; KOVALSKA; LOSYTSKYY, 2008).

Para padronizar o uso da citometria de fluxo em *P. falciparum*, utilizamos eritrócitos não-infectados e infectados e buscamos definir a população contendo hemácias dos possíveis debris celulares, definindo os parâmetros FSC (que analisa o volume celular) e SSC (que varia com a complexidade interna da célula) (**Figura 9A**). Após a definição dos parâmetros que medem tamanho e forma da célula, determinamos os parâmetros fluorimétricos. A intensidade de cada detector foi ajustada e compensada, eliminando a sobreposição da auto-fluorescência e emissão de fluorescência do fluorocromo escolhido (**Figura 9, B,C**). A partir dessas definições, realizou-se o *gating* das populações de eritrócitos infectados e não-infectados (**Figura 9, D, E**).

Figura 9- Padronização dos parâmetros de leitura do citômetro de fluxo. (A, B) Eritrócito não-infectado; (C, D, E) Eritrócito infectado com *P. falciparum*.

Já para a padronização da determinação de fases de desenvolvimento do *P. falciparum* por citometria de fluxo utilizamos cultura sincronizada com sorbitol que foi acompanhada por 48 horas (**Figura 10, A e B**) através de citometria de fluxo e esfregaço. Separaram-se as formas do *P. falciparum* em mononucleadas (anel e trofozoíto jovem) e multinucleadas (trofozoíto maduro e esquizonte) (**Figura 10**). Realizou-se uma comparação entre a análise por microscopia ótica de esfregaços corados com Giemsa e FCM utilizando o marcador YOYO-1 e ambas técnicas mostraram distribuição semelhante da parasitemia e das formas de desenvolvimento.

A porcentagem de parasitemia obtida por microscopia e FCM foram analisadas, respectivamente, em 6 diferentes tempos pós-sincronização e apresentaram os seguintes valores (microscopia/ FCM, %): 2 horas (3,9/ 3,7); 8 horas (3,9/ 3,9), 20 horas (4,4/ 4,3), 27 horas (4,5/ 4,3), 34 horas (5,4/ 5,6) e 48 horas (14,9/ 14,6) (SCHUCK et al., 2011) (**Figura 10**).

Arnot; Ronander; Bengtsson (2011) mostraram que a primeira divisão nuclear ocorre entre 26-28 horas de desenvolvimento durante a fase de trofozoíto, de forma que consideramos como forma multinucleada os parasitas a partir de 28 horas de desenvolvimento. A porcentagem de distribuição das formas mono- e multinucleadas utilizando essas duas metodologias foram, respectivamente, para as formas mononucleadas (microscopia/ FCM, %): 2 horas (3,9/ 3,7); 8 horas (1,5/ 1,6); 20 horas (1,4/ 1,4); 27 horas (1,7/ 1,6); 34 horas (3,5/ 3,4) e 48 horas (14,4/ 13,9). Já para as formas multinucleadas as porcentagens obtidas foram, respectivamente (microscopia/ FCM, %): 2 horas (0,1/ 0,1); 8 horas (2,4/ 2,3); 20 horas (3,0/ 2,9); 27 horas (2,8/ 2,7); 34 horas (1,9/ 2,2) e 48 horas (0,5/ 0,7) (SCHUCK et al., 2011) (**Figura 10**).

Figura 10- A) Dot Plot dos parâmetros SSC vs FL1-H de uma cultura acompanhada por 48 horas (B) Histogramas da FCM para a cultura durante 48 horas. (C) Formas típicas encontradas em esfregaços de cada ponto analisado. (D) Comparação entre valores de parasitemia e distribuição de fases para Microscopia/FCM (Cinza escuro- microscopia; Cinza claro- citometria de fluxo). FL1-H é o parâmetro do detector utilizado para ler o marcador YOYO-1 no comprimento de onda de 530 nm.

Fonte: (SCHUCK et al., 2011).

4.2 Ação de compostos indólicos no ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*

4.2.1 Avaliação do efeito de análogos sintéticos da melatonina e triptamina no ciclo intraeritrocítico do *Plasmodium falciparum*.

Buscando entender a importância dos grupos substituintes da melatonina sobre o ciclo intraeritrocítico do *P. falciparum* foram realizadas mudanças na estrutura da melatonina, uma vez que já foi demonstrado por diversos estudos a importância dos grupos metoxi e N-acil para a ligação e também ativação do receptor de melatonina (COPINGA et al., 1993; DEPREUX et al., 1994; GARRATT et al., 1995; SPADONI et al., 1993; SUGDEN et al., 1997; YOUS et al., 1992).

Foram sintetizados dez diferentes compostos indólicos (**Figura 11**), a partir de modificações na estrutura da triptamina. Uma série foi baseada na estrutura da melatonina e tem um grupo metoxi na posição 5' do anel indólico (ME02 – ME06), enquanto a outra série não possui esta modificação (TP01 –TP05); ambas séries de análogos sofreram modificações no grupo N-acil. A síntese desses compostos foi realizada pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Vitor Ferreira, Universidade Federal Fluminense, Departamento de Química.

Figura 11- Esquema mostrando a síntese dos novos análogos da melatonina. R foi substituído por um radical metoxi (OMe) e R1 foi substituído por quatro diferentes radicais. ME representa a série baseada na estrutura da melatonina, TP representa a série baseada na estrutura da triptamina. A síntese foi realizada pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Vitor Ferreira, Universidade Federal Fluminense, Departamento de Química.

Avaliamos a capacidade desses novos indóis sintéticos de interferir na ação do hormônio melatonina no ciclo do parasita. Para tanto os compostos foram incubados em cultura *in vitro* de *P. falciparum* 3D7 assincrônicos na concentração de 500 nM, por 48 horas e como controle foi usado melatonina na concentração de 100 nM.

A parasitemia foi avaliada utilizando citometria de fluxo e o marcador de DNA YOYO-1. Quando comparado ao controle que foi tratado apenas com o solvente, os compostos que aumentaram a parasitemia significativamente foram: melatonina 21,9±0,8% (p<0,001), ME04 10,8±3% (p<0,01), ME05 10±2% (p<0,05); ME06 19,7±5,2(p<0,001), TP01 12,9±4,6 (p<0,001); TP02 9,2±3,1(p<0,05) e TP05 11,7±5(p<0,01). Os outros compostos não apresentaram aumento significativo da parasitemia em relação ao controle: ME02 8±2,6%, ME03 7,8±1%, TP03, 6±4,8 e TP04 5,3±2,2%, conforme representado na **Figura 12**. Contudo, quando comparado ao aumento

de parasitemia apresentado pela melatonina, apenas o composto ME06 ($19,7 \pm 5,2$) apresentou aumento de parasitemia similar ao do hormônio sobre a progressão do ciclo de *P. falciparum*.

Os compostos ME04, ME05, TP01, TP02 e TP05 apesar de também mostrarem efeito no ciclo do parasita apresentam uma resposta significativamente menor, sugerindo uma diminuição na potência desses ligantes devido às modificações realizadas em suas estruturas. Esse resultado está de acordo com o trabalho realizado por Sugden et al (1997), onde foi avaliada a afinidade de diferentes compostos com estrutura baseadas na melatonina, mas que apresentavam modificações nos radicais metoxi e N-acil. A retirada do grupo 5-metoxi ou N-acetil reduziu a afinidade de ligação ao receptor em todos os compostos. A adição de até dois carbonos na cadeia N-acil lateral manteve a afinidade de ligação dos compostos aos receptores MT1/MT2/MT3, porém, cadeias mais longas, com 4-5 carbonos reduziram significativamente a afinidade de ligação. Tais modificações realizadas por Sugden et al (1997) são similares às modificações realizadas em TP03 e ME03, que similarmente, apresentaram uma resposta reduzida em *P. falciparum* quando comparado ao efeito da melatonina no ciclo do parasita (**Figura 12**).

Figura 12- Ação de novos indóis sintetizados a partir da molécula da melatonina (ME) e triptamina (TP). Após incubação por 48 horas, a parasitemia foi medida por citometria de fluxo. Os dados representam a porcentagem de parasitemia em relação ao controle (tratamento com solvente). (*) One-way ANOVA (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

Na tentativa de compreender se esses indóis seriam capazes de inibir a ação da melatonina os novos compostos foram incubados por 10 minutos numa cultura de *P.falciparum* 3D7 assíncronicos na concentração 500 nM e então foi adicionado melatonina a todos os tratamentos na concentração de 100 nM. Após 48 horas a parasitemia foi medida por citometria de fluxo. Comparando com o controle que foi tratado apenas com o solvente os compostos que aumentaram a parasitemia significativamente foram: melatonina $23,5 \pm 6,8\%$ ($p < 0,0001$), ME05 $14,5 \pm 5,8\%$ ($p < 0,05$) e ME06 $14,1 \pm 2,4\%$ ($p < 0,05$). Os outros compostos não apresentaram aumento significativo da parasitemia em relação ao controle: ME02 $8,8 \pm 4,2\%$, ME03 $8,6 \pm 3,2\%$, ME04 $9,1 \pm 3,4\%$, TP01 $11,3 \pm 6,8\%$, TP02 $11 \pm 6,9\%$, TP03 $6,9 \pm 3\%$, TP04 $6,7 \pm 2,6\%$ e TP05 $10,9 \pm 4,1\%$, conforme representado na **Figura 13**. Nenhum dos compostos incubados conjuntamente com a melatonina apresentou efeito similar ao efeito do hormônio. Esses resultados indicam que estes compostos interferem com a atividade da melatonina, possivelmente por competirem pelo mesmo sítio de ligação do hormônio, e que como já mostrado na **Figura 12**, apresentam uma potência menor em relação ao hormônio no ciclo do *Plasmodium*. A partir da análise das estruturas (**Figura 11**) podemos concluir que um aumento no número de átomos de carbono nas estruturas de ME02 e ME03 tem um efeito deletério sobre o aumento da parasitemia, mesmo mantendo-se o grupo metoxi na posição 5'. Além disso, conforme verificado também por outros grupos, podemos observar que o grupo metoxi na posição 5' desempenha um importante papel para a atividade da melatonina sobre o seu receptor, uma vez que os compostos que não apresentam este grupo, de um modo geral apresentam um efeito menor sobre a parasitemia (**Figura 13**).

Baseado nesses dados é possível afirmar que ME04, ME05, TP01, TP02 e TP05 apresentam uma atividade semelhante, mesmo que em menor intensidade, àquela observada para o hormônio melatonina em *P. falciparum*, enquanto que os compostos ME02, ME03, ME04, TP03 e TP04 perderam a capacidade de modular a progressão do ciclo de *P. falciparum*, sugerindo que estes poderiam ser utilizados como bloqueadores da atividade de melatonina.

Figura 13- Ação de novos indóis sintetizados a partir da molécula da melatonina (ME) e triptamina (TP) (concentração de 500 nM) em conjunto com a molécula de melatonina (100 nM). Após incubação por 48 horas, a parasitemia foi medida por citometria de fluxo. Os dados representam a porcentagem de parasitemia em relação ao controle (solvente). (*) *One-way* ANOVA (** $p < 0,001$; * $p < 0,05$).

4.2.2 Avaliação do efeito antimalárico de análogos sintéticos da melatonina na cultura *in vivo* de *P. falciparum* 3D7.

Utilizando uma concentração fixa dos compostos acima descritos (500 nM) verificamos que, com exceção do composto ME06, todos os demais ou não apresentaram atividade sobre o desenvolvimento de *P. falciparum* ou apresentaram uma atividade menor (**Figuras 12 e 13**). Buscando avaliar se estes compostos também apresentariam ação antimalárica sobre a cultura *in vitro* de *P. falciparum* 3D7 realizou-se uma curva dose-resposta para obter o valor de IC_{50} dos compostos indólicos, utilizando parasitas sincronizados no estágio de anel, nas seguintes concentrações: 5 nM; 15 nM; 45 nM; 137 nM; 411 nM; 1,23 μ M; 3,70 μ M; 11,11 μ M; 33,33 μ M e 100 μ M.

Entre os análogos das séries TP e ME, os compostos ME02, ME03 e ME04 apresentaram atividade antimalárica potencial sobre o desenvolvimento de *P. falciparum*. Nesse ensaio esses compostos apresentaram os seguintes IC_{50} : ME02 ($IC_{50} = 19,17 \pm 0,08 \mu$ M), ME03 ($IC_{50} = 19,10 \pm 0,09 \mu$ M) e ME04 ($IC_{50} = 2,93 \pm 0,064 \mu$ M) (**Figura 14, 15 e 16** respectivamente).

Atualmente não existem fármacos da classe dos indóis para o tratamento da malária. NITD609 (**Figura 30**) é um novo composto proposto como antimalárico, pertencente a classe das espiroindolonas e que apresentou $IC_{50} = 10$ nM no ciclo intraeritrocítico do *P. falciparum* e foi capaz de interferir na transmissão do parasita para o vetor *Anopheles* (ROTTMANN et al., 2010), atualmente esse composto está em fase I de testes clínicos para uso como antimalárico. Além desse composto, indol-propanamidas (**Figura 30**) descritas em Zhu et al. (2009) mostram-se inibidores da enzima falcipaina-2. A falcipaina-2 é a principal cisteína-protease do parasita, responsável pela degradação da hemoglobina do eritrócito do hospedeiro fornecendo os aminoácidos necessários para a síntese proteica do parasita (PANDEY et al., 2005; SHENAI et al., 2000). Atualmente essa enzima é um alvo atrativo no desenvolvimento de novos anti-maláricos e diversos estudos buscam inibidores eficientes que possam conter o desenvolvimento intraeritrocítico do *Plasmodium* (DESAI et al., 2006; LEE et al., 2003; ROSENTHAL et al., 1996; SHENAI et al., 2003). Woodard et al. (2003) mostraram que oxindóis (**Figura 30**) são capazes de inibir uma quinase dependente de ciclina (Pfmrk) de forma específica bem como exibir propriedades antimalárica em testes realizados *in vitro* em cepas de *P. falciparum*. Outro composto indólico com atividade promissora é a violaceína (**Figura 30**), composto extraído da bactéria *Chromobacterium violaceum* que mostrou atividade antimalárica na faixa micromolar tanto para cepas suscetíveis como resistentes à cloroquina, bem como foi capaz de controlar a progressão da infecção por *P. chabaudi* em camundogos (LOPES et al., 2009). Van Schalkwyk et al. (2010) mostraram que diversos indóis com estrutura relacionada a Bafilomicina apresentam propriedades antimaláricas na faixa micromolar e que interferem na habilidade do parasita de regular o pH citosólico, através da inibição da H^+ -ATPase-tipo-V.

De acordo com o que foi exposto no parágrafo acima, os compostos com anel indólico são potencialmente ativos no ciclo intraeritrocítico do *Plasmodium* e exibem atividade antimalárica promissora. Nesse sentido, o *screening* de 184 compostos derivados de produtos naturais e semi-sínteses resultou em 13 compostos ativos no ciclo do *P. falciparum*, todos com anel indólicos na sua estrutura e com atividade antimalárica na faixa micromolar em cepas altamente resistentes a cloroquina, indicando a importância que esse grupo químico tem no *design* racional de novos antimaláricos (PASSEMAR et al., 2011). O desenvolvimento de uma nova classe de fármacos, que atuem através de diferentes mecanismos de ação, é de grande importância para driblar o crescente aumento da resistência aos antimaláricos existentes. Nesse sentido, a descrição inédita

de três indóis com atividade antimalárica bastante significativa abre boas perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos com novos mecanismos de ação.

Figura 14- Curva sigmoidal dose-resposta com diferentes concentrações do composto ME02 após 48 horas de incubação em *P. falciparum*. Histogramas representando a citometria de fluxo das diferentes concentrações testadas, em azul amostra contendo o composto, em vermelho tracejado a população controle (solvente).

Figura 15- Curva sigmoideal dose-resposta com diferentes concentrações do composto ME02 após 48 horas de incubação em *P. falciparum*. Histogramas representando a citometria de fluxo das diferentes concentrações testadas, em azul amostra contendo o composto, em vermelho tracejado a população controle (solvente).

Figura 16- Curva sigmoidal dose-resposta com diferentes concentrações do composto ME02 após 48 horas de incubação em *P. falciparum*. Histogramas representando a citometria de fluxo das diferentes concentrações testadas, em azul amostra contendo o composto, em vermelho a população controle (solvente).

4.3 Avaliação biológica de novas hidroxinaftoquinonas sintéticas como antimaláricos

4.3.1 Ação antimalárica *in vivo* de novas hidroxinaftoquinonas sintéticas

Buscando melhorar os resultados encontrados na literatura para as hidroxinaftoquinonas, o grupo do Professor Vitor Ferreira (UFF), nosso colaborador, sintetizou novas hidroxinaftoquinonas (FERREIRA et al., 2011), modificando a cadeia lateral alquilada da molécula lausona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona), (**Figura 17**). Nesta tese, investigamos a capacidade de cinco diferentes hidroxinaftoquinonas sintetizadas em interromper o crescimento de *P. falciparum* 3D7 *in vivo*. A cultura foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando o marcador YOYO-1.

Figura 17- Esquema de síntese de novas hidroxinaftoquinonas a partir da molécula lausona.

Foi realizada uma curva dose-resposta desses compostos, com eritrócitos infectados com *P. falciparum* 3D7 sincrônicos nas seguintes concentrações: 0,005; 0,015; 0,045; 0,137; 0,411; 1,23; 3,70; 11,11; 33,33 e 100 μM . Foram realizadas incubações de 48 horas com cultura de *P. falciparum* 3D7 sincronizada no estágio anel. Todas hidroxinaftoquinonas testadas apresentaram atividade antimalárica, sendo os IC_{50} obtidos respectivamente: $\text{IC}_{50\text{N1}} = 89 \mu\text{M} \pm 0,12$; $\text{IC}_{50\text{N2}} = 13,7 \mu\text{M} \pm 0,14$; $\text{IC}_{50\text{N3}} = 443 \text{ nM} \pm 0,08$; $\text{IC}_{50\text{N4}} = 16,01 \mu\text{M} \pm 0,15$ e $\text{IC}_{50\text{N5}} = 15,2 \mu\text{M} \pm 0,10$ (**Figuras 18-22**, respectivamente), o controle com atovacona $\text{IC}_{50\text{ATVQ}} = 28,3 \text{ nM} \pm 0,12$. Os compostos N2,

N4 e N5 apresentaram atividade antimalárica considerada moderada. Já a hidroxinaftoquinona N3 apresentou um IC₅₀ na faixa nM, considerada como uma excelente atividade antimalárica.

Buscando explorar a atividade antimalárica que o anel quinônico possui, vários grupos sintetizaram series de naftoquinonas. El Hage et al. (2009) sintetizaram series de compostos baseados na estrutura da atovacona, adicionando ésteres na região do grupo 3-hidroxi. Esses compostos mantiveram a atividade antimalárica na faixa nanomolar, e a atividade foi dependente do tamanho das cadeias adicionadas; cadeias muito longas tenderam a diminuir a atividade desses compostos. Outros trabalhos como os de (KESSL et al., 2007; KONGKATHIP et al., 2010) avaliaram series de hidroxinaftoquinonas no ciclo do *P.falciparum* e mostraram que essa classe é bastante ativa e inibem o crescimento de diversas cepas do *Plasmodium* na faixa nano- e micromolar.

Hughes et al (2010; 2011) sintetizaram novas hidroxinaftoquinonas e descreveram que a adição de um grupo metil no anel naftoquinônico foi capaz de inibir o crescimento de cepas resistentes a atovacona.

Nosso grupo recentemente reportou a ação de 36 novas fenilsulfanilmetil[1,4] naftoquinonas, com estrutura relacionada a do lapachol em parasitas *P. falciparum* (SHARMA et al., 2013). Todos os compostos testados apresentaram atividade antimalárica e os IC₅₀ para *P.falciparum* 3D7 encontram-se entre 3-60 µM.

