UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

GUILHERME EDUARDO DE SOUZA

Descoberta de derivados de hidrazinobenzimidazol como inibidores de
Plasmodium falciparum: *Síntese orgânica, atividade biológica e relação estrutura-
atividade*

São Carlos

2017

GUILHERME EDUARDO DE SOUZA

Descoberta de derivados de hidrazinobenzimidazol como inibidores de
Plasmodium falciparum: *Síntese orgânica, atividade biológica e relação estrutura-
atividade*

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física do Instituto de
Física de São Carlos da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Rafael Victorio
Carvalho Guido
Co-orientadora: Dra. Anna Carolina
Campos Aguiar

Versão Original

São Carlos
2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Souza, Guilherme Eduardo de

Descoberta de derivados de hidrazinobenzimidazol como inibidores de *Plasmodium falciparum*: Síntese orgânica, atividade biológica e relação estrutura-atividade / Guilherme Eduardo de Souza; orientador Rafael Victorio Carvalho Guido; co-orientadora Anna Carolina Campos Aguiar -- São Carlos, 2017.

101 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2017.

1. Malária. 2. Inibidor. 3. Planejamento de fármacos. I. Guido, Rafael Victorio Carvalho, orient. II. Aguiar, Anna Carolina Campos, co-orient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Guilherme Eduardo de Souza

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Física Aplicada - Opção: Física Biomolecular.

Aprovado(a) em: 22/02/2018

Comissão Julgadora

Dr(a). Rafael Victório Carvalho Guido

Instituição: (IFSC/USP)

Dr(a). Arlene Gonçalves Correa

Instituição: (UFSCar/São Carlos)

Dr(a). Celia Regina da Silva Garcia

Instituição: (IB/USP)

AGRADECIMENTOS

À minha avó, Maria Eloisa Terra, que despertou minha curiosidade e vontade de aprender.

À minha co-orientadora, Anna Carolina Campos Aguiar, que me conduziu neste processo de amadurecimento científico.

Aos meus amigos de laboratório, pelo companheirismo, força e apoio em todos os momentos.

Ao Laboratório de Síntese de Substâncias Orgânicas, em especial ao doutorando Eric Francisco Simão e ao Prof. Dr. Carlos Roque Duarte Correia, pela colaboração na síntese dos compostos testados.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Victorio Carvalho Guido, pela atenção e apoio durante o processo de definição e orientação.

Ao Instituto de Física de São Carlos, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À CNPq (processo nº 130582/2016-6), pelo auxílio financeiro para desenvolver os três primeiros meses deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo nº 2016/09772-4), pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

*“Nadar pra quê, se não for pra poder lembrar no fim
de quanta beleza há no movimento das águas por onde se passa?
O caminho certo é aquele pelo qual você passa e não quer que passe logo.”*

Graziele Vasconcelos

RESUMO

SOUZA, G. E. **Descoberta de derivados de hidrazinobenzimidazol como inibidores de *Plasmodium falciparum*: Síntese orgânica, atividade biológica e relação estrutura-atividade**. 2017. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

A malária é a doença tropical com maior taxa de mortalidade global. O surgimento de resistência às terapias de primeira linha reforça a necessidade do desenvolvimento de novos candidatos a fármacos. O objetivo deste trabalho foi a descoberta de inibidores e otimização da atividade destas moléculas como candidatos a compostos líderes para o desenvolvimento de novos agentes antimaláricos. Nesse sentido, realizamos a triagem da coleção *Malaria Box* e identificamos 11 moléculas de diferentes classes químicas como candidatos a inibidores da enzima enolase de *Plasmodium falciparum* (Pfen). Em seguida, determinamos a potência inibitória contra a enzima alvo (IC_{50} entre 11 – >1.000 μM), atividade antiplasmodial *in vitro* contra a forma eritrocítica do parasito (EC_{50}^{3D7} entre 5,6–1.600 nM) e citotoxicidade (MCL_{50} > 19 μM) do subconjunto de 11 compostos do *Malaria Box* (1–11). Ensaios de combinação com o antimalárico artesunato e estágio de ação foram conduzidos para avaliar o potencial de associação e qual fase do ciclo eritrocítico seria mais suscetível as moléculas desse subconjunto. Os resultados obtidos indicam que alguns compostos apresentam caráter aditivo (2 e 9) ou antagonístico (1, 3–8, 10 e 11) em relação ao artesunato e ação rápida (1–3, 5, 7, 9–11) ou lenta (4, 6 e 8) no desenvolvimento do parasita. Diante desses resultados, um conjunto de critérios estruturais e de atividade biológica foi estabelecido para a seleção de um candidato para estudos de relação estrutura-atividade (SAR). O derivado de hidrazinobenzimidazol (4) foi selecionado como *hit* inicial e 24 derivados (12–35) foram planejados, sintetizados e tiveram a atividade de inibição enzimática (IC_{50} entre 44 – >200 μM), atividade antiplasmodial contra cepas sensível (EC_{50}^{3D7} entre 0,19–14 μM) e resistente (EC_{50}^{K1} entre 0,15–2,4 μM) e citotoxicidade (MCL_{50} > 3,7 μM) determinadas no primeiro ciclo de SAR. Os dados obtidos sugerem que a enzima Pfen não é o alvo principal de ação dos derivados hidrazinobenzimidazol, contudo, a atividade antiplasmodial da série indicou razoável distribuição em termos de potência e variabilidade estrutural que permitiram a construção de um modelo HQSAR ($q^2 = 0,64$ e $r^2 = 0,93$) adequado para o planejamento e predição da atividade inibitória de oito novos derivados hidrazinobenzimidazol (36–43). Os novos derivados foram sintetizados e tiveram sua atividade antiplasmodial (EC_{50}^{3D7} entre 0,10–2,3 μM), citotoxicidade (MCL_{50} > 3 μM) e seletividade ($SI > 5$) determinadas. Os dados de validação prospectiva do modelo indicaram boa correlação entre a atividade real e predita para os novos derivados. Além disso, neste segundo ciclo de SAR foi descoberto o composto 41 como o mais potente ($EC_{50} = 0,1 \mu M$) e seletivo ($SI > 2.000$) da série investigada neste trabalho. Nossos resultados indicam que os derivados hidrazinobenzimidazol são moléculas atrativas para a descoberta de compostos líderes para o desenvolvimento de candidatos a fármacos antimaláricos.

Palavras-chave: Malária. Inibidor. Planejamento de fármacos.

ABSTRACT

SOUZA, G. E. **Discovery of hydrazinobenzimidazole derivatives as *Plasmodium falciparum* inhibitors: Organic Synthesis, Biological Activity and Structure-Activity Relationships**. 2017. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Malaria is the tropical disease with the highest overall mortality rate. The emergence of resistance to first-line therapies reinforces the need for the development of new drug candidates. The main goal of this work was the discovery and optimization of these molecules as lead candidates for the development of new antimalarial agents. In this sense, we screened Malaria Box collection and identified 11 molecules from different chemical classes as inhibitor candidates of *Plasmodium falciparum* enolase enzyme (Pfeno). Then, we determined the inhibitory potency against the target enzyme (IC_{50} between 11 – >1.000 μM), in vitro antiplasmodial activity against the erythrocytic form of the parasite (EC_{50}^{3D7} between 5,6-1600 nM) and cytotoxicity (MCL_{50} > 19 μM) of the 11 compounds subset from Malaria Box (**1-11**). Combination with artesunate and stage of action assays were conducted to evaluate the potential of association and which erythrocytic stage would be more susceptible to the molecules of this subset. The results obtained indicate that some compounds showed additive (**2** and **9**) or antagonistic (**1**, **3-8**, **10** and **11**) effect with artesunate and fast (**1-3**, **5**, **7**, **9-11**) or slow (**4**, **6** and **8**) acting on parasite development. In view of these, a set of structural and biological activity criteria was established for the selection of a candidate for structure-activity relationship (SAR) studies. The hydrazinobenzimidazole derivative (**4**) was selected as hit and 24 derivatives (**12-35**) were designed, synthesized and had the enzyme inhibitory activity (IC_{50} between 44 – >200 μM), antiplasmodial activity against sensitive strains (EC_{50}^{3D7} between 0,19–14 μM) and resistant (EC_{50}^{K1} between 0,15–2,4 μM) and cytotoxicity (MCL_{50} > 3,7 μM) determined in the first round of SAR. The collected data suggest that Pfeno is not the main target of the hydrazinobenzimidazole derivatives. However, the antiplasmodial activity of the series indicated a reasonable distribution in terms of potency and structural variability which allowed us the development of a HQSAR model ($q^2 = 0,64$ and $r^2 = 0,93$) suitable for the design and prediction of the inhibitory activity of eight new hydrazinobenzimidazole derivatives (**36-43**). The new derivatives were synthesized and had the antiplasmodial activity (EC_{50}^{3D7} between 0,10–2,3 μM), cytotoxicity (MCL_{50} > 3 μM) and selectivity ($SI > 5$) evaluated. The prospective validation of the HQSAR model indicated good correlation between the actual and predicted activity for the new derivatives. Moreover, in the second round of SAR, compound **41** was discovered as the most potent ($EC_{50} = 0.1 \mu M$) and selective ($SI > 2,000$) in these series. Our results indicate that the hydrazinobenzimidazole derivatives are attractive molecules for the discovery of new lead compounds for the development of antimalarial drug candidates.

Keywords: Malaria. Inhibitor. Drug design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - (A) Países endêmicos para a malária em 2000 e 2016. (B.1) Distribuição dos municípios em cada fase de eliminação de malária falciparum. (B.2) Previsão da distribuição dos municípios em cada fase de eliminação de malária falciparum baseado nas metas propostas para 2019.....	25
Figura 2 - O caminho da resistência a cloroquina.	29
Figura 3 - Sítios de suspeita ou confirmação de resistência a artemisinina até 2012	29
Figura 4 - Ciclo de vida do Plasmodium.	32
Figura 5 - Reação catalisada pela enzima enolase.	34
Figura 6 - Esquematização reacional do ensaio acoplado	40
Figura 7 - Síntese de análogos de 2-hidrazilbenzimidazol.	41
Figura 8 - Síntese de análogos de hidrazinobenzimidazóis.	41
Figura 9 - Esquematização de uma placa de testes para ensaio de inibição SYBR green I	43
Figura 10 - (A) Gel SDS-PAGE referente às etapas de purificação da Pfeno. (B) Cromatograma de exclusão molecular referente à última etapa de purificação da Pfeno.	48
Figura 11 - Estudos cinéticos da Pfeno. (A) e (B) mostram a variação da absorbância a 240 nm devido, respectivamente, à formação e ao consumo de PEP; a inclinação inicial dessas curvas foi usada para a construção das curvas de Michaelis-Menten dos itens (C) e (D), que indicam os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} das reações direta e reversa catalisadas pela Pfeno.	49
Figura 12 - Curvas concentração-resposta contra a atividade da Pfeno para os hits identificados na coleção Malaria Box com valor de $IC_{50} < 1000 \mu M$	53
Figura 13 - Curvas concentração-resposta contra <i>P. falciparum</i> (3D7) para os hits identificados na coleção Malaria Box	56
Figura 14 - Estudo do estágio de ação dos candidatos a antimaláricos.....	58

Figura 15 - Isobologramas dos candidatos a antimaláricos testados. A reta tracejada indica caráter aditivo ideal.	64
Figura 16 - Mecanismo para a formação de hidrazonas.....	66
Figura 17 - Correlação entre os valores de pEC ₅₀ dos derivados de hidrazinobenzimidazol contra as cepas sensível (3D7) e resistente (K1) de <i>P. falciparum</i>	68
Figura 18 - Curvas concentração-resposta contra a atividade da Pfeno para os três derivados de hidrazinobenzimidazol mais potentes.....	74
Figura 19 - Curvas concentração-resposta para os três derivados de hidrazinobenzimidazol mais potentes contra <i>P. falciparum</i> (3D7)	74
Figura 20 - Mapa de similaridade estrutural gerado pelo software SYBYL-X com base no descritor UNITY Fingerprint	75
Figura 21 - Representação gráfica da distribuição de pEC ₅₀ e de grupos estruturais para os conjuntos teste, treinamento e total, evidenciando a representatividade dos conjuntos de dados de derivados de hidrazinobenzimidazol.	76
Figura 22 - Representação gráfica do pEC ₅₀ predito vs pEC ₅₀ experimental.....	79
Figura 23 - Comparação entre a atividade inibitória prevista pelo modelo HQSAR e a atividade inibitória experimental.....	82
Figura 24 - Mapa de resistência aos antimaláricos cloroquina, sulfadoxina-pirimetamina e mefloquina (2004).	85
Figura 25 - (A) Diagrama de correlação entre a potência inibitória dos <i>hits</i> identificados na coleção <i>Malaria Box</i> contra a atividade enzimática da Pfeno e contra o estágio intraeritrocítico do <i>P. falciparum</i> . (B) Diagrama de correlação entre a porcentagem de inibição dos derivados de hidrazinobenzimidazol contra a atividade enzimática da Pfeno a 200 µM e a potência inibitória contra o estágio intraeritrocítico do <i>P. falciparum</i>	86
Figura 26 - O derivado de hidrazinobenzimidazol 16 possui atividade antiplasmodial próxima à do composto que deu origem à série. Ambos não tiveram sua toxicidade diferenciada frente ao ensaio contra às células HepG2.....	88
Figura 27 - Sequência de redução do grupo nitro até o grupo amino.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros cinéticos das reações direta e reversa catalisadas pela Pfeno. As medidas foram realizadas usando-se a enzima Pfeno a 20 nM.	50
Tabela 2 - Numeração, estrutura e massa molecular dos inibidores identificados na coleção Malaria Box.	51
Tabela 3 - Valores de IC ₅₀ determinados contra o estágio intraeritrocítico de <i>P. falciparum</i> dos inibidores de Pfeno como candidatos a compostos líderes.	54
Tabela 4 - Valores de MLC ₅₀ e índices de seletividade determinados contra células de hepatocarcinoma (HepG2) para os candidatos a compostos líderes. .	59
Tabela 5 - Caráter combinatório dos candidatos a antimaláricos com relação ao artesunato.....	62
Tabela 6 - Resumo das características biológicas e químicas dos compostos investigados na coleção Malaria Box.	65
Tabela 7 - Estrutura molecular e atividade inibitória dos derivados de hidrazinobenzimidazol	70
Tabela 8 - Parâmetros de validação interna dos modelos HQSAR iniciais para os candidatos a antimaláricos derivados de hidrazinobenzimidazol.	77
Tabela 9 - Análise do tamanho dos fragmentos sobre os parâmetros de validação interna dos modelos HQSAR dos derivados de hidrazinobenzimidazol. 78	
Tabela 10 - Influência do número de componentes sobre os parâmetros de validação interna.....	79
Tabela 11 - Valores de EC ₅₀ predito, EC ₅₀ experimental, MLC ₅₀ e Índice de seletividade determinados contra o estágio intraeritrocítico de <i>P. falciparum</i> do segundo ciclo de derivados de hidrazinobenzimidazol. ...	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2PG	2-fosfoglicerato
A	Átomos
ACT	<i>Artemisinin-based combination therapy</i>
AUC	Área sob a curva
B	Ligações
C	Conectividade
Ch	Quiralidade
CI	Índice de combinação
CSP	Proteína circunsporozoíta
DA	Doadores/aceptores de ligação de hidrogênio
DNDi	<i>Drugs for Neglected Diseases Initiative</i>
EC ₅₀	Concentração efetiva média
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
FIC ₅₀	Concentração inibitória média fracional
GHIT	Fundo Global de Tecnologia Inovadora
GSK	GlaxoSmithKline
H	Hidrogênios
HL	Comprimento do holograma
HQSAR	Relação quantitativa estrutura-atividade baseada em holograma
HTS	<i>High-throughput screening</i>
IC ₅₀	Concentração inibitória média
K _M	Constante de Michaelis-Menten
m/v	Massa/volume
MLC ₅₀	Concentração letal média
MMV	<i>Medicines for Malaria Venture</i>
MTS	<i>Medium-throughput screening</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
MVP	Membrana do vacúolo parasitóforo

PEP	Fosfoenolpiruvato
<i>Pfeno</i>	Enolase de <i>Plasmodium falciparum</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PPP	Parceria público-privado
q ²	Coeficiente de correlação da validação cruzada
QSAR	Relação quantitativa estrutura-atividade
r ²	Coeficiente de correlação
RESA	<i>Ring-infected erythrocyte surface antigen</i>
SEE	Erro padrão de correlação
SNP	<i>Simple nucleotide polymorphism</i>
TRAP	<i>Thrombospondin-related anonymous protein</i>
UCSF	<i>University of California, San Francisco</i>
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Processo de Descoberta de Fármacos para Doenças Tropicais.....	21
1.1.1	Extensão de rótulo	21
1.1.2	Descoberta piggy-back.....	22
1.1.3	Descoberta de novo	22
1.2	Malária	24
1.2.1	Panorama Global	24
1.2.2	História dos antimaláricos.....	26
1.2.3	Terapias atuais e a resistência do Plasmodium falciparum à monoterapia	28
1.3	Ciclo de vida da malária humana	30
1.4	Metabolismo Energético no gênero Plasmodium	32
1.5	Enolase de Plasmodium falciparum	34
1.6	MMV e a coleção Malaria Box.....	34
2	OBJETIVOS	37
2.1	Objetivo Geral	37
2.2	Objetivos Específicos	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1	Enolase	39
3.1.1	Clonagem, Expressão e Purificação	39
3.1.2	Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) das reações direta e reversa.....	39
3.1.3	Ensaio de inibição da atividade enzimática	40
3.2	Síntese de derivados hidrazinobenzimidazol	41
3.3	Ensaios fenotípicos	41
3.3.1	Manutenção da cultura in vitro	41
3.3.2	Ensaio de inibição SYBR green I para estágio assexuado de P. falciparum .	42