Diante dos diversos compostos derivados de naftoquinonas descritos com atividade inibitória do ciclo do *P. falciparum* a síntese e avaliação antimalárica de novas naftoquinonas é de grande importância, visto que o anel quinonoídico é uma estrutura chave no desenvolvimento de novos compostos antiparasitários.

Figura 18- Curva sigmoidal dose-resposta da atividade antimalárica do composto sintético N1. Histogramas representando a citometria de fluxo das diferentes concentrações testadas, em azul amostra contendo o composto, em vermelho tracejado a população controle (tratado com o solvente).

$$IC_{50N1} = 89 \mu M \pm 0,12$$

Figura 19- Curva sigmoidal dose-resposta da atividade antimalárica do composto sintético N2. Histogramas representando a citometria de fluxo das diferentes concentrações testadas, em azul amostra contendo o composto, em vermelho tracejado a população controle (tratado com o solvente).

Figura 20- Curva sigmoidal dose-resposta da atividade antimalária do composto sintético N3. Histogramas representando a citometria de fluxo das diferentes concentrações testadas, em azul amostra contendo o composto, em vermelho tracejado a população controle (tratado com o solvente).

Figura 21- Curva sigmoidal dose-resposta da atividade antimalária do composto sintético N4. Histogramas representando a citometria de fluxo das diferentes concentrações testadas, em azul amostra contendo o composto, em vermelho tracejado a população controle (tratado com o solvente).

Figura 22- Curva sigmoidal dose-resposta da atividade antimalária do composto sintético N5. Histogramas representando a citometria de fluxo das diferentes concentrações testadas, em azul amostra contendo o composto, em vermelho tracejado a população controle (tratado com o solvente).

$$IC_{50N5} = 15.2 \text{ nM} \pm 0,1$$

4.3.2 Efeito das novas hidroxinaftoquinonas sintéticas no $\Delta\Psi$ mitocondrial de *P. falciparum*

Sabe-se que várias hidroxinaftoquinonas são inibidoras do transporte de elétrons da mitocôndria (FRY et al., 1984) rompendo o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{mit}$) através da inibição do complexo da citocromo-bc₁ (SRIVASTAVA; ROTTENBERG; VAIDYA, 1997). Decidimos investigar se o composto que exibiu a melhor atividade antimalárica, a hidroxinaftoquinona N3, é capaz de levar ao colapso do potencial de membrana mitocondrial. Para tanto, o parasita *P. falciparum* 3D7 foi carregado com o marcador fluorescente MitoTracker Red CMXRos[®] (5 μ M). Esse marcador difunde-se na célula viva e concentra-se na mitocôndria, ligando-se de forma covalente a membrana polarizada dessa organela e emitindo fluorescência na faixa de 599 nm. Quando o potencial de membrana mitocondrial é rompido, a ligação do marcador com a membrana se desfaz, perdendo-se o sinal fluorescente emitido pelo Mitotracker Red CMXRos[®] (KALBACOVA et al., 2003; LÓPEZ et al., 2010; SRIVASTAVA; ROTTENBERG; VAIDYA, 1997). . Após a marcação, os parasitas foram incubados por 1 hora com diferentes concentrações do composto N3: 100 μ M; 10 μ M; 1 μ M; 0,1 μ M e 0,01 μ M. Como controle foi utilizado o inibidor clássico de $\Delta\Psi_{mit}$ CCCP (carboxicianeto m-clorofenilhidrazona, 10 μ M) (**Figura 23 A e B**, em verde). A distribuição de células incubadas na presença do inibidor CCCP foi utilizada para padronizar a ausência de $\Delta\Psi_{mit}$. Eritrócitos infectados com *P. falciparum* e marcados com MitoTracker Red CMXRos[®] foram considerados a população controle. Histogramas representativos das análises de citometria de fluxo realizadas estão na **Figura 23,A e B**. A porcentagem de células na região considerada positiva para $\Delta\Psi_{mit}$ foi determinada e a média de três experimentos independentes está representado na **Figura 23,C**. N3 apresentou um maior efeito sobre a ruptura do potencial de membrana após 1 hora de incubação do que a droga atovacona. A porcentagem de células com $\Delta\Psi_{mit}$ preservado nas concentrações 100 μ M; 10 μ M; 1 μ M; 0,1 μ M e 0,01 μ M, respectivamente : N3 28,6 $\pm$ 7,6% (p<0,05), 66 $\pm$ 1% (p<0,05), 78,2 $\pm$ 1,5% (p<0,05), 88,3 $\pm$ 3,3%, 93,3 $\pm$ 1,6% e 97,15 $\pm$ 1,8%; atovacona 76,5 $\pm$ 7,7% (p<0,05), 83,8 $\pm$ 2,3% (p<0,05); 92,42 $\pm$ 3,1%; 95,44 $\pm$ 1,8%; 97,2 $\pm$ 3, 5% e 100,2 $\pm$ 2,3%. A porcentagem de células com $\Delta\Psi_{mit}$ preservado no tratamento com CCCP (10 μ M) foi 0,26 $\pm$ 0,08%.

Kessel et al. (2007) e Hughes et al. (2011, 2010) sintetizaram diferentes séries de novas hidroxinaftoquinonas com atividade antimalárica importante. Além disso, os autores mostram que esses novos compostos foram capazes de inibir eficientemente o potencial de membrana

mitocondrial, ligando-se ao complexo da citocromo bc1. Esses trabalhos, demonstram que o mecanismo de ação das hidroxinaftoquinonas ocorre através da inibição da atividade mitocondrial do parasita. Os dados apresentados nessa tese utilizando a hidroxinaftoquinona N3 mostram que esse composto sozinho inibe significativamente o potencial de membrana mitocondrial, resultando na atividade antimalárica descrita nos testes de crescimento com *P. falciparum*.

Figura 23- Citometria de fluxo de *P. falciparum* marcado com MitoTracker Red CMXRos® pós-tratamento com diferentes compostos: CCCP (10 μ M, em verde), N3 (em vermelho, tracejado, A) e atovacona (em lilás, tracejado, B) nas diferentes concentrações: 100 μ M; 10 μ M; 1 μ M; 0,1 μ M; 0,01 μ M; 0,001 μ M. C) Gráfico de barras representando a média $\pm$ D.P. da porcentagem de células com potencial de membrana positivo pós-tratamento por 1 hora com os diferentes compostos. (*) indica uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (*One-way ANOVA*, $P < 0,05$).

4.3.3 Citotoxicidade das novas hidroxinaftoquinonas sintéticas em células HEK293T

A toxicidade do composto N3 foi avaliada utilizando o teste colorimétrico baseado na detecção do formazan, forma reduzida do tetrazolium produzida quando a célula está viável. Foi medida a formação do formazan nas células de mamífero HEK293T após a incubação por 48 horas com o composto N3 e atovacona nas seguintes concentrações: 0,128; 0,64; 3,2; 4, 80 e 400 μM . Os dados obtidos estão representados na **Figura 24** e representam a média de três experimentos independentes. Não foi observada toxicidade significativa abaixo da concentração de 16 μM e a concentração capaz de matar 50% das células (CC_{50}) para N3 foi $54,6 \pm 0,23 \mu\text{M}$ e em experimento similar com atovacona o $\text{CC}_{50} = 49 \pm 0,45 \mu\text{M}$. Portanto, não houve diferença no potencial citotóxico dos compostos testados.

O valor de CC_{50} obtido para o compostos N3 demonstra que esse composto não possui toxicidade significativa em células de mamíferos, sugerindo que a atividade antimalárica e inibitória do potencial de membrana mitocondrial são específicas para o parasita, sendo a estrutura desse composto ideal para o design racional de novos compostos para serem avaliados como antimaláricos.

Figura 24- Efeito citotóxico da hidroxinaftoquinona N3 (em vermelho) e atovaquona (em lilás) em células HEK293T. As células foram incubadas por 48 horas com os compostos em diferentes concentrações (0,128; 0,64; 3,2; 4; 80 e 400 μM) e a viabilidade celular foi avaliada pelo teste de proliferação MTT. (*) indica uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (*One-way ANOVA*, $P < 0,05$).

4.3.4 Ação antimalárica *in vivo* de novas hidroxinaftoquinonas sintéticas

Buscando avaliar a toxicidade *in vivo* da hidroxinaftoquinona N3 primeiramente testou-se diferentes concentrações do composto em camundongos BALB/C não-infectados e avaliou-se a influência na sobrevivência e peso dos camundongos. Para tanto foi administrado as seguintes concentrações do composto N3 em grupos com 5 animais cada: 20, 10, 5 e 0,5 mg/Kg animal, através de aplicação diária por injeção subcutânea durante 4 dias. O peso dos animais foi avaliado no início do tratamento e oito dias após o tratamento e a sobrevivência acompanhada por trinta dias. Não foi detectado redução no peso (**Figura 25**) ou alteração no comportamento desses animais e todos os camundongos sobreviveram aos trinta dias de experimento, não havendo indícios de toxicidade.

Figura 25- Variação do peso dos camundongos BALB/C que receberam quatro dias de tratamento da droga N3 (20, 10, 5 e 0,5 mg/Kg animal).

P. berghei infecta murinos, e foi isolado por Vincke em 1946, através da análise do conteúdo estomacal de mosquitos (JAMBOU et al., 2011). O ciclo intraeritrocítico em murinos é de 22 horas e desenvolve-se de forma assíncrona (JANSE; RAMESAR; WATERS, 2006). As

cepas mais utilizadas em *screenings* de novas drogas são a NK65 e ANKA. *P. berghei* NK foi isolado em Katanga (a sigla vem da designação New York-Katanga) e ANKA isolado em Kasapa (cuja sigla significa Antwerpen-Kasapa), (JAMBOU et al., 2011). NK65 possui uma afinidade maior que ANKA por reticulócitos, o que leva a uma produção menor de merozoítos e consequentemente uma evolução da infecção mais lenta (BIARNAIS; LANDAU; RICHARD-LENOBLE, 2002; DEHARO et al., 1996). *P. berghei* ANKA é amplamente utilizado em modelos de malárias cerebral devido o fenótipo de sequestro dos parasitas por células endoteliais, levando a obstrução desses vasos e posterior morte do animal (GRIFFITH et al., 2007; YANEZ et al., 1996). De forma interessante, a linhagem de camundongo utilizada para a infecção pode levar a diferentes progressões da malária nos camundongos: camundongos C57Bl/6 morrem de malária cerebral rapidamente após a infecção, já camundongos BALB/C possuem uma sobrevivência maior e geralmente a morte desses animais está associada a progressão da parasitemia que leva à anemia severa (GRIFFITH et al., 2007; SHIBUI et al., 2009; YANEZ et al., 1996). Dessa forma, estudos que busquem avaliar a ação de novos fármacos no estabelecimento da parasitemia utilizam na sua grande maioria *P. berghei* ANKA em camundongos BALB/C, já estudos que buscam entender o mecanismo da malária cerebral utilizam *P. berghei* ANKA em camundongos C57Bl/6. O parasita *P. berghei* ANKA modificado geneticamente e que expressa constitutivamente a proteína fluorescente verde (GFP) é uma ferramenta importante em estudos da biologia do parasita em todos os estágios do seu ciclo de vida (JANSE; RAMESAR; WATERS, 2006).

A fim de se avaliar a atividade antimalárica do composto N3 utilizando o modelo de infecção *in vivo* em roedores com *P. berghei* foi realizado o ensaio clássico de supressão de parasitemia após 4 dias de tratamento (FIDOCK et al., 2004a). Foram utilizados camundongos BALB/C infectados com *P.berghei* ANKA GFP. A utilização dessa linhagem elimina o passo de marcação dos parasitas para posterior avaliação da parasitemia, uma vez que os organismos expressando GFP podem ser detectados diretamente no citômetro de fluxo utilizando o detector FL-1. Os camundongos infectados com *P. berghei* ANKA GFP foram tratados com concentrações crescentes de N3 (20, 10, 5 e 0,5 mg/Kg animal) e solução controle. Os camundongos foram injetados por via intraperitoneal com 10^6 eritrócitos infectados com *P. berghei* ANKA GFP. Após 4 horas da infecção, os compostos a serem testados foram administrados através de injeção intraperitoneal por quatro dias no mesmo horário.

No quarto dia após o início do experimento a parasitemia dos animais foi medida por citometria de fluxo. O grupo controle que recebeu a solução solvente apresentou uma parasitemia de $8,7\% \pm 4,2$ e os grupos que receberam tratamento com N3, 20; 10; 5 e 0,5 mg/Kg animal apresentou parasitemia de respectivamente: $4,5 \pm 1,2$; $5,8 \pm 3,2$; $4 \pm 0,5$; $9,2 \pm 3,7$ (**Figura 26**). Observou-se redução de parasitemia de 48,2% no tratamento com 20 mg/Kg animal; 33,3% no tratamento com 10 mg/Kg animal e 54% no tratamento com 5 mg/Kg animal.

Figura 26- Parasitemia no quarto dia após tratamento de quatro dias de tratamento com a nova hidroxi-naftoquinona N3 e Cloroquina. Média de cinco camundongos BALB/C infectados com *P. berghei* ANKA GFP. (*) *One-way ANOVA*, $p < 0,05$.

A parasitemia dos grupos controle, N3 20; 10; 5 e 0,5 mg/Kg animal foi avaliada ainda no oitavo, nono e décimo terceiro dia após o início dos tratamentos, sendo possível observar a evolução da infecção em todos os grupos (**Figura 27**). No décimo terceiro dia de avaliação da parasitemia o grupo controle mostrou parasitemia de $39,4 \pm 14,4$ %. Nos grupos tratados com N3 as parasitemias foram para os tratamentos 20; 10; 5 e 0,5 mg/Kg animal, respectivamente : $38,9 \pm 6,9\%$; $37 \pm 11,6\%$; $33,9 \pm 11,3\%$ e $40,9 \pm 5,3\%$.

Figura 27- Evolução da infecção por *P. berghei* ANKA GFP nos dia 4, 8, 9 e 13 após o início do experimento.

Avaliando os dados de dias de sobrevivência dos grupos após 30 dias de tratamento, o grupo controle viveu em média $16 \pm 5,3$ dias. Os grupos que receberam o tratamento com N3 viveram em média: 20 mg/Kg animal ($20,2 \pm 2,3$ dias), 10 mg/Kg animal ($20,2 \pm 1,1$ dias), 5 mg/Kg animal ($18,8 \pm 1,7$ dias), 0,5 mg/Kg animal ($16,8 \pm 2$ dias). Não houve sobreviventes após 30 dias e a curva de sobrevivência está representada na **Figura 28**.

Figura 28- Sobrevivência de camundongos infectados com *P. berghei* ANKA GFP em 30 dias após quatro dias de tratamento com a nova hidroxi-naftoquinona N3 em diferentes concentrações (20; 10; 5; 0,5 mg/Kg animal).

Muller, T. et al. (2011) realizaram o teste de supressão de parasitemia após 4 dias de tratamento com cinco diferentes hidroxi-naftoquinonas em *P. berghei* ANKA, usando concentrações de 30 e 50 mg/Kg animal/dia através de injeções intraperitoneais e observaram uma redução entre 43 e 20% da parasitemia no quarto dia do experimento. Comparativamente, o composto N3 apresentou uma redução de parasitemia média de 50% utilizando uma concentração de 5 mg/Kg animal/dia. No trabalho descrito por Muller et al. (2011) não são mostradas informações sobre a progressão da infecção ou mortalidade.

A hidroxinaftoquinona N3 mostrou-se ativa no modelo de infecção *in vivo*, reduzindo a parasitemia de forma significativa nos primeiros dias após a infecção, porém os resultados a longo prazo mostram que essa molécula precisa sofrer modificações que a tornem mais estáveis no hospedeiro para se obter resultados antiparasitários duradouros.

5 DISCUSSÃO

5.1 Citometria como ferramenta no *screening* de novos fármacos

Como descrito anteriormente em diversos trabalhos (BARKAN; GINSBURG; GOLENSER, 2000; CAMPO et al., 2011; LI, Q. et al., 2007), o marcador YOYO-1 mostrou uma excelente discriminação entre células não-infectadas e infectadas. Nesta tese, utilizamos o marcador YOYO-1 para distinguir formas mononucleadas e multinucleadas de hemácias infectadas com *Plasmodium falciparum* após diferentes tratamentos, e obtivemos uma boa resolução. A intensidade de fluorescência dos parasitas nos estágios multinucleados é em média 10 vezes maior que nas formas mononucleadas, similar aos resultados já descritos previamente para o marcador hidroetidina (VAN DER HEYDE et al., 1995).

A estratégia de *gate*, como demonstrado na **Figura 10**, foi utilizada nesta tese, para definir formas mononucleadas e multinucleadas do parasita (**Figura 10, B**).

Quando comparada a outras técnicas para avaliação da parasitemia, a citometria de fluxo exhibe diversas vantagens. Em relação a microscopia óptica, FCM mostra-se mais rápido e menos subjetiva, além de mais sensível, uma vez que o uso de marcadores vitais possibilita distinguir parasitas viáveis e não-viáveis, o que é impossível através da avaliação com Giensa (CHEVALLEY et al., 2010).

Comparativamente, enquanto que utilizando-se FCM são necessários de 30 minutos (para marcadores que não requerem fixação, por exemplo, hidroetidina) à 24 horas (incluindo prévia fixação da amostra), o uso de outras técnicas para avaliação de parasitemia, como o ensaio de incorporação de hipoxantina tritiado; ensaio colorimétrico da lactado desidrogenase, e a marcação em placas com Sybr Green, são necessárias pelo menos 48 horas (BACON et al., 2007; DESJARDINS et al., 1979; MAKLER; PIPER; MILHOUS, 1998; SMILKSTEIN et al., 2004; WEBSTER et al., 1985). Somado a isso, a possibilidade de fixação das amostras para posterior análise ou re-análise (as amostras podem ser armazenadas por meses) mostra uma vantagem sobre as outras técnicas que exigem marcação e processamento imediato.

5.2 Ação de compostos indólicos no ciclo intraeritrocítico do *Plasmodium*

A obtenção de indóis e derivados de melatonina sintéticos para avaliação de sua ação no ciclo de *P. falciparum* foi uma abordagem interessante e inovadora que poderá nos trazer informações relevantes sobre a estrutura destas classes de compostos utilizadas pelo parasita. Em adição, a obtenção de inibidores da ação de melatonina no ciclo de vida do parasita poderá trazer novas perspectivas para desenvolvimento de antimaláricos.

Apesar de todos compostos da série TP e ME compartilharem o anel indólico (resultante da união de um anel benzênico e um anel de pirrol) (**Figura 29 A, B**), alterações nos radicais desse anel mostraram alterações de forma significativa na atividade dos compostos tanto no ciclo de vida do parasita quanto na atividade antimalárica.

Figura 29- Estrutura dos indóis sintéticos (A) série TP; (A) série ME e (C) hormônio melatonina e seus precursores.

a) Série TP

b) Série ME

c) Melatonina e seus precursores

A ação da melatonina na modulação do ciclo intraeritrocítico do *P. falciparum* e *P. chabaudi* ocorre através da mobilização e geração de segundo mensageiros como Ca^{2+} e AMPc (BAGNARESI et al., 2012; KOYAMA; CHAKRABARTI; GARCIA, 2009). A produção de IP3 foi recentemente demonstrada como parte da cascata de sinalização celular via melatonina, através do uso de compostos denominados de caged-IP3 (ALVES et al., 2011). Interessantemente experimentos similares realizados com *P. berghei* e *P. yoelli*, que possuem desenvolvimento intraeritrocítico assincrônico *in vivo*, demonstraram que melatonina não possui ação na modulação do ciclo celular desses parasitas (BAGNARESI et al., 2009) reforçando a hipótese da importância desses indóis na regulação da sincronização do ciclo intraeritrocítico do *Plasmodium*.

Os precursores de melatonina, N-acetil-serotonina, triptaminas e serotonina, e AFMK também possuem ação moduladora no ciclo de *P. falciparum* (BERALDO; GARCIA, 2005; BERALDO; MIKOSHIBA; GARCIA, 2007; BUDU et al., 2007; SCHUCK et al., 2011).

Como consequência da mobilização e geração de segundos mensageiros no *Plasmodium*, tem sido caracterizado a participação das vias de sinalização celular na transdução de sinal via melatonina em *Plasmodium*, tais como: a ativação da PKA em *P. chabaudi* (GAZARINI et al., 2011) e *P. falciparum* (BERALDO et al., 2005), ativação do fator de transcrição NF-YB em *Plasmodium falciparum* (LIMA et al., 2012), ativação de alguns genes do sistema de ubiquitina-proteossoma (KOYAMA et al., 2012) em *Plasmodium falciparum* bem como a ativação de cisteína-proteases em *P. chabaudi* (FARIAS et al., 2005). A identificação de vias e ativação de genes de UPS, quinase e protease demonstram claramente a importância dos indóis na modulação do ciclo intraeritrocítico do parasita e dos estudos que buscam elucidar a via de sinalização desse hormônio.

O papel da melatonina e o uso de possíveis inibidores desse hormônio no desenvolvimento de novos antimaláricos vem sendo discutido (SRINIVASAN et al., 2012; SRINIVASAN et al., 2010). Buscando entender a relação entre a manutenção do ciclo intraeritrocítico sincrônico e a liberação circadiana da melatonina, (BAGNARESI et al., 2008) utilizaram camundongos infectados com *P. chabaudi* e o inibidor clássico dos receptores MT_1/MT_2 de melatonina, luzindol (**Figura 30**). A administração de cloroquina em dose sub-ótima concomitantemente ao luzindol demonstra claramente um aumento da sobrevivência dos camundongos e um aumento significativo da eficiência da cloroquina como antimalárico. Luzindol, não se mostrou tóxico ao

Plasmodium per se, porém apresenta um leve efeito antimalárico, indicando que a perda de sincronicidade da infecção aumenta a eficiência do hospedeiro em combater a infecção. Em outro trabalho utilizando inidores de receptores de indóis, Locher et al. (2003) mostraram que o inibidor do receptor de serotonina, 8-hidroxi-2-dipropil-aminotetralina (8-OH-DPAT) (**Figura 30**), foi capaz de inibir o crescimento do *P. falciparum in vivo* com um $IC_{50}=0,4 \mu M$, reforçando a importância dessa classe de compostos no ciclo de vida do *Plasmodium*.

Outros indóis tem se mostrado importantes na busca por novas classes de drogas que driblem a resistência às drogas usadas atualmente para tratamento da malária. As espiroindolonas foram descritas em 2010 como uma nova classe de drogas potente contra a malária, tendo seu efeito antimalárico descoberto num *screening* de 12000 compostos realizado pela empresa Novartis (ROTTMANN et al., 2010). Entre as espiroindolonas testadas, NITD609 (**Figura 30**) apresentou $IC_{50} < 10 \text{ nM}$ e baixa toxicidade *in vivo* $CC_{50} > 10 \mu M$. Apesar do mecanismo de ação dessa espiroindolona ainda não estar esclarecido, Rottmann et al. (2010) produziram linhagens resistentes a NITD609 através de cultivo contínuo sob pressão seletiva numa concentração sub-ótima. A análise genética desses parasitas resistentes mostrou mutações no gene da ATPase tipo-P de *P. falciparum* (PfATPase4). As ATPases estão envolvidas no transporte de cátions através de membranas biológicas e já foram validadas como alvos para fármacos no combate de patógenos por serem importantes no desenvolvimento dos parasitas e na manutenção do ambiente patofisiológico (YATIME et al., 2009). Rottmann et al. (2010) sugere três hipóteses para a possível relação entre PfATP4 e NITD609: PfATP4 seria um transportador de drogas (porém não possui homologia com outros transportadores de *Plasmodium*); mutações em PfATP4 atenuariam a ação da NITD609 na homeostase celular e por último, PfATP4 seria o alvo da ação dessa espiroindolona. Em trabalho posterior, Van Pelt-Koops et al. (2012) mostraram que NITD609 foi capaz de inibir a gametogênese e bloquear a transmissão do parasita para o vetor *Anopheles*. Atualmente esse composto está na Fase I de testes clínicos para uso em humanos.

Buscando inidores para a cisteína-protease falciparina-2 (FP-2), Zhu et al. (2009), através de *virtual screening* e *design* racional de drogas analisaram uma série de 2-amida-3-indol-propanamidas (**Figura 30**) que apresentaram atividade moderada contra FP-2, descrevendo uma nova classe de inibidores para *Plasmodium*. Outro indol com importante atividade antimalárica é a violaceína (**Figura 30**) (LOPES et al., 2009). Esse indol extraído da bactéria gram-negativa

Chromobacterium violaceum foi testado em cepas sensível e resistente a cloroquina e em ambos casos apresentou atividade de 0,85 μM e 0,63 μM , respectivamente. Testes *in vivo* com camundongos infectados com *P. chabaudi* de duas cepas difentes (AJ, cepa letal; AS, cepa não-lethal) utilizando a violaceína mostraram que esse composto foi eficiente em reduzir a parasitemia e aumentar a sobrevida desses animais.

Outro importante trabalho mostrando a ação antimalárica de compostos com anel indólico é o de Woodard et al. (2003), onde oxindóis (**Figura 30**) foram capazes de inibir Pfmrk, uma proteína quinase dependente de ciclina (CDK). Foram avaliados 18 oxindóis sintéticos e testada a capacidade de inibirem as CDKs Pfmrk, PfPK5 e CDK1 de *Plasmodium falciparum*. Dentre todos oxindóis testados, 5 compostos mostraram-se inibidores seletivos da Pfmrk, apresentando valores de IC_{50} entre 4 e 1,5 μM .

Figura 30- Estruturas de compostos contendo anel indólico e que se mostram ativos no ciclo do *Plasmodium*. Luzindol, inibidor do receptor de melatonina MT1/MT2; 8-OH-DPAT inibidor do receptor de serotonina; NITD609 espirolindolna em fase I de testes clínicos, indol-propanamida com atividade inibitória da Falcipaina-2, violaceína e oxindol.

Analisando os resultados apresentados nas **Figuras 12 e 13** é evidente que os diferentes indóis sintéticos testados interagem com o mesmo sítio de ligação da melatonina, porém com uma potência menor. A menor potência que esses compostos apresentaram parece estar relacionada com as modificações realizadas no radical R1, que levaram a uma alteração do valor de cLogP (medida da lipofilicidade de uma molécula) para essas moléculas (Tabela 2). O único composto que apresentou um efeito similar ao da melatonina foi o composto ME06, que possui um valor de cLogP bastante próximo ao da melatonina (Tabela 2). Compostos mais hidrofóbicos (ME02, ME03, TP03 e TP04) com cLogP maiores que 3,16 não apresentaram a capacidade de aumentar a parasitemia (**Figura 12**), apesar de o tratamento subsequente dos parasitas com melatonina e inibição da resposta induzida por esta sugerirem interação com o mesmo sítio de ligação para melatonina (**Figura 13**).

Tabela 2- Estrutura dos indóis sintéticos das séries TP e ME, IC₅₀ e cLogP.

Composto	R	R ₁	IC ₅₀	cLogP
TP01	H	Me	N/A	1,79
TP02	H		N/A	2,71
TP03	H		N/A	3,64
TP04	H		N/A	3,26
TP05	H	OMe	N/A	2,04
Melatonina	OMe	Me	N/A	1,68
ME02	OMe		19,17 µM	2,61
ME03	OMe		19,17 µM	3,54
ME04	OMe		2,93 µM	3,16
ME05	OMe		N/A	1,94
ME06	OMe	H	N/A	1,69

*N/A- não apresentou atividade antimalária.

Ainda, com a finalidade de entender a relação entre as modificações estruturais realizadas e a atividade apresentada, a partir da análise da **Figura 12** é possível observar que alguns compostos da série ME e TP (ME05, ME06, TP01, TP02 E TP05) foram capazes de aumentar a parasitemia após 48 horas de incubação, independentemente da presença do radical metoxi no anel indólico. Tal resultado corrobora com os achados de que os precursores da melatonina (**Figura 12**) também se mostraram capazes de modular o ciclo do parasita (BERALDO; GARCIA, 2005; BERALDO; MIKOSHIBA; GARCIA, 2007; BUDU et al., 2007; SCHUCK et al., 2011) independente da presença desse radical, conforme estruturas na **Figura 29**.

Além disso, quando analisamos a atividade antimalárica apresentada pelos compostos ME02, ME03 e ME04 a primeira diferença percebida em relação a esses compostos e os seus compostos análogos TP02, TP03 e TP04 é a presença do radical metoxi na posição R, que mostrou-se determinante para a atividade antiparasitária. Comparativamente, quando buscamos entender a diferença entre os compostos que não apresentaram atividade antimalárica e os que apresentaram, o valor de cLogP parece ser importante para essa atividade. Dentre os 10 indóis testados, apenas ME02, ME03 e ME04 apresentaram atividade antimalárica. Dentro da série de compostos ME, esses compostos se diferenciam por apresentar cLog acima de 2,6, enquanto melatonina, ME05 e ME06 apresentam cLog P na faixa entre 1,69-1,98. Avaliar apenas o valor de cLog não explica completamente a atividade dessas moléculas, porém, o aumento do cLogP está relacionado com um maior lipofilicidade, que resulta no aumento da permeação a membranas e maior ligação a sítios ativos em proteínas, que geralmente mostram-se hidrofóbicos (SUPEK et al., 2011; VAN DE WATERBEEMD; SMITH; JONES, 2001) evidenciando a importância dessa característica nas moléculas analisadas nessa tese.

A lipofilicidade é um parâmetro importante no desenvolvimento de novos compostos ativos. A lipofilicidade de um composto é expressa através do coeficiente de partição (logP). ClogP é uma medida feita através da análise da estrutura do composto e que indica a tendência do composto particionar-se na fase orgânica ou fase oleosa de uma solução. Tradicionalmente busca-se utilizar compostos com valores de cLogP entre 2-4 por exibirem a melhor performance de permeação e absorção. Valores de cLogP muito baixos (abaixo de 0 indicam baixa probabilidade de permeação a membranas, já valores altos, maiores que 4, indicam baixa solubilidade aquosa, tornando a absorção complicada (SUPEK et al., 2011) (KERNS; DI; CARTER, 2008) além de propiciar ligação a proteínas do plasma e P_{450} aumentando o caráter tóxico do fármaco (CRONIN,

2006; LEESON; SPRINGTHORPE, 2007). LEESON; SPRINGTHORPE (2007) analisaram o perfil de 592 fármacos de ingestão oral aprovados desde 1965 e mostraram que a média do cLogP desses fármacos manteve uma média ao longo dos anos (cLogP entre 2-4), indicando que essa propriedade deve ser uma característica importante a ser considerada no desenvolvimento de uma molécula biologicamente ativa. Gamo et al. (2010) avaliaram aproximadamente 2 milhões de fármacos de uma biblioteca da GlaxoSmithKline, buscando compostos com atividade antimalárica e que pudessem servir para o design futuro de novos fármacos para o tratamento da malária, e mostraram que aproximadamente 13.000 ativos na concentração de 2 μ M apresentaram atividade acima de 80% na inibição do crescimento de diferentes cepas de *P. falciparum in vitro*. Interessantemente, o cLogP desses compostos ficou em média igual a 5, valor significativamente maior que a média do cLogP dos 2 milhões de ativos avaliados (cLogP= 3,3). Os autores sugerem que a maior lipofilicidade possibilitou uma maior atividade antimalárica possivelmente por facilitar a permeação e a ligação as proteínas alvo no parasita.

As modificações realizadas na estrutura da melatonina e triptaminas foram determinantes na alteração da atividade dessas moléculas. O aumento da lipofilicidade parece diminuir a capacidade dos ativos em aumentar a parasitemia do *Plasmodium* em comparação com a melatonina. Por outro lado, o aumento da lipofilicidade e a presença do radical metoxi foram importantes para a manutenção da atividade antimalárica. Baseado nesses resultados e em resultados publicados e comentados nos parágrafos acima, o anel indólico é uma estrutura importante no ciclo de vida do *Plasmodium*, interagindo com sítios de ligação de proteínas do parasita, podendo modular o ciclo do *Plasmodium* bem como inibir o crescimento do mesmo. Essa classe de compostos possui diversos mecanismos de ação descritos e mostra-se promissora no desenvolvimentos de drogas que não estejam sob a pressão de resistência aos atuais fármacos utilizados. Estudos envolvendo modificações nessa estrutura são de grande importância para a compreensão do ciclo de vida do parasita bem como para o desenvolvimento de uma nova classe de fármacos com atividade antimalárica.

5.3 Avaliação biológica de novas hidroxinaftoquinonas sintéticas como antimalárico

Nesta tese foram testadas 5 diferentes hidroxinaftoquinonas sintetizadas a partir da lausona, uma hidroxinaftoquinona natural presente na composição do corante henna. Modificações na molécula lausona com o objetivo de se obter moléculas com atividade antimalárica tem sido

produzidas desde a década de 1940 (FIESER; BERLINER; ET AL., 1948). Sem dúvida a mais bem sucedida hidroxinaftoquinona desenvolvida com fins antimaláricos foi a atovacona, que mostrou-se um potente inibidor da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria do *Plasmodium* e cuja combinação com proguanil originou o medicamento Malarone (HUDSON et al., 1991; PAINTER et al., 2007).

Vários trabalhos utilizaram fármacos contendo modificações na estrutura da atovacona ou da lausona buscando encontrar ativos com potencial antimalárico, com boas propriedades de absorção e que driblem a resistência apresentada por parasitas com mutações no gene da citocromo bc1 (BARTON et al., 2010). Uma série de novas hidroxinaftoquinonas foi descrita por El Hage et al. (2009) com modificações na região 3-hidroxi da atovacona. O intuito dos autores era melhorar a biodisponibilidade dessas moléculas. No entanto, apesar da obtenção de compostos altamente eficientes na inibição do crescimento do *Plasmodium*, esses compostos apresentaram biodisponibilidade similar a da atovaquone, não havendo melhora na absorção desses compostos na administração por via oral. Uma relação interessante apresentada nesse trabalho foi o fato de que a adição de ésteres na região 3-hidroxi da atovacona gerou compostos ativos na faixa nanomolar, porém, a adição de cadeias muito longas, diminui significativamente a atividade antimalárica desses compostos.

Uma série de 26 naftoquinonas, baseadas na estrutura da rinacantina, uma naftoquinona com propriedades anticancerígenas, foi sintetizada por Kongkathip et al. (2010). Duas dessas moléculas apresentaram atividade nanomolar na inibição do crescimento do *P. falciparum*, e adicionalmente, foram capazes de inibir o complexo da citocromo bc1 do parasita. Buscando contornar a resistência que algumas cepas apresentam a atovacona, principalmente devido a mutações no gene da citocromo b, Hughes et al. (2011) sintetizaram hidroxinaftoquinonas com radical metil no anel quinonoídico. Surpreendentemente compostos com essa modificação foram capazes de apresentar excelente atividade anti-malárica em cepas resistentes a atovacona, além de eficientemente interferir na atividade mitocondrial do parasita. Outra modificação que parece ser importante na atividade de 2-hidroxinaftoquinonas foi encontrada através do *screening* de uma biblioteca de 2-hidroxinaftoquinonas com modificações na sua cadeia lateral (KESSL et al., 2007). A adição de cadeias laterais alquiladas revelou a atividade de compostos que

eficientemente ligam-se ao complexo bc1 de leveduras, mostrando potencial no desenvolvimento de fármacos com ação antimalárica.

As hidroxinaftoquinonas avaliadas nesta tese apresentaram em sua maioria atividade antimalárica considerada intermediária, com excessão do composto N3 que apresentou IC_{50} na faixa nanomolar após 48 horas de incubação em uma cultura de *P. falciparum* 37D. Todas as modificações foram feitas no mesmo radical da estrutura da lausona (Tabela 3) e os compostos apresentaram cLogP que variaram de 1,81 a 3,08. O cLogP parece ser importante nessa série, uma vez que a menor atividade antimalárica foi obtida com o composto N1 que possui o menor índice de lipofilicidade. Apesar do valor de cLogP não explicar por si só a atividade de um composto, este parâmetro é relevante no desenvolvimento de novos fármacos. Notavelmente a atovacona possui cLogP de 5,14. A capacidade de penetrar membranas celulares e ligar-se a sítios hidrofóbicos parece ser determinante para esta classe de compostos.

Os experimentos da **Figura 23**, mostram que o composto N3 atua rompendo o potencial de membrana da mitocôndria. É aceito atualmente, que o principal mecanismo de ação da combinação atovacona-proguanil é a inibição do complexo bc1 da mitocôndria, levando a um bloqueio da biossíntese das pirimidinas (HAMMOND; BURCHELL; PUDNEY, 1985; PAINTER et al., 2007; SRIVASTAVA; ROTTENBERG; VAIDYA, 1997).

Comparativamente, o composto N3 apresentou uma atividade antimalárica menos eficiente que a atovacona ($IC_{50N3}=440$ nM e $IC_{50ATVQ}= 9$ nM), indicando que a atocavona possui uma estrutura mais eficiente na inibição do crescimento do parasita. Por outro lado, o composto N3 parece ser um melhor inibidor da cadeia de elétrons da mitocôndria, uma vez que após 1 hora, N3 colapsou o potencial de membrana de forma dose dependente (**Figura 3**). Já a droga atovacona mostrou apenas uma leve inibição do potencial de membrana da mitocôndria, resultado semelhante àquele obtido por Painter et al. (2007) utilizando a mesma sonda fluorescente Mitotracker (Molecular Probes), marcador que acumula-se na membrana mitocondrial de forma dependente ao potencial elétrico da membrana. Nesse trabalho, o autor mostrou que a inibição do potencial de membrana mitocondrial pela atovacona é dependente da adição conjunta com proguanil que irão agir de forma sinérgica na organela. Srivastava et al. (1999) mostrou efeito similar em ensaio realizados em *P. yoelii*, usando o marcador de potencial de membrana mitocondrial DIOC₆.

Ensaio de citotoxicidade *in vitro* são importantes no desenvolvimento de novas drogas pois auxiliam na escolha de candidatos que passarão para testes de desafio *in vivo* e de farmacocinética, mais demorados e com maior custo. Espera-se que uma droga promissora apresente baixa toxicidade em células humanas e uma alta eficiência como antimalárico. Em relação a citotoxicidade, N3 e atovacona não apresentaram potencial citotóxico para células HEK293, apresentando $CC_{50} > 50 \mu M$. *Screenings* de novos ativos geralmente consideram $10 \mu M$ o cut-off para CC_{50} de novos fármacos em desenvolvimento, sendo valores maiores de CC_{50} considerados seguros (MAHMOUDI et al., 2006; ROTTMANN et al., 2010). O índice de seletividade (SI, CC_{50}/IC_{50}) de um composto informa o quão específica é a sua ação em relação a toxicidade em células do hospedeiro, quanto maior o valor do índice mais eficiente é o composto. N3 apresenta um SI= 124 mostrando que N3 possui um bom potencial para ser usado como inibidor da atividade mitocondrial em *Plasmodium*.

Tabela 3- Estrutura das hidroxinaftoquinonas sintéticas, IC₅₀ e cLogP.