3.3.3	Ensaio de combinação com artesunato	43
3.3.4	Estudo do estágio de ação.....	44
3.4	Cultivo celular de células de hepatocarcinoma e avaliação de citotoxicidade	44
3.5	HQSAR	45
4	RESULTADOS	47
4.1	Expressão e Purificação da Enolase.....	47
4.2	Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) das reações direta e reversa	48
4.3	Inibidores de Pfenno identificados na coleção Malaria Box.....	50
4.3.1	Inibição do ciclo intraeritrocítico de <i>P. falciparum</i>	54
4.3.2	Estudo do estágio de ação.....	57
4.3.3	Citotoxicidade e Seletividade	59
4.3.4	Ensaio de combinação com artesunato	61
4.4	Seleção, planejamento, síntese e atividade biológica de derivados	64
4.4.1	HQSAR	75
4.4.2	Segundo ciclo sintético – atividade e toxicidade	80
5	DISCUSSÃO	83
6	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	89
	REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 Processo de Descoberta de Fármacos para Doenças Tropicais

Diversas doenças de âmbito global exigem tratamentos novos e melhorados continuamente, incluindo doenças infecciosas causadas por bactérias, protozoários e helmintos, como tuberculose, malária, doença do sono africana, leishmaniose, doença de Chagas, oncocercose, filariose linfática e esquistossomose.¹⁻³ Vários fatores limitam a utilidade de fármacos já existentes em locais com poucos recursos, como alto custo, baixa adesão, emergência de resistência, e eficácia e segurança baixas,² tornando a demanda por novas terapias contínua e urgente. Desta forma, um processo eficiente de descoberta de fármacos é necessário para garantir a disponibilidade de novos produtos que reduzem a mortalidade e a morbidade resultantes dessas infecções.⁴⁻⁵

Descobrir compostos líderes é um passo crucial no processo de planejamento de moléculas bioativas como candidatos a fármacos.^{4,6} Em reconhecimento desta necessidade várias agências, organizações internacionais/nacionais e fundações filantrópicas têm apoiado a descoberta destes agentes para doenças tropicais através de programas baseados em parcerias público-privado (PPPs).^{5,7} Nesse cenário, a descoberta de novos agentes terapêuticos para doenças tropicais utiliza três estratégias: extensão de rótulo, descoberta *piggy-back* e descoberta *de novo*.

1.1.1 Extensão de rótulo

Até recentemente, a estratégia primária para descoberta de fármacos para doenças parasitárias era baseada em estender para doenças tropicais as indicações de tratamentos existentes para outras doenças humanas e animais.^{5,8,9} Esta abordagem rápida foi bem sucedida e resultou em alguns dos mais importantes fármacos antiparasitários em uso hoje, como ivermectina para filariose/oncocercose, praziquantel para esquistossomose, e pirimetamina para toxoplasmose.¹⁰⁻¹⁴ Essa

estratégia continua a ter um papel importante no desenvolvimento de novas formas de tratamento para doenças tropicais. Os principais atrativos desta abordagem são as reduções possivelmente alcançadas em custo e tempo até o mercado. Além disso, nas últimas três décadas houve poucos programas específicos de descoberta de fármacos apoiados pela indústria farmacêutica que têm como alvo doenças tropicais. Porém, preocupações relacionadas ao excesso de confiança em extensões de rótulo surgiram recentemente: muitas companhias têm sido relutantes em permitir que seus produtos sejam desenvolvidos para doenças tropicais caso seu potencial econômico seja prejudicado por toxicidades inesperadas nestes pacientes.⁵ Estes e outros fatores impulsionaram a busca por novos produtos para doenças tropicais usando estratégias alternativas de descoberta.^{5,15}

1.1.2 Descoberta *piggy-back*

Esta estratégia é especialmente útil quando um alvo molecular presente em parasitos é investigado para outras indicações (comerciais), facilitando a identificação de moléculas promissoras como pontos de partida para estudos específicos em doenças parasitárias.¹⁶ Exemplos desta abordagem incluem a triagem de antimaláricos da série líder de inibidores de histona-deacetilase¹⁷ originalmente desenvolvidos para quimioterapia de câncer, e inibidores de cisteíno protease desenvolvidos para osteoporose.⁸ Deve-se notar que as relações estrutura-atividade emergentes dos ensaios parasitários provavelmente não são as mesmas observadas para a indicação original. É provável, portanto, que candidatos clínicos otimizados emergentes desta estratégia sejam específicos para a doença parasitária investigada.

1.1.3 Descoberta *de novo*

Esta estratégia se concentra na identificação de novas entidades químicas, tanto compostos sintéticos quanto produtos naturais, como candidatos a novos fármacos. É uma estratégia de mais longo prazo que as discutidas anteriormente,

integrando a descoberta baseada em triagem de larga escala (HTS, do inglês *high-throughput screening*) baseada no alvo e triagem de média escala (MTS, do inglês *medium-throughput screening*) em ensaios fenotípicos contra proteínas específicas e/ou contra o parasito (do inglês, *whole-cell assay*).

Campanhas de HTS baseado em alvo vêm sendo enfatizadas como uma forma de recuperar o investimento significativo feito em programas de genômica parasitária pela comunidade internacional.^{18–21} Porém, dificuldades encontradas em seguir com o desenvolvimento de *hits* resultantes – por exemplo, em demonstrar uma correlação entre inibição enzimática e atividade contra o parasito – gerou interesse no desenvolvimento de técnicas de HTS para triagem fenotípica.^{15,22–25} Campanhas recentes de HTS fenotípico usando coleções compostas por fármacos registrados geraram resultados encorajadores.^{24–25} Além disso, métodos de quimioinformática ligados a genômica, triagem *in silico*,^{26–28} bem como determinação estrutural de proteínas e sua co-cristalização com pequenas moléculas, foram utilizados na descoberta de candidatos a fármacos antibacterianos e antiparasitários.^{29–32}

O uso de MTS em ensaios fenotípicos com compostos escolhidos com base em propriedades biológicas, bioquímicas ou estruturais continua a opção de triagem mais utilizada para doenças parasitárias.³³ A principal desvantagem desta abordagem é o baixo rendimento dos ensaios disponíveis, e o investimento limitado no desenvolvimento de novos ensaios robustos. Uma dificuldade recorrente em todas as triagens (HTS ou MTS) para doenças negligenciadas é a disponibilidade de coleções de compostos de alta qualidade.³⁴

Até o momento no campo de descoberta de novos agentes quimioterápicos (incluindo antiparasitários), a abordagem de HTS baseada em alvo tem fornecido poucas histórias de sucesso.^{6,35–37} Isto reflete em parte a alta taxa de atrito no progresso de *hits* iniciais até compostos líderes robustos. Muitos compostos ativos em ensaios baseados em proteínas são inativos contra a célula. Isto pode ser devido à falha em entrar em células intactas, mas também pode ocorrer pelo fato dos alvos moleculares escolhidos não serem de fato essenciais ao microrganismo. Esta última questão sugere que mais investigações são necessárias para a validação do alvo molecular, visando-se o aumento dos níveis de confiança na seleção de proteínas candidatas a alvos em campanhas de HTS. O desafio inicial de identificar alvos moleculares cruciais à sobrevivência do parasito, acoplado com a identificação de

compostos ativos no ensaio fenotípico, se torna ainda mais difícil pela necessidade de alcançar eficácia em modelos animais, atingindo um nível apropriado de equilíbrio entre as propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas.

1.2 Malária

1.2.1 Panorama Global

Malária é a doença tropical com maior taxa de mortalidade global. Em 2015, foram registrados 212 milhões de novos casos de malária e 429 mil mortes em todo o mundo.³⁸ A África subsaariana é atualmente a região mais crítica com relação à malária (Figura 1). No entanto, um aumento de 77% em diagnósticos para crianças e de cinco vezes no tratamento preventivo para mulheres grávidas foi relatado nos últimos 5 anos.³⁸ A maioria dos casos de Malária ocorrem na Índia, no Sudeste Asiático e na América do Sul. Na América do Sul, destaca-se a bacia Amazônica, com 580 mil casos relatados em 2010, principalmente no Brasil (281.586) e na Colômbia (115.000).³⁹ Em 2010, somente 240 mortes foram registradas nesta região, 0.085% do total global. Este número baixo reflete uma combinação de fatores: a maior qualidade da assistência médica, e o fato de que a maioria dos casos é ocasionado por *Plasmodium vivax* (70%), uma espécie menos letal.⁴⁰⁻⁴¹

A malária tem sido um problema de saúde de longo prazo na América do Sul. Ao longo do século XX, o continente passou por um rápido e desordenado processo de desenvolvimento, levando a uma migração populacional. Na bacia amazônica, com grandes perspectivas de mineração e agricultura,⁴²⁻⁴³ surgiram oportunidades de trabalho, o que levou a um aumento no predomínio e incidência da malária nos anos 1970 e 1980,⁴⁴ uma tendência que somente agora começa a ser revertida.⁴⁵

No Brasil, a área endêmica compreende a região amazônica brasileira, incluindo os estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão, totalizando 808 municípios. Esta região é responsável por 99% dos casos autóctones do país. Em 2012, foram detectados cerca de 250 mil casos no Brasil. O número de casos graves e óbitos também apresentou uma grande redução no mesmo período.⁴⁶ Todo este avanço na redução do número de casos/óbitos se deve às estratégias implementadas para o controle da

doença, onde os casos são identificados e tratados com menos de 48 horas após o aparecimento dos sintomas.

Durante o ano de 2016, foram registrados 128.747 casos de malária na região Amazônica, com a maioria (49.149) vinda do estado do Amazonas, e 13.808 (10.7%) dos casos correspondentes a malária grave (causada por *Plasmodium falciparum*), sendo o Acre o estado mais atingido, com 6.413 casos (46% dos casos de malária *falciparum*) (Figura 1). No ano de 2017, até o mês de outubro, foram registrados 141.581 casos de malária na região Amazônica (um aumento de 10% em comparação a todo o ano de 2016), com a maioria (62.871) vinda novamente do estado do Amazonas, e 14.263 (10.1%) dos casos correspondentes a malária grave, sendo também o Amazonas o estado mais atingido, com 6.014 casos (42% dos casos de malária *falciparum*).⁴⁷

Figura 1 - (A) Países endêmicos para a malária em 2000 e 2016. (B.1) Distribuição dos municípios em cada fase de eliminação de malária *falciparum*. Prevenção à reintrodução de casos: sem casos autóctones nos últimos 3 anos; Eliminação: incidência parasitária anual (IPA) *falc* < 10; Médio risco: IPA *falc* entre 10 e 50; Alto risco: IPA *falc* > 50 (2012 a 2014). (B.2) Previsão da distribuição dos municípios em cada fase de eliminação de malária *falciparum* baseado nas metas propostas para 2019.

Fonte: Adaptada de WORLD...,³⁸ SANTELLI. et al. ⁴⁸

1.2.2 História dos antimaláricos

A busca por antimaláricos precede em milênios um entendimento científico da doença, e os componentes ativos da terapia atual de combinação com derivados de artemisinina provém dos mais antigos remédios herbais para febres maláricas. A história da descoberta de antimaláricos contribuiu fundamentalmente para o conceito moderno de quimioterapia e para o surgimento da indústria farmacêutica no último século. A complexidade do ciclo de vida do parasito e suas várias interações com os hospedeiros mamíferos e o mosquito vetor sugerem vários alvos de fármacos em potencial para intervenção na doença e/ou transmissão. Dois dos produtos naturais identificados como antimaláricos (quinina e artemisinina) ajudaram a revelar pontos fracos do parasito que continuam a ser explorados terapeuticamente até hoje.⁴⁹

A casca do tronco da árvore cinchona, nativa da América do Sul, é uma fonte rica de alcaloides medicinais. O primeiro uso da casca no tratamento da malária é frequentemente atribuído aos missionários jesuítas no Peru, no século XVII, embora a população indígena já usasse infusões da casca muito antes em combate aos calafrios em condições frias e úmidas.⁵⁰ A descoberta da “Casca de Árvore Jesuíta” repercutiu-se na Europa e seu uso foi rapidamente adotado. A quinina foi primeiramente isolada da casca da cinchona na França em 1820, e a superioridade do alcaloide puro em comparação à casca da árvore foi rapidamente apreciada. Com a quinina pura em mãos, a dosagem apropriada pode ser estabelecida com segurança, e dessa forma nasceu a primeira quimioterapia, no sentido moderno da palavra. Embora a estrutura da quinina não tivesse sido estabelecida até o começo do século XX, uma tentativa ambiciosa da sua síntese em 1856 levou à descoberta do primeiro corante anilínico, mauveína. Esta descoberta impulsionou uma indústria de corantes sintéticos que permitiria o trabalho de Paul Ehrlich no estabelecimento dos conceitos de farmacologia de pequenas moléculas e toxicidade seletiva de quimioterápicos. A indústria farmacêutica que logo emergiu produziria entre seus primeiros antimaláricos sintéticos cloroquina e quinacrina, que viriam a substituir o uso da quinina.⁵⁰

Na China, o uso do absinto-doce (*Artemisia annua*) no tratamento de febres data de pelo menos dois milênios. No final dos anos 1960, em apoio ao exército norte-vietnamita, o governo chinês lançou um programa de pesquisa para

identificação de agentes antimaláricos ativos na medicina herbal tradicional chinesa.⁵¹ Nos anos 1970, cientistas chineses obtiveram sucesso no isolamento e caracterização estrutural da artemisinina (qinghaosu), um endoperóxido de sesquiterpeno com uma estrutura tão notável que o trabalho recebeu uma reação cética quando surgiu no ocidente. Porém, as propriedades antimaláricas do composto eram inegáveis, e logo seguiu-se com o desenvolvimento de análogos semissintéticos para administração oral. Devido ao impacto da descoberta e importância da artemisinina na quimioterapia da malária, a farmacologista chinesa Youyou Tu foi laureada em 2015 com o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia. Atualmente, as terapias de combinação baseadas em artemisinina (ACT, do inglês *artemisinin-based combination therapy*) constituem o padrão de tratamento de malária *falciparum* não-resistente. Tipicamente, a ação rápida do componente artemisinina é combinada com um agente de ação antimalárica mais prolongada (frequentemente uma quinolina sintética).

Nas últimas décadas viu-se um renascimento na descoberta de antimaláricos, possível em parte pela visão de organizações como Wellcome Trust e Fundação Bill e Melinda Gates. Durante esse período, vimos também uma transformação no portfólio de antimaláricos, com várias novas entidades químicas entrando em desenvolvimento clínico.⁵² Um exemplo de antimalárico atualmente em desenvolvimento clínico é o KAF156, uma molécula pertencente à classe das imidazolopiperazinas, que na fase IIa foi capaz de eliminar rapidamente tanto *P. falciparum* quanto *P. vivax*. Com base nisso, esse composto passou para a fase IIb em estudos de combinação com o antimalárico lumefantrina.⁵³

Não somente novas classes de moléculas foram descobertas, como também novos alvos moleculares e novas formas de colaboração e métodos para acelerar o desenvolvimento de fármacos. As colaborações entre laboratórios acadêmicos e indústrias farmacêuticas são exemplos bem-sucedidos de um novo modelo de desenvolvimento de fármacos antiparasitários. Um dos primeiros exemplos deste tipo de colaboração envolveu os esforços de cientistas da UCSF (*University of California, San Francisco*) e GSK (GlaxoSmithKline) no estudo das falcipainas, cisteíno-proteases do parasito envolvidas na degradação da hemoglobina. Esta colaboração teve sucesso na descoberta de moléculas potentes e eficazes que alcançaram o estágio de candidatos clínicos.⁵⁴

1.2.3 Terapias atuais e a resistência do *Plasmodium falciparum* à monoterapia

Nos últimos 50 anos, a emergência de cepas resistentes aos antimaláricos comumente usados atrasou consideravelmente os esforços para o controle da malária.⁵⁵ O surgimento de formas resistentes do parasito encurtou a duração de eficácia terapêutica de antimaláricos disponíveis e pôs programas de controle sob grande stress.

Historicamente, o Sudeste Asiático é o centro da emergência de malária resistente; no entanto, são poucas as regiões do mundo que ainda não sentiram os efeitos da malária resistente (Figura 2). A América Central a oeste do Canal do Panamá, Haiti, República Dominicana e parte do Oriente Médio permanecem as únicas áreas onde a sensibilidade a cloroquina é comum.⁵⁶ Na América do Sul, a resistência a cloroquina é generalizada. Partes da região Amazônica mostraram alto nível de resistência a sulfadoxina e pirimetamina, e resistência a mefloquina já foi descrita, embora não no grau encontrado no Sudeste Asiático.⁵⁷ No Leste e Sul Africano, alto nível de resistência a sulfadoxina e pirimetamina é encontrado. Comparativamente, partes do Oeste Africano ainda possuem níveis relativamente baixos de resistência a sulfadoxina e pirimetamina. Na África, amodiaquina é, em geral, mais eficiente que a cloroquina, embora ainda haja resistência cruzada com a cloroquina, e a eficácia da amodiaquina esteja decaindo. O Sul Asiático e o Oriente Médio também demonstram resistência a sulfadoxina e pirimetamina, mas ainda há sensibilidade geral a mefloquina.⁵⁸

ACTs são usadas em todo o mundo como a primeira linha de tratamento,⁵⁹ mas pacientes com resistência a artemisinina são agora rotineiramente identificados no Sudeste Asiático (Figura 3).^{60–65} Derivados de artemisinina contribuem para a rápida morte do parasito e a um *clearance* mais rápido em ACTs. A tolerância/resistência a artemisinina se manifesta em um *clearance* de parasitos mais lento, enquanto ACTs se mantêm efetivas clínica e parasitologicamente.^{61,66–68} Estudos genômicos indicaram dois conjuntos de marcadores putativos à resistência a artemisinina – polimorfismo do *K13-propeller*,⁶⁹ e um polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP, do inglês *simple nucleotide polymorphism*) no gene codificante para a proteína de reparo de DNA *RAD5* no cromossomo 13 (e possivelmente também no cromossomo 10).⁷⁰

Atualmente, no Brasil, a Organização Mundial da Saúde recomenda o uso de combinação de fármacos esquizotônicos sanguíneos no tratamento da malária.³⁸ Em áreas onde os parasitos apresentam resistência à cloroquina, são administrados derivados semissintéticos da artemisinina, como o arteméter, arte-éter e artesunato, em combinação com outro antimalárico, como lumefantrina, amodiaquina, e sulfadoxina-pirimetamina, ou com antibióticos. A primeira opção de tratamento da malária *falciparum* preconizada pelo Ministério da Saúde é a combinação de arteméter com lumefantrina, associada à primaquina como bloqueadora de transmissão. No caso de malária *vivax* não-complicada, o medicamento de escolha é a cloroquina, associada à primaquina para prevenção de recaídas tardias da doença.⁷¹

Figura 2 - O caminho da resistência a cloroquina.
Fonte: Adaptada de PACKARD⁷²

Figura 3 - Sítios de suspeita ou confirmação de resistência a artemisinina até 2012.
Fonte: Adaptada de WHO⁷³

1.3 Ciclo de vida da malária humana

O *Plasmodium falciparum* e, em menor extensão, o *Plasmodium vivax*,⁷⁴ são os principais causadores das mortes por malária.³⁸ Estes parasitos possuem um ciclo de vida complexo, que se inicia quando as fêmeas do mosquito *Anopheles spp.* inoculam esporozoítos no tecido subcutâneo do hospedeiro, os quais deixam o sítio de injeção e encontram a circulação por conta própria (Figura 4).⁷⁵⁻⁷⁷

Uma vez que os esporozoítos alcançam o fígado, eles deslizam livremente por alguns minutos ao longo do epitélio sinusoidal, processo este que pode ocorrer tanto a favor quanto contra o fluxo sanguíneo. Em seguida os esporozoítos atravessam as células de Kupffer em direção ao espaço de Disse. Uma vez no interior do parênquima hepático, os esporozoítos continuam a migrar através de vários hepatócitos, e eventualmente invadem um hepatócito final, com a formação de um vacúolo parasitóforo, iniciando assim o crescimento do estágio hepático.⁷⁸ O hepatócito, devido à sua atividade metabólica única como sintetizador de lipídeos e purinas e como armazenador de glicogênio, é capaz de prover ao estágio hepático em desenvolvimento os nutrientes necessários para a geração de milhares de merozoítos que são liberados em circulação.

A fim de saírem do hepatócito hospedeiro e entrarem na corrente sanguínea, os merozoítos exoeritrocíticos induzem a morte e separação dos hepatócitos, seguidas de brotamento das vesículas preenchidas com merozoítos (merossomos) no lúmen sinusoidal.⁷⁹⁻⁸⁰ Os merossomos são cercados por membrana celular do hospedeiro e não expõem o sinal apoptótico clássico – fosfatidilserina – em sua superfície, sugerindo que o hepatócito infectado não sofre apoptose antes da liberação do merossomo.^{79,81} A maioria dos merossomos saem intactos do fígado e se adaptam a um tamanho relativamente uniforme, no qual 100-200 merozoítos residem.⁸¹ Merossomos sobrevivem à subsequente passagem pelo lado direito do coração e se acumulam nos pulmões, se rompendo no interior dos capilares pulmonares com subsequente liberação dos merozoítos na corrente sanguínea.

A invasão eritrocítica por parasitos da malária é um processo de várias etapas que envolve adesão, reorientação, ligação da extremidade apical, formação de junção, formação da MVP e internalização.⁸² As organelas apicais (micronemas e roptrias), bem como os grânulos densos, estão envolvidas em várias destas etapas.

Observações iniciais de que *P. knowlesi* e *P. vivax* não invadem eritrócitos Duffy-negativos levaram à identificação do antígeno de grupo sanguíneo Duffy como receptores putativos de invasão para estes parasitos.⁸² No caso do *P. falciparum*, estudos de invasão com eritrócitos mutantes e enzimaticamente tratados *in vitro* demonstraram que resíduos de ácido siálico de glicoforinas são receptores para a invasão.^{83–85} No entanto, estudos recentes mostraram que a ausência da proteína Duffy não se mostra mais protetiva contra a infecção por *P. vivax*.⁸⁶ Esta hipótese é reforçada por um estudo onde viajantes e imigrantes europeus da África central e ocidental infectados por *P. vivax* apresentavam fenótipo Duffy-negativo.⁸⁷ Estes dados sugerem que o *P. vivax* pode estar desenvolvendo mecanismos alternativos de ligação e invasão de eritrócitos.

Durante o estágio sanguíneo da infecção, os parasitos passam por repetidos ciclos de invasão eritrocítica, replicação, egresso e re-invasão, que resultam em todas as manifestações clínicas da doença, incluindo os picos febris característicos. O *P. falciparum* apresenta um ciclo replicativo eritrocítico de 48 horas, durante as quais o parasito progride pelos estágios de anel, trofozoíto e esquizonte.⁸⁸ O parasito em estágio de anel é primeira forma parasitária estabelecida após a invasão do eritrócito por um merozoíto; em seguida, o parasito assume uma forma arredondada no estágio de trofozoíto, no qual é muito mais metabolicamente ativo e expressa antígenos de superfície para cito-adesão. O trofozoíto cresce substancialmente em tamanho em preparação ao subsequente estágio de esquizonte, caracterizado pela replicação assexuada e divisão celular (esquizogonia), resultando por fim na produção de 16-32 merozoítos.⁸⁸ Após a ruptura do eritrócito, os merozoítos são liberados na corrente sanguínea, onde invadem novos eritrócitos, iniciando assim a próxima onda de desenvolvimento do estágio sanguíneo.

Uma pequena proporção dos parasitos assexuados se converte em gametócitos, essenciais para a transmissão da infecção através da fêmea do mosquito *Anopheles spp.* Neste ponto, a estratégia do *P. vivax* se difere daquela do *P. falciparum*. O primeiro se desenvolve em gametócitos logo após a liberação dos merozoítos do fígado; o segundo desenvolve gametócitos mais tardiamente.⁸⁹ A transmissão do hospedeiro humano ao mosquito ocorre durante o repasto sanguíneo, quando os mosquitos ingerem gametócitos circulantes no sangue periférico.

Figura 4 - Ciclo de vida do *Plasmodium*.
Fonte: Adaptada de FLANNERY⁹⁰

1.4 Metabolismo Energético no gênero *Plasmodium*

O metabolismo de carbono dos parasitas da malária é amplamente considerado sinônimo de metabolismo de carboidratos, principalmente a via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) da glicólise. Estágios assexuados de *Plasmodium* são grandes consumidores de glicose. A célula hospedeira, o eritrócito, não possui mitocôndria e, portanto, é completamente dependente da fermentação da glicose. Como uma célula não-proliferativa com necessidades energéticas modestas, o consumo de glicose por eritrócitos é relativamente baixo, da ordem de $5 \mu\text{mol} / 24 \text{ h} / 10^9$ eritrócitos.⁹¹ Com a invasão do parasito, no entanto, estima-se que a taxa de consumo de glicose aumenta 100 vezes nos estágios mais metabolicamente ativos de trofozoítos e esquizontes.⁹²

Experimentos de cultura *in vitro* usando vários outros açúcares estabeleceram que, além da glicose, somente a frutose pode sustentar crescimento contínuo (a uma taxa reduzida).⁹³⁻⁹⁴ A maior parte (60-70%) da glicose consumida por *Plasmodium falciparum* é incompletamente oxidada a ácido láctico e excretada,⁹¹ embora a proporção exata varie entre diferentes espécies de *Plasmodium* e

condições atmosféricas de cultura usadas. Este consumo de glicose se contrasta com os >90% de conversão glicose-lactato observado em eritrócitos não-infectados e reflete o fluxo aumentado de glicose em biomassa necessária à proliferação dos parasitos. Em parasitos de malária em mamíferos, somente uma fração muito pequena da glicose total é completamente oxidada a dióxido de carbono,⁹⁵⁻⁹⁷ o que indica a ausência de um ciclo do ácido cítrico funcional contribuindo à produção energética. Isto está de acordo com o fato de culturas *in vitro* de *P. falciparum* exibirem consumo mínimo de oxigênio⁹⁸ (e de fato preferirem condições microaerófilas de ~5% de oxigênio, tendo seu crescimento inibido por concentrações de oxigênio atmosféricas).⁹⁹ Estes resultados sugerem fortemente que a forma assexuada de *Plasmodium* depende primariamente da fermentação da glicose para suas necessidades energéticas. Em concordância, inibidores da respiração mitocondrial têm apenas um pequeno efeito nas reservas de ATP do parasito.¹⁰⁰

O parasito acomoda este grande requerimento de glicose expressando pelo menos um transportador de hexose para a superfície da célula infectada,¹⁰¹ aumentando a permeabilidade da membrana eritrocítica a hexoses.¹⁰² Tais modificações da célula hospedeira levantam a questão de precisamente quanto a maquinaria glicolítica do hospedeiro interage com a do parasito. Todas as enzimas necessárias para a via EMP completa são (i) codificadas no genoma do parasito,¹⁸ (ii) expressas durante os estágios sanguíneos,¹⁰³ e (iii) detectadas em células infectadas, em alguns casos aumentando substancialmente a atividade normalmente observada em eritrócitos. Glicose livre é rapidamente fosforilada em glicose-6-fosfato pela hexoquinase da célula hospedeira após a entrada no citosol do eritrócito, tornando-a impermeável à membrana e efetivamente aprisionando-a no compartimento do hospedeiro. Sua importação ao parasito pode depender de desfosforilação por uma fosfatase ácida que é transportada à superfície da membrana plasmática do parasito que hidrolisa grupos fosfato de uma diversidade de pequenas moléculas.¹⁰⁴ Esta hidrólise inespecífica de ligações fosfato de alta energia pode levar à drenagem energética do citosol hospedeiro, apesar do fato do parasito necessitar que a célula hospedeira permaneça viável até a lise requerida à conclusão do ciclo de desenvolvimento. Os parasitos podem contornar esta dificuldade provendo ao hospedeiro moléculas metabolicamente úteis como ATP¹⁰⁵ e glutatona.¹⁰⁶ Esta fosfatase secretada pode também ajudar a explicar a queda observada em células infectadas dos níveis de 2,3-difosfoglicerato,¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ um

regulador alostérico da afinidade da hemoglobina por oxigênio, produzido por uma enzima (difosfoglicerato mutase) presente no eritrócito mas não no parasito.^{18,110}

1.5 Enolase de *Plasmodium falciparum*

Devido à sua importância ao parasito para produção de energia e outras funções fisiológicas, enzimas glicolíticas têm sido consideradas importantes alvos terapêuticos e validadas nas novas buscas em larga escala por antimaláricos.^{111–115} Entre as diversas enzimas da via glicolítica, destaca-se a enolase (EC 4.2.1.11). Esta enzima catalisa a interconversão de 2-fosfoglicerato (2PG) e fosfoenolpiruvato (PEP) durante a glicólise e a gliconeogênese (Figura 5). A enolase de *Plasmodium falciparum* (*Pfeno*) emergiu como uma proteína multifacetada com várias funções não-glicolíticas, evidentes de sua propriedade antigênica¹¹⁶, seu envolvimento no processo de invasão da parede intestinal do mosquito^{117–119} e sua distribuição subcelular diversa.^{120–121}

Figura 5 - Reação catalisada pela enzima enolase.
Fonte: NELSON¹²²

1.6 MMV e a coleção Malaria Box

Medicines for Malaria Venture (MMV) é uma parceria para o desenvolvimento produtivo no campo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos antimaláricos, cuja missão é reduzir a malária em países endêmicos através da descoberta, do desenvolvimento e da facilitação da entrega de novos, efetivos e acessíveis antimaláricos. Desde sua fundação em 1999, MMV e parceiros desenvolveram e apresentaram sete novos medicamentos. Além disso, a MMV assumiu a administração de duas ACTs aprovadas pela Iniciativa Medicamentos para Doenças

Negligenciadas (DNDi, do inglês *Drugs for Neglected Diseases Initiative*) e parceiros: artesunato-amodiaquina e artesunato-mefloquina.¹²³

MMV e parceiros conduzem um portfólio de 65 projetos, o maior portfólio de Pesquisa e Desenvolvimento de antimaláricos já reunido. Este portfólio inclui, entre outros, nove novos fármacos em desenvolvimento clínico direcionados a necessidades médicas não-atendidas em malária, incluindo medicamentos para crianças, mulheres grávidas e malária recidivante. Desde sua fundação, a MMV construiu uma extensa rede com mais de 400 parceiros farmacêuticos e acadêmicos em mais de 55 países.¹²³

Para catalisar um processo robusto de desenvolvimento de fármacos, a MMV lançou uma coleção de compostos de acesso livre chamada *Malaria Box*. Todos os compostos têm atividade confirmada contra a forma sanguínea de *P. falciparum* e são disponíveis comercialmente, incluindo 200 compostos *drug-like* como pontos de partida para descoberta e desenvolvimento de fármacos de administração oral, e 200 compostos *probe-like* para uso como ferramentas biológicas na pesquisa da malária.¹²⁴ Esta seleção final foi escolhida a partir de aproximadamente 20 000 *hits* gerados por uma extensa campanha de triagem realizada com quatro milhões de compostos vindos de coleções de *St. Jude Children's Research Hospital*, Novartis e GSK. A seleção foi feita de modo a fornecer máxima diversidade estrutural e, no caso de compostos *drug-like*, propriedades comensuráveis com absorção oral e presença mínima de grupos toxicofóricos.^{125–127}

Os resultados preliminares da potência inibitória dos componentes da coleção *Malaria Box* contra a enzima *Pf*no foram o primeiro passo do trabalho desenvolvido nesta dissertação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Descoberta de inibidores da enzima enolase de *P. falciparum* e otimização da atividade destes inibidores contra a forma assexuada de *P. falciparum* para a descoberta de candidatos a compostos líderes para a malária.

2.2 Objetivos Específicos

- Expressão e purificação da enzima enolase de *Plasmodium falciparum* utilizando-se o sistema de expressão em *E. coli*;
- Determinação dos parâmetros cinéticos das reações direta e reversa catalisadas pela enzima enolase de *P. falciparum*;
- Síntese e avaliação de propriedades biológicas de derivados dos *hits* identificados no ensaio de atividade da enzima enolase;
- Determinação da potência inibitória dos candidatos a antimaláricos contra a enzima enolase de *P. falciparum*;
- Determinação da potência inibitória contra a forma assexuada do parasito;
- Determinação do potencial de combinação de candidatos a antimaláricos com o antimalárico artesunato contra a forma assexuada do parasito *in vitro*;
- Determinação do estágio de ação de candidatos a antimaláricos contra o estágio evolutivo de anel da forma assexuada do parasito;
- Determinação da citotoxicidade e seletividade de candidatos a antimaláricos frente a linhagem de hepatocarcinoma humano HepG2;
- Estudos de relação estrutura-atividade das séries mais promissoras.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Enolase

3.1.1 Clonagem, Expressão e Purificação

A sequência codificante para a enolase de *P. falciparum* foi previamente clonada em vetor de expressão pETTrx-1a na cepa de expressão *E. coli* BL21 Rosetta (DE3).¹²⁸ O crescimento bacteriano e a expressão proteica foram realizados em meio autoindutor ZYM-5052. O processo de purificação consistiu das seguintes etapas: cromatografia de afinidade em coluna de níquel, possibilitada pela cauda de hexa-histidina ligada à proteína de fusão Trx; cromatografia de exclusão molecular (*desalting*) para troca de tampão (remoção do imidazol); clivagem da proteína de fusão Trx; cromatografia de afinidade para remoção da proteína de fusão Trx; e cromatografia de exclusão molecular para garantir a homogeneidade do estado oligomérico conformacional. Após purificação, a proteína foi concentrada a 1,5 mg/mL em 25% glicerol.