Composto	R ₁	IC ₅₀	cLogP
N1	CH ₃	89 µM	1.81
N2		13,7 µM	2.82
N3		0,44 µM	3.08
N4		16 µM	2.98
N5		15,2 µM	3.09

Ensaio *in vivo* realizados no modelo murino de infecção por *P. berghei* não apresentaram uma eficiência marcante do composto N3 como antimalárico ao longo da infecção. Nos primeiros dias após a administração do composto foi possível verificar um controle significativo do avanço da parasitemia na infecção com *P. berghei* ANKA GFP. As concentrações 20, 10 e 5 apresentaram reduções significativas de parasitemia no quarto dia após a administração do composto (48,2%; 33,2% e 54%, respectivamente). Porém, no decorrer do processo de infecção, e com a interrupção da administração do composto, a parasitemia voltou a se desenvolver plenamente, indicando que, apesar de uma ação inicial no controle da parasitemia, esse efeito não se sustentou ao longo do tempo (**Figuras 27, 28 e 29**). Uma série de hidroxinaftoquinonas sintetizadas por Muller, T. et al. (2011) que possuem grande semelhança com a série testada nesta tese, apresentando diferença no

radical hidroxila que foi substituído por um radical metila, mostrou resultados semelhantes nos ensaios *in vivo* utilizando *P. berghei* ANKA. No ensaio, dentre os compostos testados que apresentaram redução de parasitemia no quarto dia após o início do tratamento a melhor atividade reportada foi entre 20,7% (50 mg/Kg/dia, ativo 1a) e 43,4% (30 mg/kg/dia, ativo 1g).

Avaliando os resultados obtidos nos experimentos *in vivo* do modelo murino de infecção malárica, o composto N3 apresentou uma atividade inicial promissora, mas ao longo da infecção esse efeito não foi persistente. Sabe-se que as hidroxinaftoquinonas são potentes inibidores da cadeia transportadora de elétrons, porém, possuem sérios problemas relacionados a absorção no organismo. Sabe-se que a droga atovacona, que também é uma hidroxinaftoquinona, possui problemas de absorção e sua indicação de tratamento para humanos é por via oral juntamente com alimento gorduroso, visando melhorar a absorção (ROLAN et al., 1994). Modificações na estrutura dessas moléculas que mantenham a atividade antimalárica, e que aumentem as propriedades de absorção e meia-vida do composto podem representar um caminho promissor para o desenvolvimento de drogas antimaláricas.

6 CONCLUSÕES

- Nossos resultados apresentados nesta tese evidenciam o uso da técnica de citometria de fluxo a partir dos marcadores fluorescentes (YOYO-1 e Mitotracker Red CMXRos) estabelecendo um método rápido e sensível para avaliar o efeito de novos compostos no ciclo intraeritrocítico do *Plasmodium*. Através dessa técnica foi possível determinar a parasitemia e a proporção de parasitas mono e multinucleados de forma rápida e sensível, bem como avaliar a atividade e o mecanismo de ação de novos compostos sintéticos em *P. falciparum* 3D7. Os resultados apresentados podem contribuir para o conhecimento de novas drogas com mecanismo de ação no ciclo intraeritrocítico do parasita.
- Os indóis são uma classe de compostos importantes para a manutenção do ciclo do *Plasmodium* e se mostram promissores para o desenvolvimento de novos antimaláricos. Dentre as moléculas avaliadas, o valor de cLogP, variou com as modificações introduzidas em R1. Desta forma foi possível correlacionar esta característica com a atividade dos compostos testados, evidenciando que o valor de cLogP é importante no *design* de compostos ativos. Além disso, o radical metoxi do anel indólico também mostrou ser fundamental para atividade biológica apresentada por ME02, ME03 e ME04. As moléculas avaliadas na tese servirão para o aperfeiçoamento e modelamento de novas estruturas indólicas com atividade antiparasitária.
- As hidroxinaftoquinonas testadas apresentaram atividade antimalárica moderada com exceção de N3 que apresentou IC₅₀ na faixa nanomolar. O composto N3 mostrou-se um potente inibidor do potencial de membrana mitocondrial, além de apresentar baixo potencial citotóxico em células HEK 293T e em camundongos inoculados com diferentes concentrações do composto. Nos ensaios utilizando o modelo de infecção murino *in vivo*, N3 foi capaz de controlar o avanço da parasitemia nos primeiros dias após a infecção. No entanto, a longo prazo a infecção voltou a se desenvolver. Os estudos com N3 poderão ser considerados para o desenvolvimento de outras moléculas desta classe de fármacos.

REFERÊNCIAS*

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. **Malar. J.**, v. 10, p. 144-153, 2011.

ADJUIK, M.; BABIKER, A.; GARNER, P.; OLLIARO, P.; TAYLOR, W.; WHITE, N.; INTERNATIONAL ARTEMISININ STUDY, G. Artesunate combinations for treatment of malaria: meta-analysis. **Lancet.**, v. 363, n. 9402, p. 9-17, 2004.

AFONSO, A.; NETO, Z.; CASTRO, H.; LOPES, D.; ALVES, A. C.; TOMAS, A. M.; ROSARIO, V. D. *Plasmodium chabaudi chabaudi* malaria parasites can develop stable resistance to atovaquone with a mutation in the cytochrome b gene. **Malar. J.**, v. 9, p. 135-143, 2010.

AIKAWA, M. High-resolution autoradiography of malarial parasites treated with 3 H-chloroquine. **Am. J. Pathol.**, v. 67, n. 2, p. 277-284, 1972a.

AIKAWA, M. *Plasmodium*: high-voltage electron microscopy. **Exp. Parasitol.**, v. 32, n. 1, p. 127-130, 1972b.

AJDUKIEWICZ, K. M.; ONG, E. L. Management of *vivax* malaria with low sensitivity to primaquine. **J. Infect.**, v. 54, n. 3, p. 209-211, 2007.

ALVES, E.; BARTLETT, P. J.; GARCIA, C. R.; THOMAS, A. P. Melatonin and IP3-induced Ca²⁺ release from intracellular stores in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* within infected red blood cells. **J. Biol. Chem.**, v. 286, n. 7, p. 5905-5912, 2011.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

AMINO, R.; THIBERGE, S.; MARTIN, B.; CELLI, S.; SHORTE, S.; FRISCHKNECHT, F.; MÉNARD, R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nat. Med.**, v. 12, n. 2, p. 220-224, 2006.

ARENDT, J.; DEACON, S.; ENGLISH, J.; HAMPTON, S.; MORGAN, L. Melatonin and adjustment to phase shift. **J. Sleep Res.**, v. 4, n. S2, p. 74-79, 1995.

ARNOT, D. E.; RONANDER, E.; BENGTSSON, D. C. The progression of the intra-erythrocytic cell cycle of *Plasmodium falciparum* and the role of the centriolar plaques in asynchronous mitotic division during schizogony. **Int. J. Parasitol.**, v. 41, n. 1, p. 71-80, 2011.

ASHLEY, E. A.; MCGREADY, R.; HUTAGALUNG, R.; PHAIPHUN, L.; SLIGHT, T.; PROUX, S.; THWAI, K. L.; BAREND, M.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N. J.; NOSTEN, F. A randomized, controlled study of a simple, once-daily regimen of dihydroartemisinin-piperaquine for the treatment of uncomplicated, multidrug-resistant *falciparum* malaria. **Clin. Infect. Dis.**, v. 41, n. 4, p. 425-432, 2005.

BACON, D. J.; LATOUR, C.; LUCAS, C.; COLINA, O.; RINGWALD, P.; PICOT, S. Comparison of a SYBR green I-based assay with a histidine-rich protein II enzyme-linked immunosorbent assay for *in vitro* antimalarial drug efficacy testing and application to clinical isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 4, p. 1172-1178, 2007.

BAGNARESI, P.; MARKUS, R.; HOTTA, C.; POZZAN, T.; GARCIA, C. R. Desynchronizing *Plasmodium* Cell Cycle Increases Chloroquine Protection at Suboptimal Doses. **Open Parasitol. J.**, v. 2, p. 55-58, 2008.

BAGNARESI, P.; ALVES, E.; DA SILVA, H. B.; EPIPHANIO, S.; MOTA, M. M.; GARCIA, C. R. Unlike the synchronous *Plasmodium falciparum* and *P. chabaudi* infection, the *P. berghei* and *P. yoelii* asynchronous infections are not affected by melatonin. **Int. J. Gen. Med.**, v. 2, p. 47-55, 2009.

BAGNARESI, P.; NAKABASHI, M.; THOMAS, A. P.; REITER, R. J.; GARCIA, C. R. The role of melatonin in parasite biology. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 181, n. 1, p. 1-6, 2012.

BAIRD, J. K. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 11, p. 4075-4083, 2004.

BALIRAIN, F. N.; NSOBYA, S. L.; ACHAN, J.; TIBENDERANA, J. K.; TALISUNA, A. O.; GREENHOUSE, B.; ROSENTHAL, P. J. Limited ability of *Plasmodium falciparum* pfcr, pfmdr1, and pfhe1 polymorphisms to predict quinine *in vitro* sensitivity or clinical effectiveness in Uganda. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 55, n. 2, p. 615-622, 2011.

BANNISTER, L.; MITCHELL, G. The ins, outs and roundabouts of malaria. **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 5, p. 209-213, 2003.

BANNISTER, L. H.; HOPKINS, J. M.; FOWLER, R. E.; KRISHNA, S.; MITCHELL, G. H. A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. **Parasitol. Today**, v. 16, n. 10, p. 427-433, 2000.

BARKAN, D.; GINSBURG, H.; GOLENSER, J. Optimisation of flow cytometric measurement of parasitaemia in *Plasmodium*-infected mice. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, n. 5, p. 649-653, 2000.

BARTON, V.; FISHER, N.; BIAGINI, G. A.; WARD, S. A.; O'NEILL, P. M. Inhibiting *Plasmodium* cytochrome bc1: a complex issue. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 14, n. 4, p. 440-446, 2010.

BASCO, L. K.; RINGWALD, P. *In vitro* activities of piperaquine and other 4-aminoquinolines against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in Cameroon. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, n. 4, p. 1391-1394, 2003.

BAUM, J.; RICHARD, D.; HEALER, J.; RUG, M.; KRNAJSKI, Z.; GILBERGER, T. W.; GREEN, J. L.; HOLDER, A. A.; COWMAN, A. F. A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across malaria life cycle stages and other apicomplexan parasites. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 8, p. 5197-5208, 2006.

BERALDO, F. H.; GARCIA, C. R. Products of tryptophan catabolism induce Ca^{2+} release and modulate the cell cycle of *Plasmodium falciparum* malaria parasites. **J. Pineal Res.**, v. 39, n. 3, p. 224-230, 2005.

BERALDO, F. H.; ALMEIDA, F. M.; DA SILVA, A. M.; GARCIA, C. R. Cyclic AMP and calcium interplay as second messengers in melatonin-dependent regulation of *Plasmodium falciparum* cell cycle. **J. Cell Biol.**, v. 170, n. 4, p. 551-557, 2005.

BERALDO, F. H.; MIKOSHIBA, K.; GARCIA, C. R. Human malarial parasite, *Plasmodium falciparum*, displays capacitative calcium entry: 2-aminoethyl diphenylborinate blocks the signal transduction pathway of melatonin action on the *P. falciparum* cell cycle. **J. Pineal Res.**, v. 43, n. 4, p. 360-364, 2007.

BEUTLER, E.; DUPARC, S.; GROUP, G. P. D. W. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and antimalarial drug development. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, n. 4, p. 779-789, 2007.

BHAKDI, S. C.; SRATONGNO, P.; CHIMMA, P.; RUNGRUANG, T.; CHUNCHARUNEE, A.; NEUMANN, H. P.; MALASIT, P.; PATTANAPANYASAT, K. Re-evaluating acridine orange for rapid flow cytometric enumeration of parasitemia in malaria-infected rodents. **Cytometry A**, v. 71, n. 9, p. 662-667, 2007.

BHATTACHARJEE, S.; VAN OOIJ, C.; BALU, B.; ADAMS, J. H.; HALDAR, K. Maurer's clefts of *Plasmodium falciparum* are secretory organelles that concentrate virulence protein reporters for delivery to the host erythrocyte. **Blood**, v. 111, n. 4, p. 2418-2426, 2008.

BIARNAIS, T.; LANDAU, I.; RICHARD-LENOBLE, D. Changes in schizogony and drug response in two lines of rodent *Plasmodium*, *P. berghei* NK 65 and *P. berghei* ANKA. **Parasite**, v. 9, n. 1, p. 51-57, 2002.

BLAIR, P. L.; WITNEY, A.; HAYNES, J. D.; MOCH, J. K.; CARUCCI, D. J.; ADAMS, J. H. Transcripts of developmentally regulated *Plasmodium falciparum* genes quantified by real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, n. 10, p. 2224-2231, 2002a.

BLAIR, P. L.; KAPPE, S. H.; MACIEL, J. E.; BALU, B.; ADAMS, J. H. *Plasmodium falciparum* MAEBL is a unique member of the ebl family. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 122, n. 1, p. 35-44, 2002b.

BRASSEUR, P.; BITSINDOU, P.; MOYOU, R. S.; EGGELTE, T. A.; SAMBA, G.; PENCHENIER, L.; DRUILHE, P. Fast emergence of *Plasmodium falciparum* resistance to halofantrine. **Lancet.**, v. 341, n. 8849, p. 901-902, 1993.

BRAY, P. G.; JANNEH, O.; WARD, S. A. Chloroquine uptake and activity is determined by binding to ferriprotoporphyrin IX in *Plasmodium falciparum*. **Novartis Found Symp.**, v. 226, n., p. 252-260; discussion 260-254, 1999.

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*. **J. Cell Biol.**, v. 145, n. 2, p. 363-376, 1999.

BRYSON, H. M.; GOA, K. L. Halofantrine. A review of its antimalarial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential. **Drugs**, v. 43, n. 2, p. 236-258, 1992.

BUDU, A.; PERES, R.; BUENO, V. B.; CATALANI, L. H.; GARCIA, C. R. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine modulates the cell cycle of malaria parasites. **J. Pineal Res.**, v. 42, n. 3, p. 261-266, 2007.

BUTLER, A. R.; KHAN, S.; FERGUSON, E. A brief history of malaria chemotherapy. **J. R. Coll. Physicians Edinb.**, v. 40, n. 2, p. 172-177, 2010.

CAMPO, J. J.; APONTE, J. J.; NHABOMBA, A. J.; SACARLAL, J.; ANGULO-BARTUREN, I.; JIMENEZ-DIAZ, M. B.; ALONSO, P. L.; DOBANO, C. Feasibility of flow cytometry for measurements of *Plasmodium falciparum* parasite burden in studies in areas of malaria endemicity by use of bidimensional assessment of YOYO-1 and autofluorescence. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, n. 3, p. 968-974, 2011.

CAMUS, D.; HADLEY, T. J. A *Plasmodium falciparum* antigen that binds to host erythrocytes and merozoites. **Science**, v. 230, n. 4725, p. 553-556, 1985.

CARME, B.; GAY, F.; HAYETTE, M. P.; DIQUET, B.; DANIS, M. Halofantrine resistance in African countries. **Lancet**, v. 341, n. 8855, p. 1282-1283, 1993.

CHEVALLEY, S.; COSTE, A.; LOPEZ, A.; PIPY, B.; VALENTIN, A. Flow cytometry for the evaluation of anti-plasmodial activity of drugs on *Plasmodium falciparum* gametocytes. **Malar. J.**, v. 9, p. 49, 2010.

CHIODINI, P. L., CONLON, C. P.; HUTCHINSON, D. B. ; FARQUHAR, J. A.; HALL, A. P.; PETO, T. E.; BIRLEY, H.; WARRELL, D. A. Evaluation of atovaquone in the treatment of patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.36, p. 1073-1078, 1995.

CHONGSUPHAJAISIDDHI, T.; SABCHAREON, A.; ATTANATH, P. Treatment of quinine resistant *falciparum* malaria in Thai children. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 14, n. 3, p. 357-362, 1983.

CHOU, A. C.; FITCH, C. D. Hemolysis of mouse erythrocytes by ferriprotoporphyrin IX and chloroquine. Chemotherapeutic implications. **J. Clin. Invest.**, v. 66, n. 4, p. 856-858, 1980.

CHOU, A. C.; FITCH, C. D. Mechanism of hemolysis induced by ferriprotoporphyrin IX. **J. Clin. Invest.**, v. 68, n. 3, p. 672-677, 1981.

CHOU, A. C.; FITCH, C. D. Heme polymerase: modulation by chloroquine treatment of a rodent malaria. **Life Sci.**, v. 51, n. 26, p. 2073-2078, 1992.

CHOU, A. C.; FITCH, C. D. Control of heme polymerase by chloroquine and other quinoline derivatives. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 195, n. 1, p. 422-427, 1993.

COGSWELL, F. B. The hypnozoite and relapse in primate malaria. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 5, n. 1, p. 26-35, 1992.

COLLINS, W. E.; JEFFERY, G. M. *Plasmodium* malariae: parasite and disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 20, n. 4, p. 579-592, 2007.

COPINGA, S.; TEPPER, P. G.; GROL, C. J.; HORN, A. S.; DUBOCOVICH, M. L. 2-Amido-8-methoxytetralins: a series of nonindolic melatonin-like agents. **J. Med. Chem.**, v. 36, n. 20, p. 2891-2898, 1993.

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 755-766, 2006.

COX-SINGH, J.; SINGH, B. Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance? **Trends Parasitol.**, v. 24, n. 9, p. 406-410, 2008.

CRONIN, M. The role of hydrophobicity in toxicity prediction. **Current Computer - Aided Drug Design**, v. 2, n. 4, p. 405-413, 2006.

CUI, L.; SU, X. Z. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. **Expert. Rev. Anti Infect Ther.**, v. 7, n. 8, p. 999-1013, 2009.

DANOUN, S.; BAZIARD-MOUYSSET, G.; STIGLIANI, J.; ANÉ-MARGAIL, M.; PAYARD, M.; LÉGER, J.; CANRON, X.; VIAL, HENRI / ; LOISEAU, P.; BORIES, C. Synthesis and protozoocidal activity of new 1, 4-naphthoquinones. **Heterocyclic Communications**, v. 5, n. 4, p. 343-348, 1999.

DAVIS, T. M.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; SUPANARANOND, W.; LOOAREESUWAN, S.; KRISHNA, S.; NAGACHINTA, B.; TURNER, R. C.; WHITE, N. J. Glucose metabolism in quinine-treated patients with uncomplicated *falciparum* malaria. **Clin. Endocrinol. (Oxf)**, v. 33, n. 6, p. 739-749, 1990.

DAVIS, T. M.; HUNG, T. Y.; SIM, I. K.; KARUNAJEEWA, H. A.; ILETT, K. F. Piperaquine: a resurgent antimalarial drug. **Drugs**, v. 65, n. 1, p. 75-87, 2005.

DEHARO, E.; COQUELIN, F.; CHABAUD, A. G.; LANDAU, I. The erythrocytic schizogony of two synchronized strains of *Plasmodium berghei*, NK65 and ANKA, in normocytes and reticulocytes. **Parasitol. Res.**, v. 82, n. 2, p. 178-182, 1996.

DEPREUX, P.; LESIEUR, D.; MANSOUR, H. A.; MORGAN, P.; HOWELL, H. E.; RENARD, P.; CAIGNARD, D. H.; PFEIFFER, B.; DELAGRANGE, P.; GUARDIOLA, B. Synthesis and structure-activity relationships of novel naphthalenic and bioisosteric related amidic derivatives as melatonin receptor ligands. **J. Med. Chem.**, v. 37, n. 20, p. 3231-3239, 1994.

DESAI, P. V.; PATNY, A.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; TEKWANI, B.; SRIVASTAVA, A.; AVERY, M. Identification of novel parasitic cysteine protease inhibitors by use of virtual screening. 2. The available chemical directory. **J. Med. Chem.**, v. 49, n. 5, p. 1576-1584, 2006.

DESJARDINS, R. E.; CANFIELD, C. J.; HAYNES, J. D.; CHULAY, J. D. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 16, n. 6, p. 710-718, 1979.

DING, X. C.; BECK, H. P.; RASO, G. *Plasmodium* sensitivity to artemisinins: magic bullets hit elusive targets. **Trends Parasitol.**, v. 27, n. 2, p. 73-81, 2011.

DOKOMAJILAR, C.; NSOBYA, S. L.; GREENHOUSE, B.; ROSENTHAL, P. J.; DORSEY, G. Selection of *Plasmodium falciparum* pfmdr1 alleles following therapy with artemether-lumefantrine in an area of Uganda where malaria is highly endemic. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 5, p. 1893-1895, 2006.