3.1.2 Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) das reações direta e reversa

A atividade da enolase foi medida no sentido direto (formação de PEP a partir de 2PG) e reversa (formação de 2PG a partir de PEP) monitorando-se o aumento ou diminuição, respectivamente, da absorbância do PEP a 240 nm em um ensaio espectrofotométrico contínuo em um espectrofotômetro SpectraMAX PLUS 384. A variação na concentração de PEP foi determinada usando um coeficiente de absorção (ϵ_{240nm}) = 1400 M⁻¹ cm⁻¹. Tipicamente, 1 mL da mistura de ensaio contendo 100 mM MOPS, 1.5 mM MgCl₂, 1 nM *P*feno e concentrações variadas de 2PG ou PEP foram usadas. Os parâmetros cinéticos foram determinados a partir de curvas

[substrato] x velocidade através de ajuste de dados à equação de Michaelis-Menten usando-se o software GraphPad Prism.

3.1.3 Ensaio de inibição da atividade enzimática

O ensaio de inibição da atividade enzimática foi padronizado com base em reações acopladas às enzimas piruvato quinase e luciferase (Figura 6). O substrato da enzima enolase, 2PG, é convertido em PEP, o qual age como substrato para a enzima piruvato quinase, que transfere um grupo fosfato de seu substrato PEP para uma molécula de ADP, formando os produtos piruvato e ATP, este último sendo por sua vez hidrolisado pela enzima luciferase no processo de oxidação do substrato luciferina, gerando oxiluciferina na sua forma eletronicamente excitada, a qual se desativa através da emissão de luz visível.

A reação foi preparada em tampão MOPS 100 mM, pH 7.3, 1 mM β -mercaptoetanol, 1,5 mM $MgCl_2$, 1 mM ADP, 6 U/mL piruvato quinase, 20 nM enolase. Após incubação da enzima com o candidato a inibidor por 20 minutos, adicionou-se o substrato a uma concentração de 40 μ M num volume final de 100 μ L, incubando-se a reação por mais 20 minutos a 25 °C. Um volume de 100 μ L de *Kinase-Glo Plus* (Promega) foi adicionado, e após 5 minutos de incubação foi realizada a leitura da luminescência a 540 nm através de leitor de placas SpectraMAX Gemini EM.

Figura 6 - Esquemática reacional do ensaio acoplado. (A) Reação catalisada pela enzima *Pfeno*. (B) Reação catalisada pela enzima piruvato quinase. (C) Reação catalisada pela enzima luciferase.

Fonte: Elaborada pelo autor

3.2 Síntese de derivados hidrazinobenzimidazol

Para a síntese do 2-hidrazilbenzimidazol, foram adicionados a um balão de 250 mL 0,06 mol de 2-clorobenzimidazol e 0,6 mol de hidrazina hidratada 95% (10 equivalentes), sob refluxo por 12 horas (Figura 7). A reação foi resfriada à temperatura ambiente e o precipitado formado foi lavado com água destilada e em seguida seco sob alto vácuo.

Figura 7 - Síntese de análogos de 2-hidrazilbenzimidazol.
Fonte: Elaborada por Eric Francisco Simão (IQ-UNICAMP)

Na formação dos hidrazinobenzimidazóis, três gotas de ácido acético glacial foram adicionadas a uma solução de metanol contendo o correspondente aldeído (1 mmol) e 2-hidrazinilbenzimidazol (1 mmol), sob refluxo por uma hora (Figura 8). As hidrazonas são formadas como um precipitado e são facilmente purificadas através de cristalização, sem a necessidade de cromatografia.

Figura 8 - Síntese de análogos de hidrazinobenzimidazóis.
Fonte: Elaborada por Eric Francisco Simão (IQ-UNICAMP)

3.3 Ensaios fenotípicos

3.3.1 Manutenção da cultura *in vitro*

A cepa 3D7 de *P. falciparum* foi mantida em cultura em uma incubadora umidificada a 37°C em meio RPMI-1640, 25 mM NaHCO₃, 25 mM HEPES (pH 7,4), 11 mM glicose, 3,67 mM hipoxantina e 50 mg/mL gentamicina suplementado com 0,5% Albumax II. O meio de cultura foi trocado diariamente e a parasitemia

percentual mantida abaixo de 10% a um hematócrito de 2,5% em eritrócitos humanos O⁺.

3.3.2 Ensaio de inibição *SYBR green I* para estágio assexuado de *P. falciparum*

Os parasitos foram sincronizados através de tratamento com D-sorbitol 5% (m/v) estéril durante 10 minutos a 37 °C para enriquecimento dos parasitos em estágio de anel. As culturas de parasito foram peletizadas através de centrifugação a 600 × g por 5 minutos. As parasitemias das culturas celulares foram determinadas através de microscopia a partir da coloração de esfregaços de sangue com Giemsa 10% após a fixação com metanol. A parasitemia foi calculada a partir de 1.000 células, e as culturas foram diluídas a 0,5% de parasitemia e 2% de hematócrito através da adição de volumes apropriados de eritrócitos mantidos a um hematócrito de 50% em meio incompleto (meio de cultura sem Albumax II). Uma alíquota de 180 µL de parasitos foi distribuída em placas de 96 poços pré-preparadas com 20 µL de soluções de candidatos a antimaláricos 10x concentrados. Poços de controle negativo correspondentes a eritrócitos não parasitados e a cultivos de parasitos na ausência de antimaláricos foram montados paralelamente (Figura 9). As concentrações de DMSO foram mantidas sempre abaixo de 0,05%. As placas foram incubadas por 72 h a 37°C em uma incubadora umidificada com 5% de CO₂. Após incubação, o meio de cultura foi removido, as células foram ressuspensas com 100 µL de tampão PBS (NaCl 116 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 3 mM) e lisadas com 100 µL de tampão de lise (Tris-Base 20 mM, EDTA 5 mM, 0,0008% (v/v) Triton X-100, 0,008% (m/v) saponina, pH 8.0) adicionado de 0,002% (v/v) *SYBR green I*. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 30 min e a fluorescência correspondente à densidade de parasitos foi determinada usando-se um leitor de placas SpectraMAX Gemini EM (excitação a 485 nm e emissão a 535 nm). A concentração efetiva média (EC₅₀) foi determinada por análise de regressão não-linear da curva de crescimento concentração-resposta resultante usando-se o software *Origin 2016* (*OriginLab Corporation*).

Figura 9 - Esquemática de uma placa de testes para ensaio de inibição *SYBR green I*. A linha A corresponde aos controles positivo (à esquerda) e negativo (à direita) de crescimento parasitário. As linhas B a H correspondem à diluição seriada de cada composto analisado, onde a cada linha o composto tem sua concentração reduzida à metade da linha anterior.

Fonte: Elaborada pelo autor

3.3.3 Ensaios de combinação com artesunato

Foram testadas combinações de candidatos a antimaláricos com artesunato, um derivado de artemisinina, em razões molares fixas baseadas nos valores de EC_{50} individuais de cada composto. Os candidatos foram inicialmente combinados com o artesunato em uma razão 1:1 (em equivalentes de EC_{50}) para determinação do índice de combinação (do inglês, *combination index*, *CI*), calculado a partir da seguinte expressão:

$$CI = FIC_{50} \text{ candidato} + FIC_{50} \text{ artesunato} \\ = \frac{IC_{50} \text{ aparente do candidato}}{IC_{50} \text{ do candidato}} + \frac{IC_{50} \text{ aparente do artesunato}}{IC_{50} \text{ do artesunato}}$$

onde o valor de IC_{50} (concentração inibitória média) aparente é calculado como a concentração, na presença de um segundo composto, responsável por inibir 50% do crescimento do parasito. A rigor, $CI < 1$, $CI = 1$ e $CI > 1$ indicam, respectivamente, uma interação sinérgica, aditiva e antagônica.¹²⁹ Os candidatos

foram também combinados com o artesunato nas razões 1:4, 2:3, 3:2 e 4:1 para construção de um isoblograma, gráfico que representa os valores de IC₅₀ fracionais (FIC₅₀) do artesunato em função dos FIC₅₀ do candidato, indicando visualmente o caráter combinatório desses compostos.

3.3.4 Estudo do estágio de ação

O estágio de ação dos candidatos a antimaláricos foi verificado através da incubação dos parasitos altamente sincronizados em estágio de anel na presença de uma concentração de compostos 10 vezes maior que o valor de IC₅₀ determinado. Os parasitos foram então visualizados por microscopia através de esfregaços finos de sangue nos tempos 0, 8, 16, 24 e 36 h após a incubação.

3.4 Cultivo celular de células de hepatocarcinoma e avaliação de citotoxicidade

Células de hepatocarcinoma (HepG2) foram cultivadas em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino 10% (v/v) e penicilina/estreptomicina 0.2% (v/v). A adição de antibióticos ao meio foi feita visando-se eliminar potenciais interferências de contaminação microbiana. As células foram cultivadas a 37 °C e 5 % CO₂; o meio suplementado foi trocado a cada 2 ou 3 dias.

Para procedimentos experimentais, as células foram transferidas a uma placa de 96 poços a uma concentração de 10.000 células por poço, e incubadas a 37 °C por 24 h para adesão à placa. Procedeu-se à adição de uma diluição seriada dos candidatos a inibidores, com a primeira fileira da placa sendo mantida em ausência de inibidores, correspondendo ao controle positivo de crescimento. As concentrações de DMSO foram mantidas sempre abaixo de 2%. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C e 5 % de CO₂. Após incubação, a placa foi inspecionada por microscopia, para avaliação da maior concentração a ser considerada (ausência de precipitação do composto avaliado). A citotoxicidade foi avaliada em ensaio colorimétrico baseado na atividade metabólica celular na presença de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Brevemente, enzimas mitocondriais

são capazes de converter o corante MTT ao composto insolúvel formazan, de coloração roxa. Adicionou-se 20 µL de MTT a 5 mg/mL em cada poço da placa, seguido de 3 a 5 h de incubação a 37 °C. Após incubação, o sobrenadante foi removido, e os cristais de formazan foram solubilizados em 100 µL de DMSO. A absorbância proporcional à quantidade de células viáveis foi determinada no leitor de placas SpectraMAX Plus 384 ($\lambda = 570$ nm). A concentração letal média (MLC₅₀) foi determinada por análise de regressão não-linear da curva de crescimento concentração-resposta resultante usando-se o software *Origin 2016* (*OriginLab Corporation*).

3.5 HQSAR

As potências inibitórias dos 25 derivados de hidrazinobenzimidazol foram utilizadas na construção do modelo de HQSAR (do inglês, *hologram quantitative structure-activity relationship*). Para tanto, os valores de IC₅₀ foram convertidos em pIC₅₀ ($-\log(\text{IC}_{50})$, com valor de IC₅₀ expresso em M). Os compostos foram divididos em conjunto treinamento (19 compostos) e conjunto teste (6 compostos), garantindo que ambos tivessem representatividade estrutural e de atividade biológica. As estruturas moleculares foram obtidas utilizando-se o software ChemDraw Professional 15.1, e os modelos foram construídos utilizando-se o software SYBYL-X 2.1.1. As estruturas moleculares dos inibidores foram convertidas em fragmentos com tamanhos que variaram de 2-5, 3-6, 4-7, 5-8 e 6-9 átomos por fragmento. Todos os fragmentos foram alocados em comprimentos de holograma molecular definidos (53, 59, 61, 71, 83, 97, 151, 199, 257, 307, 353, 401, 449, 503, 547 *bins*) e a análise de distinção de fragmentos foi realizada em termos de átomos (A), ligações (B), conectividade (C), hidrogênios (H), quiralidade (Ch), e átomos doadores/aceptores de ligação de hidrogênio (DA). Diferentes combinações destes parâmetros foram consideradas durante a construção do modelo. Todos os modelos de HQSAR gerados no presente trabalho foram investigados utilizando-se o método de validação cruzada r^2 (q^2) baseado nas análises de regressões multivariadas pelo método de mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês, *partial least squares*).

4 RESULTADOS

4.1 Expressão e Purificação da Enolase

A expressão da *Pfeno* no vetor pETTrx-1a/LIC foi conduzida em 4 L de meio autoindutor, temperatura de expressão de 20 °C por 16 h. A purificação baseou-se em etapas cromatográficas sucessivas, sendo os objetivos para cada etapa: **i.** isolar a 6xHisTrx*Pfeno* do lisado proteico por afinidade; **ii.** substituir o tampão para aumentar eficiência da reação de digestão com a protease TEV; **iii.** isolar a *Pfeno* das remanescentes 6xHisTrx*Pfeno*, 6xHisTrx e TEV; **iv.** garantir a homogeneidade do estado oligomérico e conformacional. A Figura 10 apresenta o gel de poliacrilamida com as etapas de purificação indicadas, bem como o cromatograma de exclusão molecular.

O alto grau de pureza obtido pode ser constatado pela eluição com pico isolado, bem determinado e simétrico durante a etapa cromatográfica de exclusão molecular, bem como pela presença de uma banda única no gel de eletroforese desnaturante, no qual é possível visualizar a banda de ~ 50 kDa referente à *Pfeno* (tamanho esperado é de 48.6 kDa).

Figura 10 - (A) Gel SDS-PAGE referente às etapas de purificação da *Pfeno*. Da esquerda à direita: marcador de massa molecular; fração solúvel do lisado celular; fração insolúvel do lisado celular; pós 1ª afinidade; pós clivagem da cauda de Trx; pós 2ª afinidade; pós exclusão molecular. (B) Cromatograma de exclusão molecular referente à última etapa de purificação da *Pfeno*.

Fonte: Elaborada pelo autor

4.2 Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) das reações direta e reversa

A atividade enzimática da enzima *Pfeno* foi avaliada através de ensaio espectrofotométrico, no qual monitorou-se diretamente a formação de PEP a partir de 2PG. As curvas de formação (Figura 11A) ou consumo de PEP em função do tempo (Figura 11B) foram usadas para construção das curvas de velocidades iniciais (Figuras 11C e 11D), através das quais determinou-se o valor de K_M para o 2PG de $37 \pm 7 \mu\text{M}$ e para o PEP de $200 \pm 20 \mu\text{M}$, em concordância com a literatura.¹³⁰⁻¹³¹ Todos os dados de parâmetros cinéticos estão apresentados na Tabela 1.

Figura 11 - Estudos cinéticos da *Pfen*. (A) e (B) mostram a variação da absorbância a 240 nm devido, respectivamente, à formação e ao consumo de PEP; a inclinação inicial dessas curvas foi usada para a construção das curvas de Michaelis-Menten dos itens (C) e (D), que indicam os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} das reações direta e reversa catalisadas pela *Pfen*.

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 1 - Parâmetros cinéticos das reações direta e reversa catalisadas pela *Pfeno*. As medidas foram realizadas usando-se a enzima *Pfeno* a 20 nM.

	Reação direta 2PG Média $\pm$ SD	Reação reversa PEP Média $\pm$ SD
K_m (μ M)	37 ± 7	200 ± 20
V_{max} (nM/s)	430 ± 30	380 ± 20
k_{cat} (s^{-1})	21 ± 1	$18,0 \pm 0.8$
k_{cat}/K_m ($mM^{-1} s^{-1}$)	570 ± 80	90 ± 5

Dados apresentados na forma (média) $\pm$ (desvio padrão).
Fonte: Elaborada pelo autor

4.3 Inibidores de *Pfeno* identificados na coleção *Malaria Box*

A coleção *Malaria Box* foi cedido pelo MMV, e uma triagem contra a enzima *Pfeno* foi realizada na tese do Dr. Fernando Vasconcelos Maluf.¹²⁸ Os compostos que apresentaram inibição da atividade da *Pfeno* $> 60\%$ na concentração de 50μ M foram adquiridos da empresa Ambinter (<http://www.ambinter.com/>). Tendo em vista a necessidade de avaliação e comprovação da atividade *in vitro* dos compostos adquiridos, ensaios de inibição contra a atividade da enzima *Pfeno* foram conduzidos. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2 e na Figura 12. Os valores de IC_{50} variaram de 11 até 380μ M, além de compostos completamente inativos na maior concentração avaliada (1 mM).

Tabela 2 – Numeração, estrutura e massa molecular dos inibidores identificados na coleção *Malaria Box*.

#	Código	Estrutura	MM	IC ₅₀ (μ M) Média $\pm$ SD
01	MMV006172		368,5	225 $\pm$ 19
02	MMV665971		485,0	115 $\pm$ 8
03	MMV007224		470,2	11 $\pm$ 2
04	MMV666607		281,3	81 $\pm$ 1
05	MMV020439		459,6	> 1000
06	MMV665934		337,2	60 $\pm$ 2
07	MMV007574		413,6	17 $\pm$ 2
08	MMV085203		362,4	48 $\pm$ 4
09	MMV085583		592,7	> 1000

(continua)

(continuação)
Tabela 2 – Numeração, estrutura e massa molecular dos inibidores identificados na coleção *Malaria Box*.

#	Código	Estrutura	MM	IC ₅₀ (μ M) Média $\pm$ SD
10	MMV018984		278,3	135 $\pm$ 1
11	MMV019871		329,4	> 1000

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 12 - Curvas concentração-resposta contra a atividade da *Pfeno* para os *hits* identificados na coleção *Malaria Box* com valor de $\text{IC}_{50} < 1000 \mu\text{M}$. As curvas em preto e em vermelho se referem, respectivamente, ao primeiro e ao segundo experimento realizado para determinação da concentração inibitória média. Fonte: Elaborada pelo autor

4.3.1 Inibição do ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*

A confirmação da atividade inibitória *in vitro* dos compostos adquiridos foi realizada através de ensaios de inibição contra a forma intraeritrocítica de *P. falciparum* (cepa 3D7). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3 e na Figura 13. Os compostos apresentaram atividade inibitória *in vitro* bastante promissora contra o parasito. Os valores de EC₅₀ variaram de 0,005 a 1 µM, sendo o composto **8** (EC₅₀ = 5,6 ± 0,4 nM) o mais potente entre os compostos avaliados.