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.; LINDEGARDH, N.; SOCHEAT, D.; WHITE, N. J. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. **N. Engl. J. Med.**, v. 361, n. 5, p. 455-467, 2009.

DONDORP, A. M.; FAIRHURST, R. M.; SLUTSKER, L.; MACARTHUR, J. R.; BREMAN, J. G.; GUERIN, P. J.; WELLEMS, T. E.; RINGWALD, P.; NEWMAN, R. D.; PLOWE, C. V. The threat of artemisinin-resistant malaria. **N. Engl. J. Med.**, v. 365, n. 12, p. 1073-1075, 2011.

DORIN, D.; SEMBLAT, J. P.; POULLET, P.; ALANO, P.; GOLDRING, J. P.; WHITTLE, C.; PATTERSON, S.; CHAKRABARTI, D.; DOERIG, C. PfPK7, an atypical MEK-related protein kinase, reflects the absence of classical three-component MAPK pathways in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Mol. Microbiol.**, v. 55, n. 1, p. 184-196, 2005.

DORIN-SEMBLAT, D.; SICARD, A.; DOERIG, C.; RANFORD-CARTWRIGHT, L.; DOERIG, C. Disruption of the PfPK7 gene impairs schizogony and sporogony in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Eukaryot. Cell**, v. 7, n. 2, p. 279-285, 2008.

DORN, A.; STOFFEL, R.; MATILE, H.; BUBENDORF, A.; RIDLEY, R. G. Malarial haemozoin/beta-haematin supports haem polymerization in the absence of protein. **Nature**, v. 374, n. 6519, p. 269-271, 1995.

DOWNIE, M. J.; KIRK, K.; MAMOUN, C. B. Purine salvage pathways in the intraerythrocytic malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Eukaryot. Cell**, v. 7, n. 8, p. 1231-1237, 2008.

DRESSMAN, J. B.; REPPAS, C. *In vitro-in vivo* correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 11 Suppl 2, n., p. S73-80, 2000.

DURASINGH, M. T.; MAIER, A. G.; TRIGLIA, T.; COWMAN, A. F. Erythrocyte-binding antigen 175 mediates invasion in *Plasmodium falciparum* utilizing sialic acid-dependent and -independent pathways. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, n. 8, p. 4796-4801, 2003.

EASTMAN, R. T.; FIDOCK, D. A. Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 7, n. 12, p. 864-874, 2009.

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, n. 6951, p. 957-961, 2003.

EGAN, T. J.; ROSS, D. C.; ADAMS, P. A. Quinoline anti-malarial drugs inhibit spontaneous formation of beta-haematin (malaria pigment). **FEBS Lett.**, v. 352, n. 1, p. 54-57, 1994.

EL HAGE, S.; ANE, M.; STIGLIANI, J. L.; MARJORIE, M.; VIAL, H.; BAZIARD-MOUYSSET, G.; PAYARD, M. Synthesis and antimalarial activity of new atovaquone derivatives. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 44, n. 11, p. 4778-4782, 2009.

ELFORD, B. C.; COWAN, G. M.; FERGUSON, D. J. Parasite-regulated membrane transport processes and metabolic control in malaria-infected erythrocytes. **Biochem. J.**, v. 308 (Pt 2), p. 361-374, 1995.

EZZET, F.; MULL, R.; KARBWANG, J. Population pharmacokinetics and therapeutic response of CGP 56697 (artemether + benflumetol) in malaria patients. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 46, n. 6, p. 553-561, 1998.

FAMIN, O.; KRUGLIAK, M.; GINSBURG, H. Kinetics of inhibition of glutathione-mediated degradation of ferriprotoporphyrin IX by antimalarial drugs. **Biochem. Pharmacol.**, v. 58, n. 1, p. 59-68, 1999.

FAMIN, O.; GINSBURG, H. Differential effects of 4-aminoquinoline-containing antimalarial drugs on hemoglobin digestion in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Biochem. Pharmacol.**, v. 63, n. 3, p. 393-398, 2002.

FARIAS, S. L.; GAZARINI, M. L.; MELO, R. L.; HIRATA, I. Y.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; GARCIA, C. R. Cysteine-protease activity elicited by Ca²⁺ stimulus in *Plasmodium*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 141, n. 1, p. 71-79, 2005.

FERREIRA, S.; DA ROCHA, D.; CARNEIRO, J.; SANTOS, W.; FERREIRA, V. A New Method to Prepare 3-Alkyl-2-hydroxy-1,4-naphthoquinones: Synthesis of Lapachol and Phthiocol. **Synlett**, v., n. 11, p. 1551-1554, 2011.

FIDOCK, D. A.; ROSENTHAL, P. J.; CROFT, S. L.; BRUN, R.; NWAKA, S. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, n. 6, p. 509-520, 2004.

FIESER, L. F.; BERLINER, E.; ET AL. Naphthoquinone antimalarials; general survey. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 70, n. 10, p. 3151-3155, 1948.

FIESER, L. F.; SCHIRMER, J. P.; ARCHER, S.; LORENZ, R. R.; PFAFFENBACH, P. I. Naphthoquinone antimalarials. XXIX. 2-hydroxy-3-(omega-cyclohexylalkyl)-1,4-naphthoquinones. **J. Med. Chem.**, v. 10, n. 4, p. 513-517, 1967a.

FIESER, L. F.; NAZER, M. Z.; ARCHER, S.; BERBERIAN, D. A.; SLIGHTER, R. G. Naphthoquinone antimalarials. XXX. 2-hydroxy-3-[omega-(1-adamantyl)alkyl]-1,4-naphthoquinones. **J. Med. Chem.**, v. 10, n. 4, p. 517-521, 1967b.

FITCH, C. D.; CHOU, A. C. Regulation of heme polymerizing activity and the antimalarial action of chloroquine. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, n. 11, p. 2461-2465, 1997.

FITCH, C. D.; CAI, G. Z.; CHEN, Y. F.; RYERSE, J. S. Relationship of chloroquine-induced redistribution of a neutral aminopeptidase to hemoglobin accumulation in malaria parasites. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 410, n. 2, p. 296-306, 2003.

FRANCIS, S. E.; SULLIVAN, D. J., JR.; GOLDBERG, D. E. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 51, n., p. 97-123, 1997.

FRY, M.; HUDSON, A. T.; RANDALL, A. W.; WILLIAMS, R. B. Potent and selective hydroxynaphthoquinone inhibitors of mitochondrial electron transport in *Eimeria tenella* (Apicomplexa: Coccidia). **Biochem. Pharmacol.**, v. 33, n. 13, p. 2115-2122, 1984.

FU, Y.; TILLEY, L.; KENNY, S.; KLONIS, N. Dual labeling with a far red probe permits analysis of growth and oxidative stress in *P. falciparum*-infected erythrocytes. **Cytometry A**, v. 77, n. 3, p. 253-263, 2010.

GALLUP, J. L.; SACHS, J. D. The economic burden of malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 64, n. 1-2 Suppl, p. 85-96, 2001.

GAMO, F. J.; SANZ, L. M.; VIDAL, J.; DE COZAR, C.; ALVAREZ, E.; LAVANDERA, J. L.; VANDERWALL, D. E.; GREEN, D. V.; KUMAR, V.; HASAN, S.; BROWN, J. R.; PEISHOFF, C. E.; CARDON, L. R.; GARCIA-BUSTOS, J. F. Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. **Nature**, v. 465, n. 7296, p. 305-310, 2010.

GARCIA, C. R.; MARKUS, R. P.; MADEIRA, L. Tertian and quartan fevers: temporal regulation in malarial infection. **J. Biol. Rhythms**, v. 16, n. 5, p. 436-443, 2001.

GARNHAM, P. C.; POWERS, K. G. Periodicity of infectivity of plasmodial gametocytes: the "Hawking phenomenon". **Int. J. Parasitol.**, v. 4, n. 1, p. 103-106, 1974.

GARRATT, P. J.; JONES, R.; TOCHER, D. A.; SUGDEN, D. Mapping the melatonin receptor. 3. Design and synthesis of melatonin agonists and antagonists derived from 2-phenyltryptamines. **J. Med. Chem.**, v. 38, n. 7, p. 1132-1139, 1995.

GASTEL, J. A.; ROSEBOOM, P. H.; RINALDI, P. A.; WELLER, J. L.; KLEIN, D. C. Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. **Science**, v. 279, n. 5355, p. 1358-1360, 1998.

GAUR, D.; MAYER, D. C.; MILLER, L. H. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, n. 13-14, p. 1413-1429, 2004.

GAUTRET, P.; MOTARD, A. Periodic infectivity of *Plasmodium* gametocytes to the vector. A review. **Parasite**, v. 6, n. 2, p. 103-111, 1999a.

GAUTRET, P.; MOTARD, A. Periodic infectivity of *Plasmodium* gametocytes to the vector. A review. **Parasite**, v. 6, n. 2, p. 103-111, 1999b.

GAZARINI, M. L.; BERALDO, F. H.; ALMEIDA, F. M.; BOOTMAN, M.; DA SILVA, A. M.; GARCIA, C. R. Melatonin triggers PKA activation in the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. **J. Pineal Res.**, v. 50, n. 1, p. 64-70, 2011.

GILSON, P. R.; CRABB, B. S. Do apicomplexan parasite-encoded proteins act as both ligands and receptors during host cell invasion? **F1000 Biol. Rep.**, v. 1, n., p. 64, 2009.

GINSBURG, H.; FAMIN, O.; ZHANG, J.; KRUGLIAK, M. Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action. **Biochem. Pharmacol.**, v. 56, n. 10, p. 1305-1313, 1998.

GLIGORIJEVIC, B.; MCALLISTER, R.; URBACH, J. S.; ROEPE, P. D. Spinning disk confocal microscopy of live, intraerythrocytic malarial parasites. 1. Quantification of hemozoin development for drug sensitive versus resistant malaria. **Biochemistry**, v. 45, n. 41, p. 12400-12410, 2006.

GLUZMAN, I. Y.; FRANCIS, S. E.; OKSMAN, A.; SMITH, C. E.; DUFFIN, K. L.; GOLDBERG, D. E. Order and specificity of the *Plasmodium falciparum* hemoglobin degradation pathway. **J. Clin. Invest.**, v. 93, n. 4, p. 1602-1608, 1994.

GREENWOOD, B. Anti-malarial drugs and the prevention of malaria in the population of malaria endemic areas. **Malar. J.**, v. 9 Suppl 3, n., p. S2, 2010.

GREENWOOD, B. M.; BOJANG, K.; WHITTY, C. J.; TARGETT, G. A. Malaria. **Lancet**, v. 365, n. 9469, p. 1487-1498, 2005.

GREENWOOD, D. Conflicts of interest: the genesis of synthetic antimalarial agents in peace and war. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 36, n. 5, p. 857-872, 1995.

GRIFFITH, J. W.; O'CONNOR, C.; BERNARD, K.; TOWN, T.; GOLDSTEIN, D. R.; BUCALA, R. Toll-like receptor modulation of murine cerebral malaria is dependent on the genetic background of the host. **J. Infect. Dis.**, v. 196, n. 10, p. 1553-1564, 2007.

GRIMBERG, B. T.; JAWORSKA, M. M.; HOUGH, L. B.; ZIMMERMAN, P. A.; PHILLIPS, J. G. Addressing the malaria drug resistance challenge using flow cytometry to discover new antimalarials. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 19, n. 18, p. 5452-5457, 2009.

GUERRA, F. The introduction of cinchona in the treatment of malaria. Part II. **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, n. 7, p. 135-140, 1977a.

GUERRA, F. The introduction of Cinchona in the treatment of malaria. Part I. **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, n. 6, p. 112-118, 1977b.

GUERRERO, J. M.; REITER, R. J. Melatonin-immune system relationships. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 2, n. 2, p. 167-179, 2002.

HALDAR, K.; MOHANDAS, N. Erythrocyte remodeling by malaria parasites. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 14, n. 3, p. 203-209, 2007.

HAMMOND, D. J.; BURCHELL, J. R.; PUDNEY, M. Inhibition of pyrimidine biosynthesis de novo in *Plasmodium falciparum* by 2-(4-t-butylcyclohexyl)-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone *in vitro*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 14, n. 1, p. 97-109, 1985.

HARTWIG, C. L.; ROSENTHAL, A. S.; D'ANGELO, J.; GRIFFIN, C. E.; POSNER, G. H.; COOPER, R. A. Accumulation of artemisinin trioxane derivatives within neutral lipids of *Plasmodium falciparum* malaria parasites is endoperoxide-dependent. **Biochem. Pharmacol.**, v. 77, n. 3, p. 322-336, 2009.

HATTON, C. S.; PETO, T. E.; BUNCH, C.; PASVOL, G.; RUSSELL, S. J.; SINGER, C. R.; EDWARDS, G.; WINSTANLEY, P. Frequency of severe neutropenia associated with amodiaquine prophylaxis against malaria. **Lancet**, v. 1, n. 8478, p. 411-414, 1986.

HAWKING, F. The clock of the malaria parasite. **Sci. Am.**, v. 222, n. 6, p. 123-131, 1970.

HAYNES, R. K.; KRISHNA, S. Artemisinins: activities and actions. **Microbes Infect.**, v. 6, n. 14, p. 1339-1346, 2004.

HELLMANN, J. K.; MÜNTER, S.; KUDRYASHEV, M.; SCHULZ, S.; HEISS, K.; MÜLLER, A. K.; MATUSCHEWSKI, K.; SPATZ, J. P.; SCHWARZ, U. S.; FRISCHKNECHT, F. Environmental constraints guide migration of malaria parasites during transmission. **PLoS Pathog.**, v. 7, n. 6, p. e1002080, 2011.

HIRONS, G. T.; FAWCETT, J. J.; CRISSMAN, H. A. TOTO and YOYO: new very bright fluorochromes for DNA content analyses by flow cytometry. **Cytometry**, v. 15, n. 2, p. 129-140, 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*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 7, 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. **Nat. Cell Biol.**, v. 2, n. 7, p. 466-468, 2000.

HUDSON, A. T.; DICKINS, M.; GINGER, C. D.; GUTTERIDGE, W. E.; HOLDICH, T.; HUTCHINSON, D. B.; PUDNEY, M.; RANDALL, A. W.; LATTER, V. S. 566C80: a potent broad spectrum anti-infective agent with activity against malaria and opportunistic infections in AIDS patients. **Drugs Exp. Clin. Res.**, v. 17, n. 9, p. 427-435, 1991.

HUGHES, L. M.; COVIAN, R.; GRIBBLE, G. W.; TRUMPOWER, B. L. Probing binding determinants in center P of the cytochrome bc(1) complex using novel hydroxy-naphthoquinones. **Biochim. Biophys Acta.**, v. 1797, n. 1, p. 38-43, 2010.

HUGHES, L. M.; LANTERI, C. A.; O'NEIL, M. T.; JOHNSON, J. D.; GRIBBLE, G. W.; TRUMPOWER, B. L. Design of anti-parasitic and anti-fungal hydroxy-naphthoquinones that are less susceptible to drug resistance. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 177, n. 1, p. 12-19, 2011.

JAMBOU, R.; EL-ASSAAD, F.; COMBES, V.; GRAU, G. E. *In vitro* culture of *Plasmodium berghei*-ANKA maintains infectivity of mouse erythrocytes inducing cerebral malaria. **Malar. J.**, v. 10, n., p. 346, 2011.

JANSE, C. J.; RAMESAR, J.; WATERS, A. P. High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. **Nat. Protoc.**, v. 1, n. 1, p. 346-356, 2006.

JELINEK, T.; SCHELBERT, P.; LOSCHER, T.; EICHENLAUB, D. Quinine resistant *falciparum* malaria acquired in east Africa. **Trop. Med. Parasitol.**, v. 46, n. 1, p. 38-40, 1995.

JOVIN, H.; DAHER, W.; KHALIFE, J.; RICARD, I.; PUIJALON, O. M.; CAPRON, M.; DIVE, D. Double staining of *Plasmodium falciparum* nucleic acids with hydroethidine and thiazole orange for cell cycle stage analysis by flow cytometry. **Cytometry A**, v. 57, n. 1, p. 34-38, 2004.

KALBACOVA, M.; VRBACKY, M.; DRAHOTA, Z.; MELKOVA, Z. Comparison of the effect of mitochondrial inhibitors on mitochondrial membrane potential in two different cell lines using flow cytometry and spectrofluorometry. **Cytometry Part A**, v. 52A, n. 2, p. 110-116, 2003.

KELLER, M.; MAZUCH, J.; ABRAHAM, U.; EOM, G. D.; HERZOG, E. D.; VOLK, H. D.; KRAMER, A.; MAIER, B. A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 106, n. 50, p. 21407-21412, 2009.

KERNS, E. H.; DI, L.; CARTER, G. T. *In vitro* solubility assays in drug discovery. **Curr. Drug Metab.**, v. 9, n. 9, p. 879-885, 2008.

KESSL, J. J.; MOSKALEV, N. V.; GRIBBLE, G. W.; NASR, M.; MESHNICK, S. R.; TRUMPOWER, B. L. Parameters determining the relative efficacy of hydroxy-naphthoquinone inhibitors of the cytochrome bc1 complex. **Biochim. Biophys Acta**, v. 1767, n. 4, p. 319-326, 2007.

KETRANGSEE, S.; VIJAYKADGA, S.; YAMOKGUL, P.; JATAPADMA, S.; THIMASARN, K.; ROONEY, W. Comparative trial on the response of *Plasmodium falciparum* to halofantrine

and mefloquine in Trat Province, eastern Thailand. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 23, n. 1, p. 55-58, 1992.

KHALIQ, A. A.; FOX, E.; SARWAR, M.; STRICKLAND, G. T. Amodiaquine fails to cure chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* in the Punjab. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, n. 1, p. 157-159, 1987.

KONGKATHIP, N.; PRADIDPHOL, N.; HASITAPAN, K.; GRIGG, R.; KAO, W. C.; HUNTE, C.; FISHER, N.; WARMAN, A. J.; BIAGINI, G. A.; KONGSAEREE, P.; CHUAWONG, P.; KONGKATHIP, B. Transforming rhinacanthin analogues from potent anticancer agents into potent antimalarial agents. **J. Med. Chem.**, v. 53, n. 3, p. 1211-1221, 2010.

KOYAMA, F. C.; CHAKRABARTI, D.; GARCIA, C. R. Molecular machinery of signal transduction and cell cycle regulation in *Plasmodium*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 165, n. 1, p. 1-7, 2009.

KOYAMA, F. C.; RIBEIRO, R. Y.; GARCIA, J. L.; AZEVEDO, M. F.; CHAKRABARTI, D.; GARCIA, C. R. Ubiquitin proteasome system and the atypical kinase PfPK7 are involved in melatonin signaling in *Plasmodium falciparum*. **J. Pineal Res.**, v. 53, n. 2, p. 147-153, 2012.

KREMSNER, P. G.; ZOTTER, G. M.; FELDMEIER, H.; GRANINGER, W.; ROCHA, R. M.; WIEDERMANN, G. A comparative trial of three regimens for treating uncomplicated *falciparum* malaria in Acre, Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 158, n. 6, p. 1368-1371, 1988.

KREMSNER, P. G.; KRISHNA, S. Antimalarial combinations. **Lancet**, v. 364, n. 9430, p. 285-294, 2004.

KROTOSKI, W. A.; GARNHAM, P. C.; COGSWELL, F. B.; COLLINS, W. E.; BRAY, R. S.; GWASZ, R. W.; KILLICK-KENDRICK, R.; WOLF, R. H.; SINDEN, R.; HOLLINGDALE, M.; ET AL. Observations on early and late post-sporozoite tissue stages in primate malaria. IV. Pre-erythrocytic schizonts and/or hypnozoites of Chesson and North Korean strains of *Plasmodium vivax* in the chimpanzee. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 35, n. 2, p. 263-274, 1986.

KUEHN, A.; SIMON, N.; PRADEL, G. Family members stick together: multi-protein complexes of malaria parasites. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 199, n. 3, p. 209-226, 2010.