Tabela 3 - Valores de IC₅₀ determinados contra o estágio intraeritrocítico de *P. falciparum* dos inibidores de *Pfeno* como candidatos a compostos líderes.

#	Código	Estrutura	<i>P. falciparum</i> 3D7 EC ₅₀ (nM)* Média (Intervalo de confiança- 95%)
01	MMV006172		74 (72 – 76)
02	MMV665971		399 (393 – 405)
03	MMV007224		340 (290 – 390)
04	MMV666607		440 (360 – 520)

(continua)

(continuação)

Tabela 3 - Valores de IC₅₀ determinados contra o estágio intraeritrocítico de *P. falciparum* dos inibidores de Pfeno como candidatos a compostos líderes.

#	Código	Estrutura	<i>P. falciparum</i> 3D7 EC ₅₀ (nM)* Média (Intervalo de confiança- 95%)
05	MMV020439		250 (160 – 340)
06	MMV665934		1200 (500 – 1900)
07	MMV007574		1000 (800 – 1200)
08	MMV085203		5,6 (5,2 – 6,0)
09	MMV085583		170 (140 – 200)
10	MMV018984		850 (780 – 920)
11	MMV019871		1600 (1490 – 1710)

*Valor médio obtido a partir de dois experimentos independentes.

Dados apresentados na forma (média) | (intervalo de confiança de 95%).

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 13 - Curvas concentração-resposta contra *P. falciparum* (3D7) para os hits identificados na coleção Malaria Box. As curvas em preto e em vermelho se referem, respectivamente, ao primeiro e ao segundo experimento realizado para determinação da concentração inibitória média.

Fonte: Elaborada pelo autor

4.3.2 Estudo do estágio de ação

Com o objetivo de melhor caracterizar a atividade antiplasmodial dos compostos identificados na coleção *Malaria Box*, um estudo de avaliação de atividade sobre estágio de desenvolvimento dos parasitos foi realizado. Nesse experimento, culturas de *P. falciparum* foram incubadas na presença dos inibidores **1-11** na concentração 10x o valor de EC₅₀ contra o parasito. Em seguida, o desenvolvimento do parasito foi acompanhado por microscopia nos tempos 0, 8, 16, 24 e 36 h. Durante esse tempo, foi possível observar um ciclo completo de maturação das culturas na condição controle (DMSO), ou seja, desde a forma de anel, no início do período de incubação, até a forma de esquizontes, após 36 h de incubação (Figura 14, controle). Os compostos **1** e **2** induziram a formação de núcleos picnóticos (marcados pela condensação irreversível da cromatina de uma célula que sofre necrose ou apoptose, conferindo ao parasito uma forma pontual) após 16 h de incubação, indicando rápida ação do composto *in vitro*. Os compostos **3, 5, 7, 9, 10** e **11** retardaram o crescimento do parasito de modo que, após 36 h de incubação, estes ainda estavam na forma de anel. Os compostos **4, 6** e **8** foram menos eficazes no retardo do crescimento parasitário, sendo possível observar trofozoítos jovens após 36 h de incubação. Todos os compostos induziram um crescimento retardado em comparação ao controle, com destaque para os compostos **1** e **2** que induziram à formação de núcleos picnóticos já nas primeiras horas de desenvolvimento do parasito, indicando um processo de ação rápida para morte celular.

	0 h	8 h	16 h	24 h	36 h	Ação
Controle
1						Rápida
2						Rápida
3						Rápida
4						Lenta
5						Rápida
6						Lenta
7						Rápida
8						Lenta
9						Rápida
10						Rápida
11						Rápida

Figura 14 - Estudo do estágio de ação dos candidatos a antimaláricos. O controle corresponde ao crescimento parasitário na ausência de antimaláricos.

Fonte: Elaborada pelo autor

4.3.3 Citotoxicidade e Seletividade

A atividade citotóxica dos compostos selecionados foi determinada utilizando-se o valor MLC_{50} (correspondente à concentração necessária para reduzir à metade uma população padronizada de hepatócitos imortalizados - HepG2). A partir desta medida, foi calculado o índice de seletividade (SI, do inglês, *selectivity index*) dos compostos em estudo, correspondente à razão entre o MLC_{50} em hepatócitos e o EC_{50} em *P. falciparum* 3D7. Valores de SI > 10 indicam maior janela de segurança entre concentrações efetivas contra o parasito e concentrações letais à célula humana. Os compostos se mostraram extremamente seletivos, com índices de seletividade variando entre 50 e 38.000 (Tabela 4). Não foi possível determinar o MLC_{50} do composto **10**, pois este não foi solúvel nas condições do ensaio de citotoxicidade.

Tabela 4 - Valores de MLC_{50} e índices de seletividade determinados contra células de hepatocarcinoma (HepG2) para os candidatos a compostos líderes.

#	Código	Estrutura	MLC_{50} (μM)* Média (Intervalo de confiança - 95%)	SI Média (Intervalo de confiança - 95%)
01	MMV006172		19 (18 – 20)	260 (240 – 280)
02	MMV665971		20 (19 – 22)	51 (46 – 56)
03	MMV007224		65 (51 – 79)	190 (120 – 260)

(continua)

(continuação)

Tabela 4 - Valores de MLC_{50} e índices de seletividade determinados contra células de hepatocarcinoma (HepG2) para os candidatos a compostos líderes.

#	Código	Estrutura	MLC_{50} (μM)* Média (Intervalo de confiança - 95%)	SI Média (Intervalo de confiança - 95%)
04	MMV666607		> 400	> 740
05	MMV020439		300 (250 – 350)	1200 (600 – 1800)
06	MMV665934		> 200	> 65
07	MMV007574		> 100	> 77
08	MMV085203		> 200	> 33.000
09	MMV085583		> 200	> 960
10	MMV018984		-	-
11	MMV019871		> 400	> 230

*Valor médio obtido a partir de dois experimentos independentes
 Dados apresentados na forma (média) | (intervalo de confiança de 95%).

Fonte: Elaborada pelo autor

4.3.4 Ensaio de combinação com artesunato

Os inibidores de *Pfeno* provenientes da coleção *Malaria Box* foram avaliados em combinação com o antimalárico artesunato. O experimento foi realizado tendo em vista que, atualmente, terapias de primeira linha para o tratamento da malária são feitas em combinação com derivados da artemisinina. Além disso, estudos realizados com os compostos provenientes do *Malaria Box* ainda não avaliaram a possível interação destes compostos com o fármaco mais utilizado no tratamento da malária humana.¹³² Os índices de combinação estão apresentados na Tabela 5, e foram calculados conforme descrito na seção 3.2.3.

A Figura 15 apresenta os isobogramas dos candidatos a antimaláricos avaliados. A reta tracejada em vermelho indica a curva ideal de uma combinação aditiva. Pontos acima dessa reta indicam antagonismo, e pontos abaixo dessa reta indicam sinergismo. Como parâmetro de qualidade e reprodutibilidade dos isobogramas, foi calculada a área sob a curva (AUC) para cada um deles. O isobograma idealmente aditivo tem $AUC = 0,5$, de modo que $AUC > 0,5$ e $AUC < 0,5$ representam, respectivamente, comportamentos antagônico e sinérgico.

Em concordância com o caráter combinatório indicado pelo índice de combinação (Tabela 5), os compostos **2** e **9** apresentaram um perfil de isobograma tipicamente aditivo, indicando uma não-interferência no seu potencial inibitório em relação a terapias de combinação com o artesunato, sugerindo que estes compostos podem ser utilizados em associação com o antimalárico artesunato. Os demais compostos apresentaram perfil combinatório do tipo antagônico com o artesunato, com destaque para os compostos **1** e **4**, que mostraram um perfil mais acentuadamente antagônico.

Tabela 5 - Caráter combinatório dos candidatos a antimaláricos com relação ao artesunato. O parâmetro CI (índice de combinação) indica o caráter inibitório dos compostos, sendo que $CI < 1$, $CI \sim 1$ e $CI > 1$ indicam, respectivamente, combinações sinérgicas, aditivas e antagônicas. Da mesma forma, $AUC < 0.5$, $AUC = 0.5$ e $AUC > 0.5$ representam, respectivamente, combinações sinérgicas, aditivas e antagônicas.

#	Estrutura	CI Média (Intervalo de confiança - 95%)	AUC Média (Intervalo de confiança - 95%)	Caráter combinatório
01		1,9 (1,8 – 2,0)	1,5 (1,3 – 1,7)	Antagônico
02		1,0 (0,8 – 1,2)	0,47 (0,46 – 0,49)	Aditivo
03		1,3 (1,0 – 1,6)	0,81 (0,79 – 0,83)	Antagônico
04		1,7 (1,6 – 1,9)	1,0 (0,9 – 1,2)	Antagônico
05		1,3 (1,2 – 1,4)	0,83 (0,71 – 0,95)	Antagônico
06		1,3 (1,1 – 1,5)	0,94 (0,87 – 1,01)	Antagônico
07		1,2 (0,9 – 1,5)	0,83 (0,75 – 0,91)	Antagônico

(continua)

(continuação)

Tabela 5 - Caráter combinatório dos candidatos a antimaláricos com relação ao artesunato. O parâmetro CI (índice de combinação) indica o caráter inibitório dos compostos, sendo que $CI < 1$, $CI \sim 1$ e $CI > 1$ indicam, respectivamente, combinações sinérgicas, aditivas e antagônicas. Da mesma forma, $AUC < 0.5$, $AUC = 0.5$ e $AUC > 0.5$ representam, respectivamente, combinações sinérgicas, aditivas e antagônicas.

#	Estrutura	CI Média (Intervalo de confiança - 95%)	AUC Média (Intervalo de confiança - 95%)	Caráter combinatório
08		1,4 (1,3 – 1,5)	0,78 (0,76 – 0,80)	Antagônico
09		1,0 (0,8 – 1,2)	0,51 (0,46 – 0,56)	Aditivo
10		1,4 (1,4 – 1,5)	0,9 (0,6 – 1,2)	Antagônico
11		1,9 (1,8 – 2,0)	0,87 (0,86 – 0,89)	Antagônico

Dados apresentados na forma (média) | (intervalo de confiança de 95%).

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 15 - Isobogramas dos candidatos a antimaláricos testados. A reta tracejada indica caráter aditivo ideal.
Fonte: Elaborada pelo autor

4.4 Seleção, planejamento, síntese e atividade biológica de derivados

Os trabalhos de triagem de atividade inibitória frente a *Pfeno* e posterior caracterização da atividade antiplasmodial conduzidos na coleção *Malaria Box* indicou 8 classes de compostos promissoras para a investigação da relação estrutura-atividade (SAR). Diante disso, fez-se necessário o estabelecimento de critérios para seleção de uma classe prioritária para a síntese de derivados. Para tanto, os seguintes critérios foram estabelecidos:

- Valor de IC₅₀ contra a *Pfeno* < 100 µM
- Valor de EC₅₀ contra *P. falciparum* < 1 µM

- Valor de MLC₅₀ > 100 µM e SI > 300
- Ação lenta (diferente do artesunato)
- Caráter aditivo em combinação com artesunato
- Massa molecular < 350 Da
- Baixa complexidade e viabilidade de síntese de derivados

A Tabela 6 indica resumidamente as características dos compostos identificados como *hits* para estudos de SAR.

Tabela 6 - Resumo das características biológicas e químicas dos compostos investigados na coleção *Malaria Box*.

Composto	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
IC ₅₀ (µM)	225	115	11	81	>1000	60	17	48	>1000	135	>1000
EC ₅₀ (nM)	74	399	340	440	250	1200	1000	5,6	170	850	1600
MLC ₅₀ (µM)	19	20	65	>400	300	>200	>100	>200	>200	nd	>400
SI	260	51	190	>740	1200	>65	>77	>33000	>960	nd	>230
Estágio de ação	rápido	rápido	rápido	lento	rápido	lento	rápido	lento	rápido	rápido	rápido
Caráter combinatório	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Massa molecular	369	485	470	281	459	337	413	362	593	278	330
Síntese de derivados	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+

Adequação aos critérios: verde = adequado; laranja = inadequado

nd = não determinado

Fonte: Elaborada pelo autor

Com base nesses critérios, o composto **4**, um derivado hidrazinobenzimidazol, foi selecionado, pois apresentava sete dos oito critérios estabelecidos para a síntese de derivados e estudos iniciais de SAR. Para tanto, uma primeira série de 24 análogos foi planejada e sintetizada em colaboração com o Prof. Dr. Carlos Roque Duarte Correia e o doutorando Eric Francisco Simão do Instituto de Química da UNICAMP. O planejamento consistiu na investigação de *N*-substituintes do núcleo hidrazinobenzimidazol com características físico-químicas diversas (e.g., grupos

volumosos, aromáticos, doadores e aceptores de ligação de hidrogênio) tendo em vista o estabelecimento de SAR (Tabela 7).

Na primeira etapa reacional, o produto é formado através de uma reação de substituição nucleofílica provocada pelo ataque nucleofílico do par de elétrons livres do nitrogênio da hidrazina em um carbono sp^2 do 2-clorobenzimidazol (Figura 16, etapa i). O produto foi obtido em 75% de rendimento sem necessidade de purificações.

Na etapa reacional seguinte, a adição de nucleófilos em compostos carbonílicos é facilitada com o uso de ácidos como catalisadores. Assim que o par de elétrons do oxigênio se liga ao ácido de Brönsted, são formadas duas estruturas intermediárias em equilíbrio (Figura 16, etapa ii). Em ambas as estruturas, encontra-se um carbono sp^2 mais eletropositivo (mais reativo), o que facilita o ataque de nucleófilos como o 2-hidrazinilbenzimidazol. Após a adição da carbonila, ocorre um processo de transferência de próton, que pode ser mediado por qualquer espécie com caráter básico (solventes polares e/ou bases conjugadas) (Figura 16, etapas iii e iv). A formação da hidrazona correspondente é completada por uma reação de desidratação, mediada pela transferência intermolecular de elétrons não-ligantes do nitrogênio, levando à formação de outro intermediário denominado íon hidrazônio (Figura 16, etapa v), o qual sofre uma desprotonação por bases do meio reacional fornecendo as respectivas hidrazonas (Figura 16, etapa vi). A pureza dos compostos foi confirmada por ressonância magnética nuclear.

Figura 16 - Mecanismo para a formação de hidrazonas.
Fonte: Elaborada por Eric Francisco Simão (IQ-UNICAMP)

A Tabela 7 apresenta o *hit* selecionado (composto **4**) e os 24 derivados de hidrazinobenzimidazol. Primeiramente, determinou-se a % de inibição contra a atividade da *Pfeno* na concentração única de 200 μM para cada composto. Nessa triagem primária, somente os compostos **4**, **23** e **25** apresentaram atividade inibitória > 50 % e, portanto, tiveram o valor de IC_{50} determinado (Tabela 7 e Figura 18). Os valores de IC_{50} determinados indicam que os derivados planejados foram inibidores modesto da *Pfeno*, sendo o composto **4** ($\text{IC}_{50} = 44 \mu\text{M}$) o mais potente derivado desta série.

Em seguida, avaliou-se a atividade inibitória dos derivados de hidrazinobenzimidazol contra a forma intraeritrocítica de *P. falciparum* (cepa 3D7). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7 e Figura 19. Entre os 25 derivados sintetizados, nove (**4**, **13**, **16**, **19**, **22**, **23**, **25**, **32** e **33**) apresentaram atividade antiplasmodial na faixa submicromolar (valores de EC_{50} entre 0,19 e 0,90 μM), catorze (**14**, **15**, **17**, **18**, **20**, **21**, **24**, **26**, **28-31**, **34** e **35**) apresentaram modesta atividade antiplasmodial (valores de EC_{50} entre 1,3 e 9,0 μM) e dois (**12** e **27**) foram fracos inibidores do crescimento *in vitro* do parasito (valores de EC_{50} de 12 e 14 μM , respectivamente) (Tabela 7).

Os compostos mais potentes identificados contra a cepa 3D7 ($\text{EC}_{50} < 2 \mu\text{M}$) também tiveram sua potência inibitória determinada contra a cepa K1 de *P. falciparum* (resistente aos antimaláricos cloroquina, pirimetamina e sulfadoxina) (Tabela 7). A análise dos resultados indica boa correlação entre as atividades inibitórias contra ambas as cepas, ou seja, os compostos apresentaram valores de EC_{50} similares contra a cepa sensível (3D7) e resistente (K1) (Figura 17), indicando que estes são compostos ativos contra a cepa resistente. Além disso, tendo em vista a análise comparativa das resistências cruzadas, calculou-se a razão entre os valores de EC_{50} contra as cepas K1 e 3D7. Considera-se uma cepa resistente a determinado composto se o valor de EC_{50} deste contra a cepa em questão (K1) for, em média, 10 vezes maior quando comparado à cepa sensível (3D7). Essa análise possui natureza indicativa, abrangendo as menores variações de EC_{50} associadas a resistência clínica.¹³³ A razão EC_{50} (K1) / EC_{50} (3D7) variou de 0,4 a 3,2 para a série de compostos avaliada. Portanto, os dados sugerem que não há resistência cruzada fora dos limites de resistência considerados, ou seja, os derivados de hidrazinobenzimidazol atuam por um mecanismo de ação diferente daquele observado para os fármacos cloroquina, pirimetamina e sulfadoxina.

Figura 17 - Correlação entre os valores de pEC₅₀ dos derivados de hidrazinobenzimidazol contra as cepas sensível (3D7) e resistente (K1) de *P. falciparum*.

Fonte: Elaborada pelo autor

A citotoxicidade (MLC₅₀) e seletividade (SI) dos derivados de hidrazinobenzimidazol foram determinadas no ensaio padronizado com hepatócitos imortalizados (HepG2). A partir desta medida, foi calculado o índice de seletividade (SI) dos compostos em estudo, correspondente à razão entre os valores de MLC₅₀ em hepatócitos e EC₅₀ contra *P. falciparum* (cepa 3D7). Valores de SI > 10 indicam uma maior janela de segurança entre concentrações efetivas contra o parasito e concentrações letais à célula humana. Os dados de citotoxicidade obtidos para os derivados de hidrazinobenzimidazol sugerem que esta série é promissora para o desenvolvimento de novos compostos-líderes para a malária, pois a maioria dos compostos apresentou valores de SI > 10 (23 dos 25 derivados sintetizados), com destaque para os compostos **4**, **16**, **20-22**, **25**, **29**, **30**, **32** e **34**, que apresentaram SI > 100 (Tabela 7). Os derivados que apresentaram SI < 10 foram **17** (substituinte furanil, SI = 0,6) e **35** (substituinte piperidinil, SI = 2,3). Estes compostos foram fracos inibidores do crescimento *in vitro* do parasito (EC₅₀ = 7,0 e 1,6 μM, respectivamente), dados estes que explicam os baixos valores de SI observados.

Os dados obtidos do primeiro ciclo de síntese e avaliação da atividade inibitória indicaram que os derivados de hidrazinobenzimidazol foram inibidores fracos da *Pfeno*. Por outro lado, os compostos planejados apresentaram atividade *in vitro* bastante diversa contra o *P. falciparum*. Embora o composto mais potente identificado neste primeiro ciclo tenha sido o *hit* (**4**, $EC_{50} = 0,19 \mu M$), a distribuição de valores de inibição permitiu a identificação de características físico-químicas favoráveis e desfavoráveis para o aumento da potência inibitória *in vitro* contra o parasito. Por exemplo, a presença de um substituinte volumoso ao núcleo hidrazinobenzimidazol é favorável para a potência inibitória, pois a retirada deste substituinte determinou uma diminuição significativa na propriedade biológica (**12**, $EC_{50} = 13 \mu M$) em comparação ao *hit* (**4**, $EC_{50} = 0,19 \mu M$), enquanto a adição de um substituinte *t*-butil recuperou parcialmente a potência (**13**, $EC_{50} = 0,7 \mu M$). Grupos substituintes doadores e retiradores de elétrons ligados ao substituinte aromático também são cruciais para a capacidade inibitória do composto. Por exemplo, a remoção do grupo NO_2 (retirador de elétron) no *hit* determinou uma redução de, aproximadamente, 20 vezes na potência inibitória do derivado não substituído (**15**, $EC_{50} = 3,6 \mu M$). Por outro lado, a presença de outros grupos retiradores de elétrons como F (**21**, $EC_{50} = 1,3 \mu M$), Cl (**22**, $EC_{50} = 0,4 \mu M$), Br (**23**, $EC_{50} = 0,5 \mu M$) e CF_3 (**25**, $EC_{50} = 0,7 \mu M$) restaurou parcialmente a potência inibitória da série, sugerindo que substituintes com essa característica são favoráveis para o aumento da atividade inibitória. Dados adicionais de SAR corroboram essa observação. Por exemplo, os derivados substituídos com grupos doadores de elétrons como CH_3 (**20**, $EC_{50} = 1,3 \mu M$), OMe (**24**, $EC_{50} = 2,4 \mu M$), $N(CH_3)_2$ (**26**, $EC_{50} = 4,7 \mu M$), OH (**28**, $EC_{50} = 4,0 \mu M$), carbamato (**27**, $EC_{50} = 14 \mu M$), morfolino (**31**, $EC_{50} = 4,1 \mu M$) e piperazina (**32**, $EC_{50} = 0,9 \mu M$) apresentaram baixa potência inibitória. A mesma tendência de atividade biológica foi observada para os derivados dissustituídos **29** ($EC_{50} = 3,0 \mu M$) e **30** ($EC_{50} = 2,4 \mu M$) com grupos doadores de elétrons. A mudança do substituinte aromático por um heterociclo também foi investigada neste primeiro estudo de SAR. Os dados obtidos sugerem que heterociclos como piridina (**14**, $EC_{50} = 9,0 \mu M$), furano (**17**, $EC_{50} = 7,3 \mu M$) e tiofeno (**18**, $EC_{50} = 7,9 \mu M$) foram desfavoráveis para a atividade inibitória. Por outro lado, grupos heterocíclicos mais volumosos como 6-quinolina (**16**, $EC_{50} = 0,4 \mu M$) e 3-indol (**19**, $EC_{50} = 0,5 \mu M$) apresentaram potência similar ao *hit*.

Tabela 7 - Estrutura molecular e atividade inibitória dos derivados de hidrazinobenzimidazol

Composto	R	Pfeno	<i>P. falciparum</i> 3D7	<i>P. falciparum</i> K1	Citotoxicidade	
		IC ₅₀ (μM) Média (Intervalo de confiança – 95%)	EC ₅₀ (μM) Média (Intervalo de confiança – 95%)	EC ₅₀ (μM) Média (Intervalo de confiança – 95%)	MCL ₅₀ Média (Intervalo de confiança – 95%)	SI Média (Intervalo de confiança – 95%)
4 (hit)		44 (40 - 48)	0,19 (0,16 – 0,22)	0,38 (0,30 – 0,46)	> 100	> 380
12		> 200	13 (11 – 15)	-	> 400	> 29
13		> 200	0,7 (0,5 – 0,9)	1,0 (0,8 – 1,2)	8,0 (7,8 – 8,2)	11 (8 – 14)
14		> 200	9 (7-11)	-	> 400	> 34
15		> 200	3,6 (3,0 – 4,2)	-	> 400	> 92
16		> 200	0,4 (0,2 – 0,6)	0,15 (0,13 – 0,17)	> 100	> 130
17		> 200	7,3 (6,2 – 8,4)	-	42 (37 – 47)	5,8 (4,3 – 7,3)
18		> 200	7,9 (7,6 – 8,2)	-	> 400	> 48
19		> 200	0,5 (0,4 – 0,6)	1,6 (1,2 – 2,0)	31 (24 – 38)	60 (40 – 80)

(continua)

(continuação)

Tabela 7 - Estrutura molecular e atividade inibitória dos derivados de hidrazinobenzimidazol

Composto	R	Pfeno	<i>P. falciparum</i> 3D7	<i>P. falciparum</i> K1	Citotoxicidade	
		IC ₅₀ (μM) Média (Intervalo de confiança – 95%)	EC ₅₀ (μM) Média (Intervalo de confiança – 95%)	EC ₅₀ (μM) Média (Intervalo de confiança – 95%)	MCL ₅₀ Média (Intervalo de confiança – 95%)	SI Média (Intervalo de confiança – 95%)
20		> 200	1,3 (1,1 – 1,5)	2,4 (2,0 – 2,8)	> 200	> 130
21		> 200	1,3 (1,2 – 1,4)	1,7 (1,2 – 2,2)	> 200	> 140
22		> 200	0,4 (0,3 – 0,5)	0,6 (0,5 – 0,7)	> 100	> 200
23		120 (113 – 127)	0,5 (0,4 – 0,6)	0,4 (0,3 – 0,5)	65 (53 – 77)	130 (100 – 160)
24		> 200	2,4 (2,1 – 2,7)	-	> 200	> 72
25		111 (103 – 119)	0,7 (0,6 – 0,8)	0,8 (0,7 – 0,9)	> 100	> 130
26		> 200	4,7 (4,0 – 5,4)	-	300 (280 – 320)	64 (50 – 78)

(continua)

(continuação)

Tabela 7 - Estrutura molecular e atividade inibitória dos derivados de hidrazinobenzimidazol

Composto	R	Pfeno	<i>P. falciparum</i> 3D7	<i>P. falciparum</i> K1	Citotoxicidade	
		IC ₅₀ (μM) Média (Intervalo de confiança – 95%)	EC ₅₀ (μM) Média (Intervalo de confiança – 95%)	EC ₅₀ (μM) Média (Intervalo de confiança – 95%)	MCL ₅₀ Média (Intervalo de confiança – 95%)	SI Média (Intervalo de confiança – 95%)
27		> 200	14 (12 – 16)	-	300 (290 – 310)	21 (17 – 25)
28		> 200	4,0 (3,8 – 4,2)	-	> 400	> 95
29		> 200	3,0 (2,5 – 3,5)	-	> 400	> 111
30		> 200	2,4 (2,0 – 2,8)	-	> 400	> 138
31		> 200	4,1 (3,7 – 4,5)	-	85 (71 – 99)	21 (16 – 26)
32		> 200	0,9 (0,7 – 1,1)	0,5 (0,4 – 0,6)	180 (170 – 190)	200 (150 – 250)

(continua)

(continuação)

Tabela 7 - Estrutura molecular e atividade inibitória dos derivados de hidrazinobenzimidazol

Composto	R	Pfeno	<i>P. falciparum</i> 3D7	<i>P. falciparum</i> K1	Citotoxicidade
		IC ₅₀ (μM) Média (Intervalo de confiança – 95%)	EC ₅₀ (μM) Média (Intervalo de confiança – 95%)	EC ₅₀ (μM) Média (Intervalo de confiança – 95%)	MCL ₅₀ Média (Intervalo de confiança – 95%) SI Média (Intervalo de confiança – 95%)
33		> 200	0,8 (0,7 – 0,9)	0,5 (0,4 – 0,6)	34 (31 – 37) 45 (40 – 50)
34		> 200	2,4 (2,2 – 2,6)	-	> 400 > 160
35		> 200	1,6 (1,4 – 1,8)	1,2 (1,0 – 1,4)	3,7 (3,4 – 4,0) 2,3 (1,9 – 2,7)

*Valor médio obtido a partir de dois experimentos independentes

Dados apresentados na forma (média) | (intervalo de confiança de 95%).

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 18 - Curvas concentração-resposta contra a atividade da *Pfeno* para os três derivados de hidrazinobenzimidazol mais potentes. As curvas em preto e em vermelho se referem, respectivamente, ao primeiro e ao segundo experimento realizado para determinação da concentração inibitória média.

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 19 - Curvas concentração-resposta para os três derivados de hidrazinobenzimidazol mais potentes contra *P. falciparum* (3D7). As curvas em preto e em vermelho se referem, respectivamente, ao primeiro e ao segundo experimento realizado para determinação da concentração inibitória média.

Fonte: Elaborada pelo autor

4.4.1 HQSAR

O conjunto de dados de atividade biológica *in vitro* contra o parasito para os 25 derivados de hidrazinobenzimidazol apresenta uma distribuição homogênea ao longo de, aproximadamente, duas ordens de magnitude (pIC_{50} entre 4,6 e 6,7). Com base nesse conjunto de dados, estudos iniciais de relação quantitativa estrutura-atividade (QSAR) foram conduzidos visando-se obter um modelo preditivo para auxiliar a síntese de novos derivados com potência otimizada. Dessa forma, o conjunto de dados foi dividido em conjunto treinamento (19 compostos: **12-16**, **18-21**, **24**, **25**, **27-29**, **31-33** e **35**) e conjunto teste (6 compostos: **17**, **22**, **23**, **26**, **30** e **34**), de modo que ambos os subconjuntos fossem representativos do conjunto de dados (*i.e.*, representatividade estrutural e de atividade). Para isso, a distribuição de valores de pEC_{50} e a diversidade estrutural foi analisada através dos mapas de similaridade estrutural gerados pelo *software* SYBYL-X (Figura 20). A análise identificou quatro grupos de moléculas estruturalmente similares, dos quais os compostos representativos foram selecionados para compor os conjuntos treinamento e teste. A Figura 21 indica a representatividade em termos de potência e de similaridade estrutural para o conjunto de dados.

Figura 20 - Mapa de similaridade estrutural gerado pelo software SYBYL-X com base no descritor *UNITY Fingerprint*. Moléculas estruturalmente similares estão mais próximas neste mapa, e suas atividades são representadas pela cor (gradiente do azul, menos ativas, ao vermelho, mais ativas) e pelo tamanho (menores, menos ativas, e maiores, mais ativas) dos círculos. Foi realizada a divisão em quatro grandes grupos de similaridade, a fim de manter homogeneidade estrutural na divisão dos conjuntos.

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 21 - Representação gráfica da distribuição de pEC_{50} e de grupos estruturais para os conjuntos teste, treinamento e total, evidenciando a representatividade dos conjuntos de dados de derivados de hidrazinobenzimidazol.

Fonte: Elaborada pelo autor

O método de QSAR utilizado para a construção de modelos preditivos foi o holograma QSAR (HQSAR, do inglês, *hologram quantitative structure-activity relationship*).¹³⁴ Brevemente, HQSAR é um método de QSAR bidimensional que converte a estrutura molecular em notações lineares, ou seja, sequências numéricas que codificam a estrutura 2D das moléculas do conjunto de dados. Baseando-se no conceito central do QSAR de que a atividade biológica é função da estrutura molecular, é possível estabelecer relações quantitativas entre a atividade de uma série de moléculas a partir das informações codificadas nos descritores bidimensionais (*i.e.*, fragmentos das moléculas do conjunto de dados que são

codificados na forma de hologramas moleculares que contêm informações sobre o número, tamanho e distinção dos fragmentos). O desenvolvimento do modelo estatístico de HQSAR utiliza hologramas gerados como descritores que são relacionados com a propriedade-alvo através do método PLS. Uma vez determinado, o modelo de HQSAR pode ser utilizado para a predição da propriedade-alvo (valor de EC_{50}) de novas moléculas.

Os modelos iniciais foram construídos analisando-se diferentes combinações de distinção de fragmento. Nessa análise, foram considerados os comprimentos de holograma de 53, 59, 61, 71, 83, 97, 151, 199, 257, 307, 353, 401, 449, 503, 547, 601 e 647, mantendo-se o padrão de 4-7 átomos por fragmento. A Tabela 8 mostra os parâmetros de validação interna dos modelos iniciais para o conjunto treinamento de derivados de hidrazinobenzimidazol.

Tabela 8 - Parâmetros de validação interna dos modelos HQSAR iniciais para os candidatos a antimaláricos derivados de hidrazinobenzimidazol.

Modelo	Distinção de Fragmento	q^2	r^2	SEE	HL	N
1	A/B	0,18	0,63	0,35	71	2
2	A/B/C	0,22	0,99	0,06	71	6
3	A/C/DA	0,41	0,90	0,19	97	4
4	B/C/DA	0,29	0,74	0,45	71	3
5	B/H/DA	0,46	0,97	0,19	547	6
6	A/B/C/DA	0,48	0,97	0,12	53	5
7	A/B/Ch/DA	0,62	0,96	0,35	59	5
8	A/B/H/DA	0,44	0,89	0,22	59	6
9	A/C/H/Ch/DA	0,36	0,87	0,23	71	5
10	A/B/C/H/Ch/DA	0,04	0,86	0,24	547	5

Distinção de fragmento: A – átomo, B – ligação, C – conectividade, H – hidrogênio, Ch – quiralidade, DA – doadores e aceptores de ligação de hidrogênio; q^2 - coeficiente de correlação da validação cruzada; r^2 - coeficiente de correlação; SEE – erro padrão da correlação; HL – comprimento do holograma; N – número de componentes principais.

Fonte: Elaborada pelo autor

O modelo **7** (A/B/Ch/DA, $q^2 = 0,62$, $r^2 = 0,96$, SEE = 0,35) apresentou parâmetros estatísticos satisfatórios ($q^2 > 0.5$ e $r^2 > 0.6$).¹³⁵⁻¹³⁶ Porém, o erro padrão de correlação (SEE) mostrou-se mais alto que o ideal (SEE < 0,3). Para diminuir este erro, foi realizada uma busca de *outliers* no conjunto treinamento. Com a exclusão do composto **14**, todos os parâmetros estatísticos obedeceram aos critérios de parâmetros ideais ($q^2 = 0,70$, $r^2 = 0,97$, SEE = 0,12). Este modelo foi então usado como base para a otimização do tamanho dos fragmentos. Foram analisados os tamanhos de 2-5, 3-6, 4-7, 5-8 e 6-9. Os dados da Tabela 9 indicam que a alteração do tamanho de fragmento não influenciou na qualidade dos parâmetros estatísticos avaliados, portanto o melhor modelo obtido foi aquele que utilizou o tamanho padrão de 4-7 átomos por fragmento.

Tabela 9 - Análise do tamanho dos fragmentos sobre os parâmetros de validação interna dos modelos HQSAR dos derivados de hidrazinobenzimidazol.