KUMAR, N.; ZHENG, H. Stage-specific gametocytocidal effect *in vitro* of the antimalaria drug qinghaosu on *Plasmodium falciparum*. **Parasitol. Res.**, v. 76, n. 3, p. 214-218, 1990.

KWIATKOWSKI, D.; NOWAK, M. Periodic and chaotic host-parasite interactions in human malaria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, n. 12, p. 5111-5113, 1991.

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **J. Parasitol.**, v. 65, n. 3, p. 418-420, 1979.

LANDGRAF, B.; KOLLARITSCH, H.; WIEDERMANN, G.; WERNSDORFER, W. H. *Plasmodium falciparum*: susceptibility *in vitro* and *in vivo* to chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine in Ghanaian schoolchildren. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 88, n. 4, p. 440-442, 1994.

LEE, B. J.; SINGH, A.; CHIANG, P.; KEMP, S. J.; GOLDMAN, E. A.; WEINHOUSE, M. I.; VLASUK, G. P.; ROSENTHAL, P. J. Antimalarial activities of novel synthetic cysteine protease inhibitors. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 47, n. 12, p. 3810-3814, 2003.

LEESON, P. D.; SPRINGTHORPE, B. The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 6, n. 11, p. 881-890, 2007.

LEGRAND, E.; DEMAR, M.; VOLNEY, B.; EKALA, M. T.; QUINTERNET, M.; BOUCHIER, C.; FANDEUR, T.; ROGIER, C.; CARME, B.; PUIJALON, O. M.; ESTERRE, P. First case of emergence of atovaquone resistance in *Plasmodium falciparum* during second-line atovaquone-proguanil treatment in South America. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 6, p. 2280-2281, 2007.

LI, J.; ZHOU, B. Biological actions of artemisinin: insights from medicinal chemistry studies. **Molecules**, v. 15, n. 3, p. 1378-1397, 2010.

LI, Q.; GERENA, L.; XIE, L.; ZHANG, J.; KYLE, D.; MILHOUS, W. Development and validation of flow cytometric measurement for parasitemia in cultures of *P. falciparum* vitally stained with YOYO-1. **Cytometry A**, v. 71, n. 5, p. 297-307, 2007.

LI, Y.; WU, Y. L. How Chinese scientists discovered qinghaosu (artemisinin) and developed its derivatives? What are the future perspectives? **Med. Trop. (Mars)**, v. 58, n. 3 Suppl, p. 9-12, 1998.

LIMA, W. R.; MORAES, M.; ALVES, E.; AZEVEDO, M. F.; PASSOS, D. O.; GARCIA, C. R. The PfNF-YB transcription factor is a downstream target of melatonin and cAMP signalling in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **J. Pineal Res.**, v. 54, n.2, p. 145-153, 2012.

LOCHER, C. P.; RUBEN, P. C.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J. 5HT1A serotonin receptor agonists inhibit *Plasmodium falciparum* by blocking a membrane channel. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, n. 12, p. 3806-3809, 2003.

LOPES, S. C.; BLANCO, Y. C.; JUSTO, G. Z.; NOGUEIRA, P. A.; RODRIGUES, F. L.; GOELNITZ, U.; WUNDERLICH, G.; FACCHINI, G.; BROCCHI, M.; DURAN, N.; COSTA, F. T. Violacein extracted from *Chromobacterium violaceum* inhibits *Plasmodium* growth *in vitro* and *in vivo*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, n. 5, p. 2149-2152, 2009.

LÓPEZ, M. L.; VOMMARO, R.; ZALIS, M.; DE SOUZA, W.; BLAIR, S.; SEGURA, C. Induction of cell death on *Plasmodium falciparum* asexual blood stages by *Solanum nudum* steroids. **Parasitol. Int.**, v. 59, n. 2, p. 217-225, 2010.

MAHMOUDI, N.; DE JULIAN-ORTIZ, J. V.; CICERON, L.; GALVEZ, J.; MAZIER, D.; DANIS, M.; DEROUIN, F.; GARCIA-DOMENECH, R. Identification of new antimalarial drugs by linear discriminant analysis and topological virtual screening. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 57, n. 3, p. 489-497, 2006.

MAIER, A. G.; RUG, M.; O'NEILL, M. T.; BROWN, M.; CHAKRAVORTY, S.; SZESTAK, T.; CHESSON, J.; WU, Y.; HUGHES, K.; COPPEL, R. L.; NEWBOLD, C.; BEESON, J. G.; CRAIG, A.; CRABB, B. S.; COWMAN, A. F. Exported proteins required for virulence and rigidity of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. **Cell**, v. 134, n. 1, p. 48-61, 2008.

MAKANGA, M.; BASSAT, Q.; FALADE, C. O.; PREMJI, Z. G.; KRUDSOOD, S.; HUNT, P.; WALTER, V.; BECK, H. P.; MARRAST, A. C.; COUSIN, M.; ROSENTHAL, P. J. Efficacy and safety of artemether-lumefantrine in the treatment of acute, uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: a pooled analysis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 85, n. 5, p. 793-804, 2011.

MAKLER, M. T.; PIPER, R. C.; MILHOUS, W. K. Lactate dehydrogenase and the diagnosis of malaria. **Parasitol. Today**, v. 14, n. 9, p. 376-377, 1998.

MARIE, D.; VAULOT, D.; PARTENSKY, F. Application of the novel nucleic acid dyes YOYO-1, YO-PRO-1, and PicoGreen for flow cytometric analysis of marine prokaryotes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 5, p. 1649-1655, 1996.

MASIMIREMBWA, C. M.; PHUONG-DUNG, N.; PHUC, B. Q.; DUC-DAO, L.; SY, N. D.; SKOLD, O.; SWEDBERG, G. Molecular epidemiology of *Plasmodium falciparum* antifolate resistance in Vietnam: genotyping for resistance variants of dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 12, n. 3, p. 203-211, 1999.

MCKENZIE, F.; BOSSERT, W. Multispecies *Plasmodium* infections of humans. **J. Parasitol.**, v. 85, n. 1, p. 12-18, 1999.

MENARD, R.; HEUSSLER, V.; YUDA, M.; NUSSENZWEIG, V. *Plasmodium* pre-erythrocytic stages: what's new? **Trends Parasitol.**, v. 24, n. 12, p. 564-569, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. Brasília: 2010, 36 p.

MOST, H.; LONDON, I. M.; ET AL. Chloroquine for treatment of acute attacks of *vivax* malaria. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 131, n., p. 963-967, 1946.

MOTA, M. M.; PRADEL, G.; VANDERBERG, J. P.; HAFALLA, J. C.; FREVERT, U.; NUSSENZWEIG, R. S.; NUSSENZWEIG, V.; RODRÍGUEZ, A. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. **Science**, v. 291, n. 5501, p. 141-144, 2001.

MULLER, H. E. [Various recommendations in the prophylaxis of chloroquine-resistant malaria]. **Dtsch. Med. Wochenschr.**, v. 111, n. 18, p. 721, 1986.

MULLER, O.; VAN HENSBROEK, M. B.; JAFFAR, S.; DRAKELEY, C.; OKORIE, C.; JOOF, D.; PINDER, M.; GREENWOOD, B. A randomized trial of chloroquine, amodiaquine and pyrimethamine-sulphadoxine in Gambian children with uncomplicated malaria. **Trop. Med. Int. Health**, v. 1, n. 1, p. 124-132, 1996.

MULLER, T.; JOHANN, L.; JANNACK, B.; BRUCKNER, M.; LANFRANCHI, D. A.; BAUER, H.; SANCHEZ, C.; YARDLEY, V.; DEREGNAUCOURT, C.; SCHREVEL, J.; LANZER, M.; SCHIRMER, R. H.; DAVIOUD-CHARVET, E. Glutathione reductase-catalyzed cascade of redox reactions to bioactivate potent antimalarial 1,4-naphthoquinones--a new strategy to combat malarial parasites. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 133, n. 30, p. 11557-11571, 2011.

MUTABINGWA, T. K.; ANTHONY, D.; HELLER, A.; HALLETT, R.; AHMED, J.; DRAKELEY, C.; GREENWOOD, B. M.; WHITTY, C. J. Amodiaquine alone, amodiaquine+sulfadoxine-pyrimethamine, amodiaquine+artesunate, and artemether-lumefantrine for outpatient treatment of malaria in Tanzanian children: a four-arm randomised effectiveness trial. **Lancet**, v. 365, n. 9469, p. 1474-1480, 2005.

NAGAO, E.; ARIE, T.; DORWARD, D. W.; FAIRHURST, R. M.; DVORAK, J. A. The avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum* causes marked structural changes on the surface of its host erythrocyte. **J. Struct. Biol.**, v. 162, n. 3, p. 460-467, 2008.

NEFTEL, K. A.; WOODTLY, W.; SCHMID, M.; FRICK, P. G.; FEHR, J. Amodiaquine induced agranulocytosis and liver damage. **Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)**, v. 292, n. 6522, p. 721-723, 1986.

NOEDL, H.; SE, Y.; SCHAECHER, K.; SMITH, B. L.; SOCHEAT, D.; FUKUDA, M. M.; ARTEMISININ RESISTANCE IN CAMBODIA 1 STUDY, C. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. **N. Engl. J. Med.**, v. 359, n. 24, p. 2619-2620, 2008.

NOEDL, H.; SOCHEAT, D.; SATIMAI, W. Artemisinin-resistant malaria in Asia. **N. Engl. J. Med.**, v. 361, n. 5, p. 540-541, 2009.

NOSTEN, F.; TER KUILE, F. O.; LUXEMBURGER, C.; WOODROW, C.; KYLE, D. E.; CHONGSUPHAJAISIDDHI, T.; WHITE, N. J. Cardiac effects of antimalarial treatment with halofantrine. **Lancet**, v. 341, n. 8852, p. 1054-1056, 1993.

NZILA, A. M.; MBERU, E. K.; SULO, J.; DAYO, H.; WINSTANLEY, P. A.; SIBLEY, C. H.; WATKINS, W. M. Towards an understanding of the mechanism of pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: genotyping of dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of Kenyan parasites. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, n. 4, p. 991-996, 2000.

O'DONNELL, A. J.; SCHNEIDER, P.; MCWATTERS, H. G.; REECE, S. E. Fitness costs of disrupting circadian rhythms in malaria parasites. **Proc. Biol. Sci.**, v. 278, n. 1717, p. 2429-2436, 2011.

OAKLEY, M. S.; KUMAR, S.; ANANTHARAMAN, V.; ZHENG, H.; MAHAJAN, B.; HAYNES, J. D.; MOCH, J. K.; FAIRHURST, R.; MCCUTCHAN, T. F.; ARAVIND, L. Molecular factors and biochemical pathways induced by febrile temperature in intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* parasites. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 4, p. 2012-2025, 2007.

OLLIARO, P.; CASTELLI, F.; CALIGARIS, S.; DRUILHE, P.; CAROSI, G. Ultrastructure of *Plasmodium falciparum* "in vitro". II. Morphological patterns of different quinolines effects. **Microbiologica**, v. 12, n. 1, p. 15-28, 1989.

OLLIARO, P.; NEVILL, C.; LEBRAS, J.; RINGWALD, P.; MUSSANO, P.; GARNER, P.; BRASSEUR, P. Systematic review of amodiaquine treatment in uncomplicated malaria. **Lancet**, v. 348, n. 9036, p. 1196-1201, 1996.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **WHO Global Malaria Programme: World malaria report** : 2011. Geneva: 2011, 259p.

PAGOLA, S.; STEPHENS, P. W.; BOHLE, D. S.; KOSAR, A. D.; MADSEN, S. K. The structure of malaria pigment beta-haematin. **Nature**, v. 404, n. 6775, p. 307-310, 2000.

PAINTER, H. J.; MORRISEY, J. M.; MATHER, M. W.; VAIDYA, A. B. Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 446, n. 7131, p. 88-91, 2007.

PALMIERI, F.; PETROSILLO, N.; PAGLIA, M. G.; CONTE, A.; GOLETTI, D.; PUCILLO, L. P.; MENEGON, M.; SANNELLA, A.; SEVERINI, C.; MAJORI, G. Genetic confirmation of quinine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria followed by postmalaria neurological syndrome in a traveler from Mozambique. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 11, p. 5424-5426, 2004.

PANDEY, K. C.; WANG, S. X.; SIJWALI, P. S.; LAU, A. L.; MCKERROW, J. H.; ROSENTHAL, P. J. The *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-2 captures its substrate, hemoglobin, via a unique motif. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, n. 26, p. 9138-9143, 2005.

PARENTI, M. D.; PACCHIONI, S.; FERRARI, A. M.; RASTELLI, G. Three-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis of a set of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase inhibitors using a pharmacophore generation approach. **J. Med. Chem.**, v. 47, n. 17, p. 4258-4267, 2004.

PASSEMAR, C.; SALÉRY, M.; SOH, P. N.; LINAS, M. D.; AHOND, A.; POUPAT, C.; BENOIT-VICAL, F. Indole and aminoimidazole moieties appear as key structural units in antiplasmodial molecules. **Phytomedicine**, v. 18, n. 13, p. 1118-1125, 2011.

PAUL, R. E.; DOERIG, C.; BREY, P. T. Erythropoiesis and molecular mechanisms for sexual determination in malaria parasites. **IUBMB Life**, v. 49, n. 4, p. 245-248, 2000.

PAUL, R. E.; BREY, P. T.; ROBERT, V. *Plasmodium* sex determination and transmission to mosquitoes. **Trends Parasitol.**, v. 18, n. 1, p. 32-38, 2002.

PERRY, T. L.; PANDEY, P.; GRANT, J. M.; KAIN, K. C. Severe atovaquone-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in a Canadian traveller returned from the Indian subcontinent. **Open Med.**, v. 3, n. 1, p. 10-16, 2009.

PORTER, T. H.; FOIKERS, K. Antimetabolites of coenzyme Q. Their potential application as antimalarials. **Angew Chem. Int. Edit.**, v.13, p. 559-618, 1974.

PRADINES, B.; BRIOLANT, S.; HENRY, M.; OEUVRAY, C.; BARET, E.; AMALVICT, R.; DIDILLON, E.; ROGIER, C. Absence of association between pyronaridine *in vitro* responses and polymorphisms in genes involved in quinoline resistance in *Plasmodium falciparum*. **Malar. J.**, v. 9, n., p. 339, 2010.

PUKRITTAYAKAMEE, S.; VIRAVAN, C.; CHAROENLARP, P.; YEAMPUT, C.; WILSON, R. J.; WHITE, N. J. Antimalarial effects of rifampin in *Plasmodium vivax* malaria. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 38, n. 3, p. 511-514, 1994.

PUKRITTAYAKAMEE, S.; CHOTIVANICH, K.; CHANTRA, A.; CLEMENS, R.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N. J. Activities of artesunate and primaquine against asexual- and sexual-stage parasites in *falciparum* malaria. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 4, p. 1329-1334, 2004.

RASTELLI, G.; SIRAWARAPORN, W.; SOMPORNPIST, P.; VILAIVAN, T.; KAMCHONWONGPAISAN, S.; QUARRELL, R.; LOWE, G.; THEBTARANONTH, Y.; YUTHAVONG, Y. Interaction of pyrimethamine, cycloguanil, WR99210 and their analogues with *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: structural basis of antifolate resistance. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 8, n. 5, p. 1117-1128, 2000.

RAYNER, J. C.; GALINSKI, M. R.; INGRAVALLO, P.; BARNWELL, J. W. Two *Plasmodium falciparum* genes express merozoite proteins that are related to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium yoelii* adhesive proteins involved in host cell selection and invasion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, n. 17, p. 9648-9653, 2000.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; FUENTES-BROTO, L. Melatonin: a multitasking molecule. **Prog. Brain Res.**, v. 181, n., p. 127-151, 2010.

RINGWALD, P.; BICKII, J.; BASCO, L. K. *In vitro* activity of antimalarials against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in Yaounde, Cameroon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, n. 3, p. 254-258, 1996.

RO, D. K.; PARADISE, E. M.; OUELLET, M.; FISHER, K. J.; NEWMAN, K. L.; NDUNGU, J. M.; HO, K. A.; EACHUS, R. A.; HAM, T. S.; KIRBY, J.; CHANG, M. C.; WITHERS, S. T.; SHIBA, Y.; SARPONG, R.; KEASLING, J. D. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. **Nature**, v. 440, n. 7086, p. 940-943, 2006.

ROLAN, P. E.; MERCER, A. J.; WEATHERLEY, B. C.; HOLDICH, T.; MEIRE, H.; PECK, R. W.; RIDOUT, G.; POSNER, J. Examination of some factors responsible for a food-induced increase in absorption of atovaquone. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 37, n. 1, p. 13-20, 1994.

ROSENBERG, R.; WIRTZ, R. A.; SCHNEIDER, I.; BURGE, R. An estimation of the number of malaria sporozoites ejected by a feeding mosquito. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 84, n. 2, p. 209-212, 1990.

ROSENTHAL, P. J.; OLSON, J. E.; LEE, G. K.; PALMER, J. T.; KLAUS, J. L.; RASNICK, D. Antimalarial effects of vinyl sulfone cysteine proteinase inhibitors. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 40, n. 7, p. 1600-1603, 1996.

ROTTMANN, M.; MCNAMARA, C.; YEUNG, B. K.; LEE, M. C.; ZOU, B.; RUSSELL, B.; SEITZ, P.; PLOUFFE, D. M.; DHARIA, N. V.; TAN, J.; COHEN, S. B.; SPENCER, K. R.; GONZALEZ-PAEZ, G. E.; LAKSHMINARAYANA, S. B.; GOH, A.; SUWANARUSK, R.; JEGLA, T.; SCHMITT, E. K.; BECK, H. P.; BRUN, R.; NOSTEN, F.; RENIA, L.; DARTOIS, V.; KELLER, T. H.; FIDOCK, D. A.; WINZELER, E. A.; DIAGANA, T. T. Spiroindolones, a potent compound class for the treatment of malaria. **Science**, v. 329, n. 5996, p. 1175-1180, 2010.

RYE, H. S.; YUE, S.; WEMMER, D. E.; QUESADA, M. A.; HAUGLAND, R. P.; MATHIES, R. A.; GLAZER, A. N. Stable fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis-intercalating asymmetric cyanine dyes: properties and applications. **Nucleic Acids Res.**, v. 20, n. 11, p. 2803-2812, 1992.

SACHS, J.; MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 680-685, 2002.

SADANAND, S. Malaria: an evaluation of the current state of research on pathogenesis and antimalarial drugs. **Yale J. Biol. Med.**, v. 83, n. 4, p. 185-191, 2010.

SAITO-ITO, A.; AKAI, Y.; HE, S.; KIMURA, M.; KAWABATA, M. A rapid, simple and sensitive flow cytometric system for detection of *Plasmodium falciparum*. **Parasitol. Int.**, v. 50, n. 4, p. 249-257, 2001.

SCHLITZER, M. Malaria chemotherapeutics part I: History of antimalarial drug development, currently used therapeutics, and drugs in clinical development. **Chem. Med. Chem.**, v. 2, n. 7, p. 944-986, 2007.

SCHLITZER, M. Antimalarial drugs - what is in use and what is in the pipeline. **Arch. Pharm. (Weinheim)**, v. 341, n. 3, p. 149-163, 2008.

SCHUCK, D. C.; RIBEIRO, R. Y.; NERY, A.; HENNING, A. U.; GARCIA, C. R. D. S. Flow Cytometry as a tool for analyzing changes in *Plasmodium falciparum* cell cycle following treatment with indol compounds. **Cytometry Part A**, v., n., p., 2011.

SEGURADO, A. A.; DI SANTI, S. M.; SHIROMA, M. *In vivo* and *in vitro* *Plasmodium falciparum* resistance to chloroquine, amodiaquine and quinine in the Brazilian Amazon. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 39, n. 2, p. 85-90, 1997.

SHAPIRO, H. M.; MANDY, F. Cytometry in malaria: moving beyond Giemsa. **Cytometry A**, v. 71, n. 9, p. 643-645, 2007.

SHAPIRO, H. M.; ULRICH, H. Cytometry in malaria: from research tool to practical diagnostic approach? **Cytometry A**, v. 77, n. 6, p. 500-501, 2010.

SHARMA, A.; SANTOS, I.; GAUR, P.; FERREIRA, V.; GARCIA, C.; ROCHAB, D. Addition of thiols to o-quinone methide: New 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl [1,4]naphthoquinones and their activity against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* (3D7). **Eur. J. Med. Chem.**, v. 59, n., p. 48-53, 2013.

SHENAI, B. R.; SIJWALI, P. S.; SINGH, A.; ROSENTHAL, P. J. Characterization of native and recombinant falcipain-2, a principal trophozoite cysteine protease and essential hemoglobinase of *Plasmodium falciparum*. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 37, p. 29000-29010, 2000.

SHENAI, B. R.; LEE, B. J.; ALVAREZ-HERNANDEZ, A.; CHONG, P. Y.; EMAL, C. D.; NEITZ, R. J.; ROUSH, W. R.; ROSENTHAL, P. J. Structure-activity relationships for inhibition of cysteine protease activity and development of *Plasmodium falciparum* by peptidyl vinyl sulfones. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, n. 1, p. 154-160, 2003.

SHIBUI, A.; HOZUMI, N.; SHIRAISHI, C.; SATO, Y.; IIDA, H.; SUGANO, S.; WATANABE, J. CD4(+) T cell response in early erythrocytic stage malaria: *Plasmodium berghei* infection in BALB/c and C57BL/6 mice. **Parasitol Res.**, v. 105, n. 1, p. 281-286, 2009.

SIDHU, A. B.; VERDIER-PINARD, D.; FIDOCK, D. A. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by pfcrt mutations. **Science**, v. 298, n. 5591, p. 210-213, 2002.

SISOWATH, C.; STROMBERG, J.; MARTENSSON, A.; MSELLEM, M.; OBONDO, C.; BJORKMAN, A.; GIL, J. P. *In vivo* selection of *Plasmodium falciparum* pfmdr1 86N coding alleles by artemether-lumefantrine (Coartem). **J. Infect. Dis.**, v. 191, n. 6, p. 1014-1017, 2005.

SLATER, A. F.; SWIGGARD, W. J.; ORTON, B. R.; FLITTER, W. D.; GOLDBERG, D. E.; CERAMI, A.; HENDERSON, G. B. An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, n. 2, p. 325-329, 1991.

SLATER, A. F.; CERAMI, A. Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. **Nature**, v. 355, n. 6356, p. 167-169, 1992.

SLOMIANNY, C. Three-dimensional reconstruction of the feeding process of the malaria parasite. **Blood Cells**, v. 16, n. 2-3, p. 369-378, 1990.

SMILKSTEIN, M.; SRIWILAIJAROEN, N.; KELLY, J. X.; WILAIRAT, P.; RISCOE, M. Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 5, p. 1803-1806, 2004.

SMITH, T. G.; LOURENÇO, P.; CARTER, R.; WALLIKER, D.; RANFORD-CARTWRIGHT, L. C. Commitment to sexual differentiation in the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. **Parasitology**, v. 121 (Pt 2), n., p. 127-133, 2000.

SPADONI, G.; STANKOV, B.; DURANTI, A.; BIELLA, G.; LUCINI, V.; SALVATORI, A.; FRASCHINI, F. 2-Substituted 5-methoxy-N-acyltryptamines: synthesis, binding affinity for the melatonin receptor, and evaluation of the biological activity. **J. Med. Chem.**, v. 36, n. 25, p. 4069-4074, 1993.

SRINIVASAN, V.; SPENCE, D. W.; MOSCOVITCH, A.; PANDI-PERUMAL, S. R.; TRAKHT, I.; BROWN, G. M.; CARDINALI, D. P. Malaria: therapeutic implications of melatonin. **J. Pineal Res**, v. 48, n. 1, p. 1-8, 2010.

SRINIVASAN, V.; MOHAMED, M.; ZAKARIA, R.; AHMED, A. H. Malaria, Anti Malarial Drugs and the Role of Melatonin. **Infect. Disord. Drug Targets**, v., n., p., 2012.

SRIVASTAVA, I. K.; ROTTENBERG, H.; VAIDYA, A. B. Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 7, p. 3961-3966, 1997.

SRIVASTAVA, I. K.; MORRISEY, J. M.; DARROUZET, E.; DALDAL, F.; VAIDYA, A. B. Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome b in malaria parasites. **Mol. Microbiol.**, v. 33, n. 4, p. 704-711, 1999.

STURM, A.; AMINO, R.; VAN DE SAND, C.; REGEN, T.; RETZLAFF, S.; RENNENBERG, A.; KRUEGER, A.; POLLOK, J. M.; MENARD, R.; HEUSSLER, V. T. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, v. 313, n. 5791, p. 1287-1290, 2006.

SUEBSAENG, L.; WERNSDORFER, W. H.; ROONEY, W. Sensitivity to quinine and mefloquine of *Plasmodium falciparum* in Thailand. **Bull World Health Organ**, v. 64, n. 5, p. 759-765, 1986.

SUGDEN, D.; PICKERING, H.; TEH, M. T.; GARRATT, P. J. Melatonin receptor pharmacology: toward subtype specificity. **Biol. Cell**, v. 89, n. 8, p. 531-537, 1997.

SUGIOKA, Y.; SUZUKI, M.; SUGIOKA, K.; NAKANO, M. A ferriprotoporphyrin IX-chloroquine complex promotes membrane phospholipid peroxidation. A possible mechanism for antimalarial action. **FEBS Lett**, v. 223, n. 2, p. 251-254, 1987.

SUH, K. N.; KAIN, K. C.; KEYSTONE, J. S. Malaria. **CMAJ**, v. 170, n. 11, p. 1693-1702, 2004.

SULLIVAN, D. J., JR.; GLUZMAN, I. Y.; RUSSELL, D. G.; GOLDBERG, D. E. On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, n. 21, p. 11865-11870, 1996.

SULLIVAN, D. J., JR.; GLUZMAN, I. Y.; GOLDBERG, D. E. *Plasmodium* hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. **Science**, v. 271, n. 5246, p. 219-222, 1996.

SULLIVAN, D. J., JR.; MATILE, H.; RIDLEY, R. G.; GOLDBERG, D. E. A common mechanism for blockade of heme polymerization by antimalarial quinolines. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 47, p. 31103-31107, 1998.

SUPANARANOND, W.; DAVIS, T. M.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; SILAMUT, K.; KARBWANG, J.; MOLUNTO, P.; CHANOND, L.; WHITE, N. J. Disposition of oral quinine in acute *falciparum* malaria. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 40, n. 1, p. 49-52, 1991.

SUPEK, F.; RAMLJAK, T. S.; MARJANOVIC, M.; BULJUBASIC, M.; KRAGOL, G.; ILIC, N.; SMUC, T.; ZAHRADKA, D.; MLINARIC-MAJERSKI, K.; KRALJ, M. Could LogP be a principal determinant of biological activity in 18-crown-6 ethers? Synthesis of biologically active adamantane-substituted diaza-crowns. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 46, n. 8, p. 3444-3454, 2011.

SUROLIA, I. Chloroquine binds in the cofactor binding site of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase--a response. **Parasitol. Today**, v. 16, n. 3, p. 133, 2000.

SUROLIA, N.; PADMANABAN, G. Chloroquine inhibits heme-dependent protein synthesis in *Plasmodium falciparum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, n. 11, p. 4786-4790, 1991.

TAN, D.; MANCHESTER, L. C.; REITER, R. J.; QI, W.; HANES, M. A.; FARLEY, N. J. High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. **Life Sci.**, v. 65, n. 23, p. 2523-2529, 1999.

TARGETT, G. Malaria elimination: how far can we go without a vaccine? **Clin. Med.**, v. 11, n. 5, p. 422-423, 2011.

TARUN, A. S.; BAER, K.; DUMPIT, R. F.; GRAY, S.; LEJARCEGUI, N.; FREVERT, U.; KAPPE, S. H. Quantitative isolation and *in vivo* imaging of malaria parasite liver stages. **Int. J. Parasitol.**, v. 36, n. 12, p. 1283-1293, 2006.

TAYLOR, H. M.; GRAINGER, M.; HOLDER, A. A. Variation in the expression of a *Plasmodium falciparum* protein family implicated in erythrocyte invasion. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 10, p. 5779-5789, 2002.

TAYLOR, W. R.; WHITE, N. J. Antimalarial drug toxicity: a review. **Drug Saf.**, v. 27, n. 1, p. 25-61, 2004.

TEJA-ISAVADHARM, P.; SIRIYANONDA, D.; SIRIPOKASUPKUL, R.; APINAN, R.; CHANARAT, N.; LIM, A.; WANNAYING, S.; SAUNDERS, D.; FUKUDA, M. M.; MILLER, R. S.; WEINA, P. J.; MELENDEZ, V. A simplified liquid chromatography-mass spectrometry assay for artesunate and dihydroartemisinin, its metabolite, in human plasma. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8747-8768, 2010.

THERON, M.; HESKETH, R. L.; SUBRAMANIAN, S.; RAYNER, J. C. An adaptable two-color flow cytometric assay to quantitate the invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum* parasites. **Cytometry A**, v. 77, n. 11, p. 1067-1074, 2010.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, n. 4254, p. 673-675, 1976.

TRAGER, W.; JENSEN, J. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, n. 4254, p. 673-675, 1976.

UDOMSANGPETCH, R.; KANEKO, O.; CHOTIVANICH, K.; SATTABONGKOT, J. Cultivation of *Plasmodium vivax*. **Trends Parasitol.**, v. 24, n. 2, p. 85-88, 2008.

VALE, N.; MOREIRA, R.; GOMES, P. Primaquine revisited six decades after its discovery. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 44, n. 3, p. 937-953, 2009.

VALECHA, N.; PHYO, A. P.; MAYXAY, M.; NEWTON, P. N.; KRUDSOOD, S.; KEOMANY, S.; KHANTHAVONG, M.; PONGVONGSA, T.; RUANGVEERAYUTH, R.; UTHAISIL, C.; UBBEN, D.; DUPARC, S.; BACCHIERI, A.; CORSI, M.; RAO, B. H.; BHATTACHARYA, P. C.; DUBHASHI, N.; GHOSH, S. K.; DEV, V.; KUMAR, A.; PUKRITTAYAKAMEE, S. An open-label, randomised study of dihydroartemisinin-piperaquine versus artesunate-mefloquine for *falciparum* malaria in Asia. **PLoS One**, v. 5, n. 7, p. e11880, 2010.

VAN DE WATERBEEMD, H.; SMITH, D. A.; JONES, B. C. Lipophilicity in PK design: methyl, ethyl, futile. **J. Comput. Aided Mol. Des.**, v. 15, n. 3, p. 273-286, 2001.

VAN DER HEYDE, H. C.; ELLOSO, M. M.; VANDE WAA, J.; SCHELL, K.; WEIDANZ, W. P. Use of hydroethidine and flow cytometry to assess the effects of leukocytes on the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 2, n. 4, p. 417-425, 1995.

VAN ESSEVELDT, K. E.; LEHMAN, M. N.; BOER, G. J. The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. **Brain Res. Brain Res. Rev.**, v. 33, n. 1, p. 34-77, 2000.

VAN PELT-KOOPS, J. C.; PETT, H. E.; GRAUMANS, W.; VAN DER VEGTE-BOLMER, M.; VAN GEMERT, G. J.; ROTTMANN, M.; YEUNG, B. K.; DIAGANA, T. T.; SAUERWEIN, R. W. The spiroindolone drug candidate NITD609 potently inhibits gametocytogenesis and blocks *Plasmodium falciparum* transmission to anopheles mosquito vector. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 56, n. 7, p. 3544-3548, 2012.

VASCONCELOS, K. F.; PLOWE, C. V.; FONTES, C. J.; KYLE, D.; WIRTH, D. F.; PEREIRA DA SILVA, L. H.; ZALIS, M. G. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of isolates from the Amazon region of Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, p. 721-728, 2000.

VENNERSTROM, J. L.; ELLIS, W. Y.; AGER, A. L., JR.; ANDERSEN, S. L.; GERENA, L.; MILHOUS, W. K. Bisquinolines. 1. N,N-bis(7-chloroquinolin-4-yl)alkanediamines with potential against chloroquine-resistant malaria. **J. Med. Chem.**, v. 35, n. 11, p. 2129-2134, 1992.

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. **Trop. Med. Int. Health**, v. 11, n. 2, p. 211-219, 2006.

VUGT, M. V.; WILAIRATANA, P.; GEMPERLI, B.; GATHMANN, I.; PHAIPUN, L.; BROCKMAN, A.; LUXEMBURGER, C.; WHITE, N. J.; NOSTEN, F.; LOOAREESUWAN, S. Efficacy of six doses of artemether-lumefantrine (benflumetol) in multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 60, n. 6, p. 936-942, 1999.

WARHURST, D. C.; CRAIG, J. C.; ADAGU, I. S.; GUY, R. K.; MADRID, P. B.; FIVELMAN, Q. L. Activity of piperaquine and other 4-aminoquinoline antiparasmodial drugs against chloroquine-sensitive and resistant blood-stages of *Plasmodium falciparum*. Role of beta-haematin inhibition and drug concentration in vacuolar water- and lipid-phases. **Biochem. Pharmacol.**, v. 73, n. 12, p. 1910-1926, 2007.

WEBSTER, H. K.; BOUDREAU, E. F.; PAVANAND, K.; YONGVANITCHIT, K.; PANG, L. W. Antimalarial drug susceptibility testing of *Plasmodium falciparum* in Thailand using a microdilution radioisotope method. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 34, n. 2, p. 228-235, 1985.

WELLS, T. N.; ALONSO, P. L.; GUTTERIDGE, W. E. New medicines to improve control and contribute to the eradication of malaria. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, v. 8, n. 11, p. 879-891, 2009.

WHITE, J. H.; KILBEY, B. J. DNA replication in the malaria parasite. **Parasitol. Today**, v. 12, n. 4, p. 151-155, 1996.

WHITE, N. J. The role of anti-malarial drugs in eliminating malaria. **Malar. J.**, v. 7 Suppl 1, n., p. S8, 2008.

WONGSRICHANALAI, C.; WEBSTER, H. K.; WIMONWATTRAWATEE, T.; SOOKTO, P.; CHUANAK, N.; THIMASARN, K.; WERNSDORFER, W. H. Emergence of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* in Thailand: *in vitro* tracking. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 47, n. 1, p. 112-116, 1992.

WOODARD, C. L.; LI, Z.; KATHCART, A. K.; TERRELL, J.; GERENA, L.; LOPEZ-SANCHEZ, M.; KYLE, D. E.; BHATTACHARJEE, A. K.; NICHOLS, D. A.; ELLIS, W.; PRIGGE, S. T.; GEYER, J. A.; WATERS, N. C. Oxindole-based compounds are selective inhibitors of *Plasmodium falciparum* cyclin dependent protein kinases. **J. Med. Chem.**, v. 46, n. 18, p. 3877-3882, 2003.

WYATT, C. R.; GOFF, W.; DAVIS, W. C. A flow cytometric method for assessing viability of intraerythrocytic hemoparasites. **J. Immunol. Methods**, v. 140, n. 1, p. 23-30, 1991.

YANEZ, D. M.; MANNING, D. D.; COOLEY, A. J.; WEIDANZ, W. P.; VAN DER HEYDE, H. C. Participation of lymphocyte subpopulations in the pathogenesis of experimental murine cerebral malaria. **J. Immunol.**, v. 157, n. 4, p. 1620-1624, 1996.

YARMOLUK, S.; KOVALSKA, V.; LOSYTSKY, M. Symmetric cyanine dyes for detecting nucleic acids. **Biotech. Histochem.**, v. 83, n. 3, p. 131-145, 2008.

YATIME, L.; BUCH-PEDERSEN, M. J.; MUSGAARD, M.; MORTH, J. P.; LUND WINTHER, A. M.; PEDERSEN, B. P.; OLESEN, C.; ANDERSEN, J. P.; VILSEN, B.; SCHIOTT, B.; PALMGREN, M. G.; MOLLER, J. V.; NISSEN, P.; FEDOSOVA, N. P-type ATPases as drug targets: tools for medicine and science. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1787, n. 4, p. 207-220, 2009.

YEKA, A.; ACHAN, J.; D'ALESSANDRO, U.; TALISUNA, A. O. Quinine monotherapy for treating uncomplicated malaria in the era of artemisinin-based combination therapy: an appropriate public health policy? **Lancet Infect. Dis.**, v. 9, n. 7, p. 448-452, 2009.

YOUS, S.; ANDRIEUX, J.; HOWELL, H. E.; MORGAN, P. J.; RENARD, P.; PFEIFFER, B.; LESIEUR, D.; GUARDIOLA-LEMAITRE, B. Novel naphthalenic ligands with high affinity for the melatonin receptor. **J. Med. Chem.**, v. 35, n. 8, p. 1484-1486, 1992.

ZALIS, M. G.; PANG, L.; SILVEIRA, M. S.; MILHOUS, W. K.; WIRTH, D. F. Characterization of *Plasmodium falciparum* isolated from the Amazon region of Brazil: evidence for quinine resistance. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, n. 5, p. 630-637, 1998.

ZHANG, J.; KRUGLIAK, M.; GINSBURG, H. The fate of ferriprotophyrin IX in malaria infected erythrocytes in conjunction with the mode of action of antimalarial drugs. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 99, n. 1, p. 129-141, 1999.

ZHANG, Y.; MESHNICK, S. R. Inhibition of *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthetase and growth *in vitro* by sulfa drugs. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 35, n. 2, p. 267-271, 1991.

ZHU, J.; CHEN, T.; CHEN, L.; LU, W.; CHE, P.; HUANG, J.; LI, H.; LI, J.; JIANG, H. 2-amido-3-(1H-indol-3-yl)-N-substituted-propanamides as a new class of falcipain-2 inhibitors. 1. Design, synthesis, biological evaluation and binding model studies. **Molecules**, v. 14, n. 1, p. 494-508, 2009.

APÊNDICES

Apêndice A- Flow Cytometry as a Tool for Analyzing Changes in *Plasmodium falciparum* Cell Cycle Following Treatment with Indol Compounds. Cytometry Part A, v.79A, p. 959-965, 2011.

Flow Cytometry as a Tool for Analyzing Changes in *Plasmodium falciparum* Cell Cycle Following Treatment with Indol Compounds

Desirée Cigaran Schuck,^{1,2} Ramira Yuri Ribeiro,^{1,2} Arthur A. Nery,³
Henning Ulrich,³ Célia R. S. Garcia^{1,2*}

¹Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

²Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-90, Brazil

³Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-900, Brazil

Received 19 April 2011; Revision Received 28 July 2011; Accepted 4 August 2011

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: FAPESP; Grant number: 07/52924-0; Grant sponsors: Malaria Pro-nex, INCT-INBqMed and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); CAPES

* Correspondence to: Celia R. S. Garcia, Rua do Matao 101, Travessa 14, São Paulo, SP, 05508-900, Brazil

Email: cgarcia@usp.br

Published online 30 August 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

DOI: 10.1002/cyto.a.21136

© 2011 International Society for Advancement of Cytometry

• Abstract

Melatonin and its derivatives modulate the *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium chabaudi* cell cycle. Flow cytometry was employed together with the nucleic acid dye YOYO-1 allowing precise discrimination between mono- and multinucleated forms of *P. falciparum*-infected red blood cell. The use of YOYO-1 permitted excellent discrimination between uninfected and infected red blood cells as well as between early and late parasite stages. Fluorescence intensities of schizont-stage parasites were about 10-fold greater than those of ring-trophozoite form parasites. Melatonin and related indolic compounds including serotonin, N-acetyl-serotonin and tryptamine induced an increase in the percentage of multinucleated forms compared to non-treated control cultures. YOYO-1 staining of infected erythrocyte and subsequent flow cytometry analysis provides a powerful tool in malaria research for screening of bioactive compounds. © 2011 International Society for Advancement of Cytometry

• Key terms

Plasmodium falciparum; melatonin; cell cycle; flow cytometry

MALARIA is caused by the Apicomplexan parasite *Plasmodium falciparum*. Its asexual replicative cycle inside red blood cell (RBC) is responsible for pathogenesis and induces several structural and biochemical changes within the host cell (1,2). One striking feature regarding *P. falciparum* infection is associated with 48-h fever peaks intervals, as a result of from synchronous release of merozoites into the blood stream (3).