Distinção de Fragmento	Tamanho do fragmento	q^2	r^2	SEE	HL	N
A/B/Ch/DA	2 – 5	0,52	0,90	0,20	53	4
	3 – 6	0,69	0,99	0,08	59	6
	4 – 7	0,70	0,97	0,12	59	5
	5 – 8	0,47	0,96	0,14	61	5
	6 - 9	0,46	0,93	0,17	307	4

Fonte: Elaborada pelo autor

A fim de evitar um sobreajuste dos dados no melhor modelo construído, foi analisada a influência de cada componente sobre o coeficiente de correlação da validação cruzada. Uma componente é considerada relevante se contribui com um aumento de pelo menos 10% no valor do parâmetro q^2 (que indica a capacidade preditiva interna do modelo). A análise dos dados da Tabela 10 indica que o número ótimo de componentes para esse modelo foi de $N = 4$.

Tabela 10 - Influência do número de componentes sobre os parâmetros de validação interna.

Distinção de Fragmento	N	q^2	r^2	SEE	HL
A/B/Ch/DA 4 – 7	5	0,70	0,97	0,12	59
	4	0,64	0,93	0,16	59
	3	0,47	0,88	0,21	59

Fonte: Elaborada pelo autor

O modelo HQSAR final construído com o conjunto de dados dos derivados de hidrazinobenzimidazol teve como parâmetros de distinção de fragmentos A/B/Ch/DA, tamanho de fragmento de 4-7, comprimento de holograma = 59, $N = 4$, $r^2 = 0,93$ e $q^2 = 0,64$. Para avaliar a real capacidade preditiva do modelo, foi calculado o valor de atividade predito para as moléculas do conjunto teste, as quais foram excluídas das etapas de construção do modelo. Esses valores, em conjunto com as atividades reais das moléculas do conjunto teste, foram usados no cálculo do parâmetro r^2_{pred} , que verifica a capacidade preditiva externa do modelo ao comparar as atividades reais e preditas. O melhor modelo construído apresentou valor de $r^2_{pred} = 0,56$, indicando capacidade satisfatória de predição para novas moléculas. A Figura 22 indica representação gráfica dos valores de pEC_{50} predito vs pEC_{50} experimental.

Figura 22 - Representação gráfica do pEC_{50} predito vs pEC_{50} experimental. Os pontos em preto representam os compostos do conjunto treinamento, e os pontos em vermelho representam os compostos do conjunto teste.

Fonte: Elaborada pelo autor

Com base na análise de SAR do primeiro ciclo de síntese e avaliação de atividade inibitória, oito novos derivados de hidrazinobenzimidazol foram planejados e tiveram suas atividades inibitórias *in vitro* preditas pelo melhor modelo HQSAR (Tabela 13).

4.4.2 Segundo ciclo sintético – atividade e toxicidade

Oito novos derivados de hidrazinobenzimidazol foram sintetizados (**36-43**), segundo a disponibilidade de reagentes do laboratório de síntese. Para esses novos derivados foram avaliadas as atividades antiplasmodial e citotóxica. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 14, e a comparação entre as atividades preditas pelo modelo HQSAR e os dados experimentais prospectivos estão apresentados na Figura 23. Os compostos **39**, **40** e **43** se mostraram menos ativos do que o esperado pelo modelo, devido à ausência de moléculas suficientemente semelhantes estruturalmente no conjunto treinamento. Contudo, nota-se que as diferenças entre a propriedade medida e a predita é menor que 10 vezes (*i.e.*, uma unidade logarítmica). A inclusão destas moléculas ao conjunto aumentará a capacidade preditiva do modelo. O composto mais potente predito pelo modelo HQSAR foi confirmado experimentalmente. O derivado **41** (substituinte quinolínico) apresentou valor de EC_{50} de 0,1 μ M (valor predito de 0,38 μ M) (Tabela 11), sendo aproximadamente duas vezes mais potente que o *hit* inicial (EC_{50} = 0,19 μ M). Este dado sugere que o modelo QSAR construído é útil para a predição de novos derivados com propriedade otimizada.

Os novos derivados também tiveram a atividade citotóxica avaliada em células HepG2. De modo geral, todos os compostos apresentaram excelentes valores de SI (> 13), com exceção do derivado **43**, que embora tenha apresentado potência inibitória na faixa submicromolar (EC_{50} = 0,6 μ M), também apresentou atividade citotóxica na faixa do baixo micromolar (MCL_{50} = 3 μ M), determinando um SI de 5, valor abaixo do mínimo considerado como aceitável de acordo com os critérios de seletividade exigidos para a classificação como um *hit* (SI > 10). Por outro lado, o derivado **41**, além de ser o composto mais potente desta série, foi também o mais seletivo (SI > 2.000) (Tabela 11).

Tabela 11 - Valores de EC₅₀ predito, EC₅₀ experimental, MLC₅₀ e Índice de seletividade determinados contra o estágio intraeritrocítico de *P. falciparum* do segundo ciclo de derivados de hidrazinobenzimidazol.

		<i>P. falciparum</i> 3D7		Citotoxicidade	
Composto	R	EC ₅₀ predito (μM)	EC ₅₀ (μM) experimental Média (Intervalo de confiança – 95%)	MCL ₅₀ Média (Intervalo de confiança – 95%)	SI Média (Intervalo de confiança – 95%)

36		1,96	2,3 (1,8 – 2,8)	> 200	> 68
37		5,57	4 (2 – 6)	> 200	> 25
38		0,513	1,5 (1 – 2)	> 200	> 90
39		0,314	1,0 (0,5 – 1,5)	> 200	> 100
40		1,39	1,7 (1,2 – 2,2)	> 200	> 90
41		0,384	0,10 0,9 – 0,11	> 200	> 1800
42		0,357	2,9 (2,6 – 3,2)	38 (36 – 40)	13 (11 – 15)
43		0,859	0,6 (0,3 – 0,9)	3 (2 – 4)	5 (1 – 9)

*Valor médio obtido a partir de dois experimentos independentes.
 Dados apresentados na forma (média) | (intervalo de confiança de 95%).
 Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 23 - Comparação entre a atividade inibitória prevista pelo modelo HQSAR e a atividade inibitória experimental. Os pontos em preto representam os compostos do conjunto treinamento, os pontos em vermelho representam os compostos do conjunto teste, e os pontos em azul representam os compostos do segundo ciclo de síntese.

Fonte: Elaborada pelo autor

5 DISCUSSÃO

Existem duas grandes abordagens no processo de desenvolvimento de fármacos: a abordagem baseada em alvo, que envolve a triagem de uma biblioteca de compostos contra uma proteína (alvo molecular), e a otimização de múltiplas propriedades destes compostos (e.g., potência, seletividade, atividade *in vitro* e propriedades farmacocinéticas). Há relativamente poucos alvos validados para a descoberta de novos fármacos para doenças infecciosas. Desse modo, a abordagem baseada em triagem fenotípica tem se mostrado como uma alternativa bastante atrativa para a descoberta de novos candidatos a fármacos. Essa estratégia tem a vantagem de identificar compostos ativos contra toda a célula, de modo que questões como a captação e o efluxo celular são avaliadas ainda na etapa de triagem.¹³⁷

Neste trabalho investigamos os compostos da coleção *Malaria Box*,¹²⁴ distribuída gratuitamente pela organização sem fins lucrativos *Medicine for Malaria Venture* (MMV), como inibidores da *Pfeno*, um alvo molecular atrativo para a descoberta de novos inibidores como antimaláricos.^{116–121} O resultado da triagem contra o alvo molecular identificou 11 compostos de diferentes classes químicas como inibidores da enzima ($EC_{50} = 11 - 1000 \mu M$) que também apresentaram promissora atividade inibitória *in vitro* contra o parasita ($EC_{50} = 5,6 - 1600 nM$) e alta seletividade ($SI = 51 - 33.000$).

Em seguida, avaliamos a atividade sobre estágio de desenvolvimento dos parasitos na presença desses compostos. Os dados obtidos indicaram que os compostos **1–3**, **5**, **7**, **9–11** apresentam rápida ação de inibição do crescimento *in vitro* do parasito (Figura 14), enquanto os compostos **4**, **6** e **8** inibiram o crescimento de forma lenta.

Com base nos dados de eficácia do ACT, um novo fármaco antimalárico será prioritariamente administrado em combinação com derivados de artemisinina ou alguns dos outros fármacos já utilizados para o tratamento da parasitose.¹³⁸ Diante disso, a avaliação do potencial combinatório dos 11 compostos identificados indicou que dois deles (compostos **2** e **9**) apresentaram um perfil tipicamente aditivo, indicando uma não-interferência no seu potencial inibitório em relação a terapias de combinação com o artesunato. Por outro lado, os demais compostos (**1**, **3–8**, **10** e

11) apresentaram perfil combinatório do tipo antagônico com o artesunato (Figura 15).

A ausência de correlação entre a atividade inibitória contra a *Pfeno* e a atividade antiplasmodial (Figura 25A), bem como a susceptibilidade do estágio de anel verificada pelo estudo do estágio de ação indicam que os compostos selecionados do *Malaria Box* não tenham a inibição da *Pfeno* como principal alvo de ação. Recentemente, estudos conduzidos com os compostos da coleção *Malaria Box* sugerem que os compostos **4** e **10** são inibidores da enzima histona-deacetilase e o composto **6** inibidor do complexo do citocromo bc1.¹³²

Levando em consideração os requisitos específicos da doença, o comitê coordenado pelo Fundo Global de Tecnologia Inovadora (GHIT) elaborou alguns critérios que *hits* e compostos líderes para a malária devem satisfazer.¹³⁹ Um *hit* validado deve apresentar alta potência em ensaio *in vitro* ($EC_{50} < 1 \mu M$) para cepas sensíveis e resistentes de *Plasmodium spp.*, bem como uma seletividade de pelo menos 10 vezes entre a concentração citotóxica média para uma linhagem celular mamífera e o EC_{50} para *Plasmodium spp.* Os compostos selecionados do *Malaria Box* e investigados neste trabalho são *hits* contra o *P. falciparum*, visto que 9 dentre os 11 apresentaram potência adequada, e todos se mostraram suficientemente seletivos.

Embora os dados de inibição da *Pfeno* não tenham sido promissores, os dados de inibição *in vitro* contra o parasita, estágio de ação e combinação com artesunato foram bastante interessantes. Baseado nesses resultados, estabelecemos um conjunto de critérios adicional para a seleção de um candidato para condução de estudos de SAR e otimização da potência biológica. Entre os critérios estabelecidos cita-se: características estruturais, atividade biológica, complexidade química e viabilidade de síntese de derivados. A aplicação desses critérios levou a seleção do composto **4** ($IC_{50} = 80 \mu M$ e $EC_{50} = 440 nM$) como candidato a estudos de SAR. Por fim, a baixa complexidade estrutural e facilidade de obtenção de derivados permitiu a síntese de uma quantidade significativa de análogos estruturais.

No primeiro ciclo de SAR, 25 derivados foram planejados, sintetizados e tiveram a atividade inibitória avaliada contra a enzima alvo e contra o parasito. Nessa etapa, confirmamos que os derivados hidrazinobenzimidazol foram inibidores fracos da enzima *Pfeno*, sendo o *hit* inicial, composto **4**, o inibidor que apresentou

menor valor de IC_{50} (44 μM). Simultaneamente, os derivados hidrazinobenzimidazol tiveram sua potência inibitória avaliada contra as cepas 3D7 e K1 de *P. falciparum*. A cepa K1 é caracterizada pela resistência aos antimaláricos cloroquina, pirimetamina e sulfadoxina. O mecanismo de ação proposto para o antimalárico cloroquina é relacionado ao impedindo da formação de cristais de hemozoína que mantém elevada a concentração de grupos heme livre, favorecendo um forte estresse oxidativo nas membranas do vacúolo digestivo do parasito que determina a morte.¹⁴⁰ Pirimetamina e sulfadoxina, por sua vez, inibem a ação de enzimas da via de folatos. A pirimetamina inibe a ação da enzima diidrofolato redutase,¹⁴¹ enquanto a sulfadoxina inibe a ação da enzima diidropteroato sintase.¹⁴² A inibição dessas enzimas bloqueia a síntese de purinas e pirimidinas no parasito, o que leva à falha da divisão nuclear durante a formação de esquizontes. O fato dos derivados de hidrazinobenzimidazol serem equipotentes frente à cepa sensível (3D7) e à cepa resistente (K1) sugere que essa série de compostos tem o potencial de combater o parasito mesmo em regiões onde a resistência a cloroquina, pirimetamina e sulfadoxina já é generalizada, como na África Subsaariana e no Sudeste Asiático (Figura 24).

Figura 24 - Mapa de resistência aos antimaláricos cloroquina, sulfadoxina-pirimetamina e mefloquina (2004).
Fonte: Adaptada de KORENROMP¹⁴³

Figura 25 - (A) Diagrama de correlação entre a potência inibitória dos hits identificados na coleção Malaria Box contra a atividade enzimática da *Pfeno* e contra o estágio intraeritrocítico do *P. falciparum*. (B) Diagrama de correlação entre a porcentagem de inibição dos derivados de hidrazinobenzimidazol contra a atividade enzimática da *Pfeno* a 200 μ M e a potência inibitória contra o estágio intraeritrocítico do *P. falciparum*.

Fonte: Elaborada pelo autor

Dentre os derivados de hidrazinobenzimidazol planejados e sintetizados, foram identificados compostos com atividade próxima à atividade do *hit* inicial (composto **4**, $EC_{50}^{3D7} = 0,19 \mu M$), que apresenta como substituinte um grupo nitrofenílico. Por exemplo, o composto **16** ($EC_{50}^{3D7} = 0,4 \mu M$), com potência comparável ao precursor da série, apresenta como substituinte um grupo 6-quinolínico. O ensaio de toxicidade realizado não foi capaz de distinguir a toxicidade de ambos os compostos (Figura 26). Porém, sabe-se que a redução enzimática do grupo nitro (Figura 27) pode levar à formação de três intermediários radicais-livres: o ânion nitro ($R-NO_2^{\cdot-}$), o hidronitróxido ($R-HNO^{\cdot}$) e o cátion amino ($R-NH_2^{+\cdot}$).¹⁴⁴ Radicais livres são capazes de se ligar covalentemente a macromoléculas, e grupos químicos capazes de gerar radicais livres como metabólitos são evitados no desenvolvimento de fármacos. Um outro metabólito da via de redução do grupo nitro é a hidroxilamina, composto altamente nucleofílico e reativo a moléculas negativamente carregadas, como o DNA.

O segundo ciclo de síntese, avaliação da inibição e SAR da série de hidrazinobenzimidazóis contou com o auxílio do modelo HQSAR construído com base nos derivados planejados no primeiro ciclo. O modelo construído possui consistência interna, parâmetros estatísticos satisfatórios e capacidade preditiva externa suficiente para ser utilizado no planejamento de novos derivados. Os

compostos planejados no segundo ciclo (**36–43**) tiveram a potência inibitória predita pelo modelo e confirmada experimentalmente (Tabela 11). Os dados obtidos demonstram a excelente correlação entre a atividade predita e real dos novos derivados, indicando que o modelo HQSAR é útil para o planejamento de novos derivados com propriedade otimizada.

Entre os derivados avaliados no segundo ciclo de SAR destacamos o composto **41** ($EC_{50}^{3D7} = 0,1 \mu M$), um derivado 2-quinolínico que apresentou potência aproximadamente duas vezes maior que o *hit* inicial e foi o mais seletivo ($SI > 1.800$) da série investigada neste trabalho. O potencial antimalárico deste substituinte é bastante conhecido, estando presente em antimaláricos como cloroquina, quinina e mefloquina.¹⁴⁵ O potencial antiplasmodial do substituinte quinolínico mostra-se bastante promissor para essa série, contudo faz-se necessário uma investigação detalhada de qual posição do substituinte é a mais favorável para o aumento da potência inibitória, pois observamos diferenças substanciais na atividade antiplasmodial dos derivados **16** (6-quinolina; $EC_{50}^{3D7} = 0,4 \mu M$), **41** (3-quinolina; $EC_{50}^{3D7} = 0,1 \mu M$) e **42** (2-quinolina; $EC_{50}^{3D7} = 2,9 \mu M$) durante os estudos de SAR.

De acordo com o comitê coordenado pelo Fundo Global de Tecnologia Inovadora (GHIT)¹³⁹, um composto líder deve apresentar valor de $EC_{50} < 100 \text{ nM}$, seletividade de pelo menos 100 vezes com relação a uma linhagem celular mamífera, bem como eficácia *in vivo*, erradicando 90% do patógeno alvo com uma dose menor que 50 mg/kg. Portanto, para a série de derivados de hidrazinobenzimidazol, faz-se necessário uma maior otimização da atividade inibitória *in vitro* bem como a avaliação da atividade *in vivo*.

Figura 26 - O derivado de hidrazinobenzimidazol **16** possui atividade antiplasmodial próxima à do composto que deu origem à série. Ambos não tiveram sua toxicidade diferenciada frente ao ensaio contra às células HepG2.

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 27 - Sequência de redução do grupo nitro até o grupo amino.