Melatonin, a hormone produced by the pineal gland of vertebrates, transmit the darkness signal based on circadian and seasonal time measurements (4). The presence of melatonin, however, is not restricted to vertebrates but is also found in phylogenetically divergent species including bacteria, plants and protozoa (4). We have previously shown that this hormone is able to synchronize *Plasmodium falciparum* and *P. chabaudi* cell infections (5–7). The synchronicity was lost in vitro when parasites had been incubated with the melatonin antagonist luzindole; the same effect was obtained in vivo in pinealectomized mice and after the injection of luzindole (5). In *P. falciparum*, melatonin induces a complex signaling pathway with the participation of IP3 generation (8) and subsequent transients in cytosolic calcium concentration, cAMP production and protein kinase A (PKA) (9,10) and protease activation (11).

Flow cytometry (FCM) is a powerful method for evaluation of human erythrocyte infection rates as well as for discrimination of *Plasmodium falciparum* developmental stages (12–16). Several methods of detection of malaria parasite by flow cytometry have been developed taking advantage of the absence of DNA in erythrocytes. Different dyes such as acridine orange (17,18), hydroethidine (19,20), SYTO 16 (21) and thiazole orange (22) were already employed for the determination of parasitemia

BRIEF REPORT

in cultures of *P. falciparum* by FCM. Some previous studies using YOYO-1 showed that this dye possesses high affinity for DNA and discriminates infected RBC from the uninfected cells in a very effective way (14,23,24). Melatonin and derivatives mediating effects on the cell cycle of *P. falciparum*-infected human erythrocytes were studied using YOYO-1 staining followed by flow cytometry analysis. Our method is suitable to follow changes in the *Plasmodium falciparum* cell cycle in the presence of melatonin and its derivatives.

MATERIALS AND METHODS

In Vitro Culture of *Plasmodium falciparum* (3D7)

Parasites were cultured and synchronized as described previously (25). Briefly, parasites were routinely maintained in A⁺ human erythrocytes (5% parasitemia and 2% hematocrit) in RPMI-1640 media supplemented with 0.21% sodium bicarbonate, 50 mg L⁻¹ hypoxanthine and 10% of human serum O⁺ in 92% N₂, 5% CO₂, and 3% O₂.

Flow Cytometry Analysis

Infected erythrocytes with parasitemia between 3 and 7% and hematocrit of 2% were incubated with 0.1 μ M or 1 μ M of melatonin, 0.1 μ M or 1 μ M *N*-acetyl-serotonin (NAS), 0.25 μ M or 1 μ M serotonin and 0.5 μ M or 1 μ M tryptamine for 24 h. Parasites then were fixed in 2% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 24 h at room temperature and permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) and 20 μ g mL⁻¹ RNase (Invitrogen Life Technologies), incubated for 15 minutes at 37°C and stained with 5 nM YOYO-1 (Molecular Probes) in agreement with previous published methods (14). Parasitemia and proportions of parasites at each stage were determined from dot plots [side scatter (SSC) versus fluorescence] of 10⁵ cells acquired on a FACS Calibur flow cytometer using CELLQUEST software (Becton & Dickinson). YOYO-1 was excited with a 488 nm Argon laser and fluorescence emission was collected at 520–530 nm. Parameters subject to adjustment of the FACS Calibur flow cytometer were forward scatter (FSC) (log scale, E-1), SSC (log scale, 269), FL-1 (log scale, 530), and compensation parameters were FL1-0.8% FL2 and FL1- 23.6% FL2. Initial gating was carried out with unstained, uninfected erythrocytes to account for erythrocyte autofluorescence. Stages of parasites were standardized with synchronized cultures. Gating strategies are detailed in the supplementary Figure 1 at MIFlowCyt.

Statistical Analysis

Parasitemia analysis and proportion of developmental stages were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) test followed by post hoc analysis by the Dunnett's Multiple Comparison Test and Newman Keuls using the GraphPad Prism (GraphPad Software). *P* values < 0.05 were considered as significant. At least three independent experiments were performed for each experimental condition.

RESULTS AND DISCUSSION

We have used the asymmetric cyanine nucleic acid dye (YOYO-1) to discriminate between uninfected and infected

erythrocytes at early stages (mononucleated) as well as later stages (multinucleated) of *P. falciparum* parasites. Asymmetric dyes have been used in the past years because their spectral properties: they have high extinction coefficients in the visible spectral region, low intrinsic fluorescence intensity and largely enhanced fluorescence upon binding to nucleic acid (26). Figure 1 represents data with a once synchronized population for 48 h (A and B). *P. falciparum* has different stages of development, known as ring, trophozoite and schizont stages. Ring and trophozoite until 26–28 h of development are considered the mononucleated stage and the trophozoite form after 26–28 h and schizont the multinucleated forms (27). A culture once synchronized was used as controls to determine the populations as are illustrated in Figure 1. A comparison between microscopic analysis following Giemsa staining and FCM shows a very similar distribution (Fig. 1D). Parasitemia percentages obtained by microscopic and flow cytometry analysis were, respectively, at six different time points (2, 8, 20, 27, 34, and 48 h): 3.97/3.76; 3.91/3.92; 4.37/4.35; 4.48/4.28; 5.42/5.59, and 14.94/14.60 (microscopy/FCM in %). Percentages of distribution of mono- and multinucleated stages in these two methodologies were, respectively: 3.90/3.68; 1.52/1.57; 1.40/1.41; 1.71/1.61; 3.50/3.41, and 14.45/13.90 (mononucleated) and 0.07/0.08; 2.40/2.35; 2.97/2.94; 2.78/2.67; 1.93/2.18; 0.50/0.66 (multinucleated). As previously described in several published studies (14,23,24), YOYO-1 presented an excellent discrimination between uninfected and infected RBCs and was able to discriminate between mononucleated and multinucleated stages with high resolution. The fluorescence intensities of multinucleated-stage parasites (Fig. 1) were about 10-fold higher than those of mononucleated form parasites (19). The developmental stage of the parasite can therefore be determined from the fluorescence intensity as shown in Figure 1.

Melatonin and other tryptophan derivatives such as serotonin, *N*-acetyl-serotonin and tryptamine induce increases in cytosolic Ca²⁺ concentration and promote synchronization of intraerythrocytic cycle of the malaria parasites (7). Figure 2 presents the distribution of YOYO-1 fluorescence (log scale, arbitrary units) after 24-h incubation of wild-type 3D7 culture with the following indolic compounds: (A) melatonin (0.1 or 1 μ M), (B) serotonin (0.25 or 1 μ M), (C) *N*-acetyl-serotonin (0.1 or 1 μ M) and (D) tryptamine (0.5 or 1 μ M). After treatment and staining with YOYO-1, the various developmental stages of the parasite (mono- and multinucleated forms) were analyzed and quantified by FCM. Comparison of “untreated control” histograms (in black) with those histograms (in gray) that represent the distribution of different parasite forms after indol-compound treatment demonstrates the effects of the compounds on the parasite cycle. The data shown in Figure 2 were plotted in Figure 3 as mean values $\pm$ S.E. of the normalized representation of each form to the solvent control (for details refer to MIFlowCyt). 3D7 parasites treated with 100 nM melatonin show a statistically significant (*P* < 0.01) 26.53% decrease in the percentage of mononucleated forms and a statistically significant (*P* < 0.001) 30.2% increase of multinucleated forms relative to control (untreated) cultures (Fig. 3A). Melatonin (1 μ M) induced a reduction of 24.24%

BRIEF REPORT

Figure 1. Assessment of erythrocyte infection and parasite stages by flow cytometry and Giemsa staining. (A) Dot Plot of SSC-y/FL1-H of a once synchronized culture, time represents hours after synchronization. (B) Histograms of a culture follow in time after one step synchronization. Gates presented here were used to define the mono- and multinucleated populations of the parasite. (C) Typical parasite forms found in the respective cultures. (D) Comparison of FCM analysis and microscopy counting of Giemsa staining populations. Dark grey—microscopy; light grey—the detector of YOYO-1 measure at wavelength of 530 nm. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

BRIEF REPORT

Figure 2. Modulation of the intraerythrocytic cycle of *P. falciparum* 3D7 by indolic compounds evaluated by flow cytometry. The parasite culture was stimulated with (A) melatonin (0.1 or 1 μ M) or (B) serotonin (0.25 or 1 μ M) (C) *N*-acetyl-serotonin (NAS) (0.1 or 1 μ M) and (D) tryptamine (0.5 or 1 μ M). After 24 h, life cycle stages of the parasites were determined by flow cytometry analysis of infected red blood cells stained with YOYO-1 (mono- and multinucleated forms). FL1-H was used to detect YOYO-1 fluorescence emission at a wavelength of 530 nm. Overlaid histograms in black represent the control data; histograms in gray represent the data obtained in the presence of the respective indol compound.

Figure 3. Effects of melatonin, *N*-acetyl-serotonin (NAS), serotonin and tryptamine on the asynchronous culture of *P. falciparum* 3D7 strain. **A**—In *Plasmodium falciparum* 3D7 increases in the number of multinucleated forms and decreases in the number of mononucleated forms were observed after incubation for 24 h with indolic compounds. **B**—Parasitemia after 24 h of incubation. These treatments did not induce any alterations in erythrocytes parasitemia. Statistical analysis was done by using one-way ANOVA and Newman–Keuls tests. Statistical significance is reported with respect to control values, * $P < 0.05$.

($P < 0.01$) in the number of mononucleated forms and an increase of 20.1% ($P < 0.01$) in the number of multinucleated forms. Similar experiments were performed using the melatonin precursors *N*-acetyl-serotonin (NAS) (0.1 and 1 μ M), serotonin (0.25 and 1 μ M) and tryptamine (0.50 and 1 μ M). NAS (0.1 and 1 μ M) induced an increase of 25.4% ($P < 0.01$) and 20.8% ($P < 0.05$) in the number of multinucleated forms and a decrease of 19.07% ($P < 0.01$) and 19.46% ($P < 0.05$) in the number of mononucleated forms, all statistically significant, respectively. Serotonin (0.25 and 1 μ M) promoted a statistically significant decrease in the number of mononucleated forms of 21.72% ($P < 0.01$) and 16.21% ($P < 0.01$) and an increase of 25.1% ($P < 0.05$) and 20% ($P < 0.05$) in the number of multinucleated forms, respectively. Tryptamine at 0.5 and 1 μ M concentrations promoted statistically significant decreases in the number of mononucleated forms of 21.53% ($P < 0.01$) and 19.28% ($P < 0.01$) and increase in the number of multinucleated forms of 20% ($P < 0.01$) and 20.2% ($P < 0.01$), respectively. The results shows that indol derivatives induced similar increases in the number of schizonts forms and decreases in the number of parasites in ring stage when compared to previous melatonin treatment (0.1 and 1 μ M) (Fig. 3A). Overall parasitemia following 24 h of treatment with indolic compounds shows no statistically significant difference, and was determined as number of parasites per 100

RBCs in *P. falciparum* culture (Fig. 3B) and normalized to solvent control (supplementary Table 1 at MICyFlow).

Malaria parasites respond to external stimuli to adapt its life within host cells (28,29). Our group had previously reported that melatonin acts in the cell cycle of the human *P. falciparum* and the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi*, synchronizing the parasites' developmental cycle during erythrocytic schizogony (5). The present data demonstrates that the presence of various concentrations of melatonin, serotonin, *N*-acetyl-serotonin (NAS) and tryptamine led to an increase in the percentage of multinucleated schizont forms of parasites, favoring synchronization of intraerythrocytic cycle of *P. falciparum*. As to the molecular mechanism of melatonin action, the hormone and its precursors *N*-acetylserotonin, tryptamine, serotonin and *N*(1)-acetyl-*N*(2)-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) were able to induce intracellular Ca^{2+} transients in *P. falciparum* and *P. chabaudi* and these responses were blocked by PLC inhibition and luzindole (9,30,31). Such effects were not observed in *P. berghei* and *P. yoelii*, rodent parasites with asynchronous development of intraerythrocytic stages in vivo. Melatonin did not modulate their cell cycle nor elicited elevations in cytosolic Ca^{2+} concentration (32,33).

In summary, here we reported a simple procedure that allows a fast and precise assessment of *Plasmodium* parasitemia and determination of parasite stage of development upon melatonin and its derivatives treatment. Importantly, this procedure opens new avenues for exploration of the real potential of flow cytometry in malaria research for screening of bioactive compounds contributing to the understanding of different signaling pathways in RBCs infected with the lethal human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*.

LITERATURE CITED

- Garcia CR, Takeuchi M, Yoshioka K, Miyamoto H. Imaging *Plasmodium falciparum*-infected ghost and parasite by atomic force microscopy. *J Struct Biol* 1997;119:92–98.
- Maier AG, Cooke BM, Cowman AE, Tilley L. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:341–354.
- Garcia CR, Markus RP, Madeira L. Tertian and quartan fevers: Temporal regulation in malarial infection. *J Biol Rhythms* 2001;16:436–443.
- Reiter RJ, Tan DX, Fuentes-Broto L. Melatonin: A multitasking molecule. *Prog Brain Res* 2010;181:127–151.
- Hotta CT, Gazarini ML, Beraldo FH, Varotti FP, Lopes C, Markus RP, Pozzan T, Garcia CR. Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites. *Nat Cell Biol* 2000;2:466–468.
- Gazarini ML, Garcia CR. The malaria parasite mitochondrion senses cytosolic Ca^{2+} fluctuations. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321:138–144.
- Beraldo FH, Garcia CR. Products of tryptophan catabolism induce Ca^{2+} release and modulate the cell cycle of *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *J Pineal Res* 2005;39:224–230.
- Alves E, Barlett PJ, Garcia CRS, Thomas A. Melatonin and IP3-induced Ca^{2+} release from intracellular stores in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* within infected red blood cells. *J Biol Chem* 2011;13:1–11.
- Beraldo FH, Almeida FM, da Silva AM, Garcia CR. Cyclic AMP and calcium interplay as second messengers in melatonin-dependent regulation of *Plasmodium falciparum* cell cycle. *J Cell Biol* 2005;170:551–557.
- Gazarini ML, Beraldo FH, Almeida FM, Bootman M, Da Silva AM, Garcia CR. Melatonin triggers PKA activation in the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. *J Pineal Res* 2011;50:64–70.
- Farias SL, Gazarini ML, Melo RL, Hirata IY, Juliano MA, Juliano L, Garcia CR. Cysteine-protease activity elicited by Ca^{2+} stimulus in *Plasmodium*. *Mol Biochem Parasitol* 2005;141:71–79.
- Grimberg BT, Jaworska MM, Hough LB, Zimmerman PA, Phillips JG. Addressing the malaria drug resistance challenge using flow cytometry to discover new antimalarials. *Bioorg Med Chem Lett* 2009;19:5452–5457.
- Theron M, Hesketh RL, Subramanian S, Rayner JC. An adaptable two-color flow cytometric assay to quantitate the invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum* parasites. *Cytometry A* 2010;77A:1067–1074.

BRIEF REPORT

14. Li Q, Gerena L, Xie L, Zhang J, Kyle D, Milhous W. Development and validation of flow cytometric measurement for parasitemia in cultures of *P. falciparum* vitally stained with YOYO-1. *Cytometry A* 2007;71A:297–307.
15. Shapiro HM, Ulrich H. Cytometry in malaria: From research tool to practical diagnostic approach? *Cytometry A* 2010;77A:500–501.
16. Shapiro HM, Mandy F. Cytometry in malaria: Moving beyond Giemsa. *Cytometry A* 2007;71A:643–645.
17. Saito-Ito A, Akai Y, He S, Kimura M, Kawabata M. A rapid, simple and sensitive flow cytometric system for detection of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Int* 2001;50: 249–257.
18. Bhakdi SC, Sratongno P, Chimma P, Rungruang T, Chuncharunee A, Neumann HP, Malasit P, Pattanapanyasat K. Re-evaluating acridine orange for rapid flow cytometric enumeration of parasitemia in malaria-infected rodents. *Cytometry A* 2007;71A:662–667.
19. van der Heyde HC, Elloso MM, vande Waa J, Schell K, Weidanz WP. Use of hydroethidine and flow cytometry to assess the effects of leukocytes on the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995;2:417–425.
20. Chevalley S, Coste A, Lopez A, Pipy B, Valentin A. Flow cytometry for the evaluation of anti-plasmodial activity of drugs on *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Malar J* 2010;9:49.
21. Fu Y, Tilley L, Kenny S, Klonis N. Dual labeling with a far red probe permits analysis of growth and oxidative stress in *P. falciparum*-infected erythrocytes. *Cytometry A* 2010;77A:253–263.
22. Jouin H, Daher W, Khalife J, Ricard I, Puijalon OM, Capron M, Dive D. Double staining of *Plasmodium falciparum* nucleic acids with hydroethidine and thiazole orange for cell cycle stage analysis by flow cytometry. *Cytometry A* 2004;57A:34–38.
23. Barkan D, Ginsburg H, Golenser J. Optimization of flow cytometric measurement of parasitaemia in plasmodium-infected mice. *Int J Parasitol* 2000;30:649–653.
24. Campo JJ, Aponte JJ, Nhabomba AJ, Sacarlal J, Angulo-Barturen I, Jimenez-Diaz MB, Alonso PL, Dobano C. Feasibility of flow cytometry for measurements of *Plasmodium falciparum* parasite burden in studies in areas of malaria endemicity by use of bidimensional assessment of YOYO-1 and autofluorescence. *J Clin Microbiol* 2011; 49:968–974.
25. Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* 1979;65:418–420.
26. Yarmoluk S, Kovalska V, Losytskyy M. Symmetric cyanine dyes for detecting nucleic acids. *Biotech Histochem* 2008;83:131–145.
27. Arnot DE, Ronander E, Bengtsson DC. The progression of the intra-erythrocytic cell cycle of *Plasmodium falciparum* and the role of the centriolar plaques in asynchronous mitotic division during schizogony. *Int J Parasitol* 2011;41:71–80.
28. Garcia CR, de Azevedo MF, Wunderlich G, Budu A, Young JA, Bannister L. Plasmodium in the postgenomic era: New insights into the molecular cell biology of malaria parasites. *Int Rev Cell Mol Biol* 2008;266:85–156.
29. Levano-Garcia J, Dluzewski AR, Markus RP, Garcia CR. Purinergic signaling is involved in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* invasion to red blood cells. *Purinergic Signal* 2010;6:365–372.
30. Beraldo FH, Mikoshiba K, Garcia CR. Human malarial parasite, *Plasmodium falciparum*, displays capacitative calcium entry: 2-aminoethyl diphenylborinate blocks the signal transduction pathway of melatonin action on the *P. falciparum* cell cycle. *J Pineal Res* 2007;43:360–364.
31. Budu A, Peres R, Bueno VB, Catalani LH, Garcia CR. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxytryptamine modulates the cell cycle of malaria parasites. *J Pineal Res* 2007;42: 261–266.
32. Bagnaresi P, Alves E, da Silva HB, Epiphanyo S, Mota MM, Garcia CR. Unlike the synchronous *Plasmodium falciparum* and *P. chabaudi* infection, the *P. berghei* and *P. yoelii* asynchronous infections are not affected by melatonin. *Int J Gen Med* 2009;2:47–55.
33. Srinivasan V, Spence DW, Moscovitch A, Pandi-Perumal SR, Trakht I, Brown GM, Cardinali DP. Malaria: Therapeutic implications of melatonin. *J Pineal Res* 2010;48: 1–8.