Fonte: Adaptada de MORENO¹⁴⁴

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os compostos inicialmente identificados como inibidores da atividade enzimática da *Pf*eno apresentaram valores de IC_{50} desde 10 μ M até maiores que 1000 μ M. Estes números, em contraste com a potência inibitória dos mesmos compostos contra o estágio intraeritrocítico do parasito, indicam que o alvo molecular principal para esta série de compostos possivelmente não seja a enzima *Pf*eno. A potência destes compostos em associação ao antimalárico artesunato também foi avaliada, se mostrando promissora para os compostos **2** e **9**, que apresentaram um caráter combinatório marcadamente aditivo. Através de técnicas microscópicas, foi possível avaliar o estágio de ação dos compostos do *Malaria Box*. Nesse ensaio, identificamos inibidores de modo de ação rápida e lenta. Um conjunto de oito critérios foi estabelecido para a seleção de candidatos a estudo de SAR. O composto **4**, derivado de hidrazinobenzimidazol, satisfaz sete deles e, por isso, foi selecionado para a síntese de análogos. Um total de 43 derivados de hidrazinobenzimidazol foi sintetizado, os quais tiveram as propriedades inibitórias avaliadas frente cepas sensível e resistente de *P. falciparum*, bem como a atividade citotóxica. Os derivados de hidrazinobenzimidazol não apresentaram inibição significativa da enzima *Pf*eno, mas por outro lado esses compostos apresentaram uma distribuição potência inibitória *in vitro* de duas ordens de magnitude entre o composto mais e menos potente. A diversidade química satisfatória e distribuição de atividade inibitória permitiram a aplicação de estudos de QSAR para a construção de modelos moleculares que auxiliasse no planejamento de novos derivados. Desse modo, construímos um modelo robusto e preditivo de HQSAR que foi então utilizado no planejamento e predição de atividade de novos derivados de hidrazinobenzimidazol. A atividade inibitória real dos análogos planejados apresentou boa correlação com a atividade predita pelo modelo HQSAR, indicando a utilidade do modelo para guiar a síntese de novos compostos com atividade inibitória otimizada. Entre os análogos obtidos, destaca-se o derivado 2-quinolínico, pois se mostrou o mais promissor até o momento, sendo duas vezes mais potente que o precursor da série, e mais de mil vezes mais seletivo para o em relação a uma célula de mamífero.

Novos ciclos de síntese, avaliação da atividade e SAR serão necessários para a obtenção de um conjunto de derivados hidrazinobenzimidazol potentes ($EC_{50} < 100 \mu M$) e seletivos ($SI > 100$). Esses compostos serão investigados em estudos *in vivo* para a avaliação do potencial de redução da parasitemia em modelo murino. Como base nesses resultados, teremos compostos líderes atrativos para o desenvolvimento de um novo candidato clínico para o tratamento da malária.

REFERÊNCIAS

- 1 TROUILLER, P. et al. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **Lancet**, v. 359, n. 9324, p. 2188–2194, 2002.
- 2 NWAKA, S.; RIDLEY, R. G. Science & society: Virtual drug discovery and development for neglected diseases through public–private partnerships. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 11, p. 919–928, 2003.
- 3 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The World health report: 2004: changing history.** Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42891/1/924156265X.pdf>>. Acesso em: 07 dez. 2017.
- 4 NWAKA, S. Drug discovery and beyond: the role of public-private partnerships in improving access to new malaria medicines. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 1, p. 20–29, 2005.
- 5 PINK, R. et al. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 9, p. 727–740, 2005.
- 6 BLEICHER, K. H. et al. A guide to drug discovery: hit and lead generation: beyond high-throughput screening. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 5, p. 369–378, 2003.
- 7 VENNERSTROM, J. L. et al. Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate. **Nature**, v. 430, n. 7002, p. 900–904, 2004.
- 8 ROSENTHAL, P. J. Antimalarial drug discovery: old and new approaches. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, pt 21, p. 3735–3744, 2003.
- 9 WITTY, M. J. Current strategies in the search for novel antiparasitic agents. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 95–103–104, 1999.
- 10 REMME, J. H. F. et al. Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 10, p. 421–426, 2002.
- 11 RIDLEY, R. G. Research on infectious diseases requires better coordination. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12s, p. s137–S140, 2004.
- 12 HORTON, J. Drug development for tropical diseases—present situation, future perspectives. **Trends in Parasitology**, v. 19, p. p06, 2003.
- 13 ÔMURA, S.; CRUMP, A. Timeline: the life and times of ivermectin — a success story. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 12, p. 984–989, 2004.
- 14 EYLES, D. E.; COLEMAN, N. Synergistic effect of sulfadiazine and daraprim against experimental toxoplasmosis in the mouse. **Antibiotics & Chemotherapy**, v. 3, n. 5, p. 483–490, 1953.
- 15 FIDOCK, D. A. et al. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound

screening. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 6, p. 509–520, 2004.

16 GELB, M. H. et al. Protein farnesyl and N-myristoyl transferases: piggy-back medicinal chemistry targets for the development of antitrypanosomatid and antimalarial therapeutics. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 126, n. 2, p. 155–163, 2003.

17 ANDREWS, K. T. et al. Anti-malarial effect of histone deacetylation inhibitors and mammalian tumour cytodifferentiating agents. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 6, p. 761–8, 2000.

18 GARDNER, M. J. et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 419, n. 6906, p. 498–511, 2002.

19 EL-SAYED, N. M. et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 404–409, 2005.

20 MITREVA, M. et al. Comparative genomics of nematodes. **Trends in Genetics**, v. 21, n. 10, p. 573–581, 2005.

21 JOACHIMIAK, M. P. et al. The impact of whole genome sequence data on drug discovery--a malaria case study. **Molecular Medicine**, v. 7, n. 10, p. 698–710, 2001.

22 JONES, A. K.; BUCKINGHAM, S. D.; SATTELLE, D. B. Model organisms: Chemistry-to-gene screens in *Caenorhabditis elegans*. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 4, p. 321–330, 2005.

23 BAJORATH, J. Integration of virtual and high-throughput screening. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 11, p. 882–894, 2002.

24 MACKEY, Z. B. et al. Discovery of trypanocidal compounds by whole cell HTS of *trypanosoma brucei*. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 67, n. 5, p. 355–363, 2006.

25 CHONG, C. R. et al. A clinical drug library screen identifies astemizole as an antimalarial agent. **Nature Chemical Biology**, v. 2, n. 8, p. 415–416, 2006.

26 LIPINSKI, C.; HOPKINS, A. Navigating chemical space for biology and medicine. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 855–861, 2004.

27 PAOLINI, G. V. et al. Global mapping of pharmacological space. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 805–815, 2006.

28 CLARK, D. E.; PICKETT, S. D. Computational methods for the prediction of 'drug-likeness'. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 2, p. 49–58, 2000.

29 YUVANIYAMA, J. et al. Insights into antifolate resistance from malarial DHFR-TS structures. **Nature Structural Biology**, v. 10, n. 5, p. 357–365, 2003.

30 KUO, M. R. et al. Targeting tuberculosis and malaria through inhibition of enoyl reductase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 23, p. 20851–20859, 2003.

- 31 BLUNDELL, T. L.; JHOTI, H.; ABELL, C. High-throughput crystallography for lead discovery in drug design. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 1, p. 45–54, 2002.
- 32 ANDERSON, A. C. The process of structure-based drug design. **Chemistry & Biology**, v. 10, n. 9, p. 787–97, 2003.
- 33 COS, P. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 106, n. 3, p. 290–302, 2006.
- 34 BRENK, R. et al. Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases. **ChemMedChem**, v. 3, n. 3, p. 435–44, 2008.
- 35 BUSH, K.; MACIELAG, M.; WEIDNER-WELLS, M. Taking inventory: antibacterial agents currently at or beyond phase 1. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 466–476, 2004.
- 36 OVERBYE, K.; BARRETT, J. Antibiotics: where did we go wrong? **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 1, p. 45–52, 2005.
- 37 GRIBBON, P.; ANDREAS, S. High-throughput drug discovery: what can we expect from HTS? **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 1, p. 17–22, 2005.
- 38 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2016**. Disponível em: < <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/252038/1/9789241511711-eng.pdf?ua=1>>. Acesso em: 07 dez. 2017.
- 39 PADILLA RODRÍGUEZ, J. C. et al. Epidemiology and control of malaria in Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, suppl 1, p. 114–122, 2011.
- 40 ANSTEY, N. M. et al. The pathophysiology of vivax malaria. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 5, p. 220–227, 2009.
- 41 LACERDA, M. V. G. et al. Postmortem characterization of patients with clinical diagnosis of plasmodium vivax malaria: to what extent does this parasite kill? **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 8, p. 67–74, 2012.
- 42 OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, v. 9, p. 115, 2010. doi: 10.1186/1475-2875-9-115.
- 43 ALVAREZ, A. Malaria and the emergence of rural health in Argentina: an analysis from the perspective of international interaction and co-operation. **Canadian Bulletin of Medical History**, v. 25, n. 1, p. 137–160, 2008.
- 44 CARTER, R.; MENDIS, K. N. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 4, p. 564–594, 2002.
- 45 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 2004** - changing history. 2004. Disponível em: < http://www.who.int/whr/2004/en/report04_en.pdf?ua=1>. Acesso em: 07 dez. 2017.

- 46 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2015**. 2016. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 07 dez. 2017.
- 47 BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Resumo epidemiológico (a partir de 2009) da Região Amazônica**. 2017. Disponível em: <<http://dw.saude.gov.br/gsid/servlet/mstrWeb;jsessionid=FFC912CF4D04A232359846A8684D9FDF?evt=2048001&hiddensections=header%2Cpath%2CdockTop%2CdockLeft%2Cfooter&documentID=14E492644341C29ABA6558AE733B6D5D&Server=srvbipdf03&Project=DMMalaria&>>. Acesso em: 07 dez. 2017.
- 48 SANTELLI, A. C. F. S. et al. **Plano de eliminação de malária no Brasil - fase 1**. 2016. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/janeiro/04/Plano-eliminacao-malaria-pub.pdf>>. Acesso em: 17 nov. 2017.
- 49 ACHAN, J. et al. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. **Malaria Journal**, v. 10, p. 144, 2011.
- 50 GREENWOOD, D. The quinine connection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 30, n. 4, p. 417–427, 1992.
- 51 FAURANT, C. From bark to weed: the history of artemisinin. **Parasite**, v. 18, n. 3, p. 215–218, 2011.
- 52 ENGWERDA, C. R. et al. Experimentally induced blood stage malaria infection as a tool for clinical research. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 11, p. 515–521, 2012.
- 53 MEDICINES FOR MALARIA VENTURE. **KAF156**. Disponível em: <<https://www.mmv.org/related-story-type/kaf156>>. Acesso em: 8 nov. 2017.
- 54 COTERÓN, J. M. M. et al. Falcipain inhibitors: optimization studies of the 2-pyrimidinecarbonitrile lead series. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 16, p. 6129–6152, 2010.
- 55 TRAPE, J. F. The public health impact of chloroquine resistance in Africa. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, n. 1–2 suppl, p. 12–7, 2001.
- 56 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Treatment of malaria: guidelines for clinicians (United States) 2015**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/clinicians2.html>. Acesso em: 1 jan. 2017).
- 57 WONGSRICHANALAI, C. et al. Epidemiology of drug-resistant malaria. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 4, p. 209–218, 2002.
- 58 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Susceptibility of Plasmodium falciparum to antimalarial drugs: report on global monitoring 1996-2004**. 2005. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43302/1/9241593466_eng.pdf>. Acesso em: 07 dez. 2017.

- 59 BOSMAN, A.; MENDIS, K. N. A major transition in malaria treatment: the adoption and deployment of artemisinin-based combination therapies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 6 suppl, p. 193–197, 2007.
- 60 NOEDL, H. et al. Evidence of artemisinin-resistant malaria in Western Cambodia. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 24, p. 2619–2620, 2008.
- 61 DONDORP, A. M. et al. Artemisinin resistance in *plasmodium falciparum* malaria. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 5, p. 455–467, 2009.
- 62 PHYO, A. P. et al. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. **Lancet**, v. 379, n. 9830, p. 1960–1966, 2012.
- 63 HERLEKAR, I. The resistance gene in malaria parasite identified. **Current Science**, v. 106, n. 3, p. 345, 2014.
- 64 MIOTTO, O. et al. Genetic architecture of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*. **Nature Genetics**, v. 47, n. 3, p. 226–234, 2015.
- 65 STRAIMER, J. et al. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. **Science**, v. 347, n. 6220, p. 428–431, 2015.
- 66 AMARATUNGA, C. et al. Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Pursat province, western Cambodia: a parasite clearance rate study. **Lancet Infectious Diseases**, v. 12, n. 11, p. 851–858, 2012.
- 67 WITKOWSKI, B. et al. Reduced artemisinin susceptibility of *plasmodium falciparum* ring stages in western Cambodia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 2, p. 914–923, 2013.
- 68 CARRARA, V. I. et al. Changes in the treatment responses to artesunate-mefloquine on the Northwestern Border of Thailand during 13 years of continuous deployment. **PLoS One**, v. 4, n. 2, p. e4551, 2009.
- 69 ARIEY, F. et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**, v. 505, n. 7481, p. 50–55, 2013.
- 70 WITKOWSKI, B. et al. Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies. **Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1043–1049, 2013.
- 71 BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_malaria.pdf>. Acesso em: 07 dez. 2017.
- 72 PACKARD, R. M. The Origins of Antimalarial-Drug Resistance. **The New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 5, p. 397–399, 2014.
- 73 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Emergency response to artemisinin resistance in the Greater Mekong subregion**: regional framework for action 2013-

2015. Disponível em:
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79940/1/9789241505321_eng.pdf?ua=1.
 Acesso em: 07 dez. 2017.

74 MENDIS, K. et al. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, n. 1–2 suppl., p. 97–106, 2001.

75 BOYD, M. F.; KITCHEN, S. F. The demonstration of sporozoites in human tissues. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. s1-19, n. 1, p. 27–31, 1939.

76 MATSUOKA, H. et al. A rodent malaria, *plasmodium berghei*, is experimentally transmitted to mice by merely probing of infective mosquito, *Anopheles stephensi*. **Parasitology International**, v. 51, n. 1, p. 17–23, 2002.

77 SIDJANSKI, S.; VANDERBERG, J. P. Delayed migration of *Plasmodium* sporozoites from the mosquito bite site to the blood. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, n. 4, p. 426–9, 1997.

78 VAUGHAN, A. M.; ALY, A. S. I.; KAPPE, S. H. I. Malaria parasite pre-erythrocytic stage infection: gliding and hiding. **Cell Host & Microbe**, v. 4, n. 3, p. 209–218, 2008.

79 STURM, A. et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, v. 313, n. 5791, p. 1287–1290, 2006.

80 TARUN, A. S. et al. Quantitative isolation and in vivo imaging of malaria parasite liver stages. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 12, p. 1283–1293, 2006.

81 BAER, K. et al. Release of hepatic *plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. **PLOS Pathogens**, v. 3, n. 11, p. e171, 2007.

82 SIBLEY, L. D. et al. Strategies for intracellular survival of microbes. **Clinical Infectious Diseases**, v. 1, p. 245–264, 1994.

83 PASVOL, G. Receptors on red cells for *Plasmodium falciparum* and their interaction with merozoites. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B**, v. 307, n. 1131, p. 189–200, 1984.

84 AGRE, P.; CARTRON, J. P. **Protein blood group antigens of the human red cell**: structure, function, and clinical significance. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1992. (The Johns Hopkins series in hematology/oncology)

85 HAYNES, J. D. Erythrocytes and malaria. **Current Opinions in Hematology**, v. 1, p. 79-89, 1993.

86 RYAN, J. R. et al. Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a duffy antigen negative population in Western Kenya. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 4, p. 575–581, 2006.

87 ROSENBERG, R. *Plasmodium vivax* in Africa: hidden in plain sight? **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 5, p. 193–196, 2007.

- 88 BANNISTER, L.; MITCHELL, G. The ins, outs and roundabouts of malaria. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 5, p. 209–13, 2003.
- 89 MILLER, L. H. et al. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 673–679, 2002.
- 90 FLANNERY, E. L.; CHATTERJEE, A. K.; WINZELER, E. A. Antimalarial drug discovery — approaches and progress towards new medicines. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 12, p. 849–862, 2013.
- 91 JENSEN, M. D.; CONLEY, M.; HELSTOWSKI, L. D. Culture of *Plasmodium falciparum*: the role of pH, glucose, and lactate. **Journal of Parasitology**, v. 69, n. 6, p. 1060–1067, 1983.
- 92 ROTH, E. *Plasmodium falciparum* carbohydrate metabolism: a connection between host cell and parasite. **Blood Cells**, v. 16, n. 2–3, p. 453–460, 1990.
- 93 GEARY, T. G. et al. Nutritional requirements of *Plasmodium falciparum* in culture. III. further observations on essential nutrients and antimetabolites. **Journal of Protozoology**, v. 32, n. 4, p. 608–13, 1985.
- 94 WOODROW, C. J.; BURCHMORE, R. J.; KRISHNA, S. Hexose permeation pathways in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 18, p. 9931–9936, 2000.
- 95 SCHEIBEL, L.; PFLAUM, W. . Carbohydrate metabolism in *Plasmodium knowlesi*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 4, p. 543–553, 1970.
- 96 SCHEIBEL, L. W.; MILLER, J. Glycolytic and cytochrome oxidase activity in Plasmodia. **Military Medicine**, v. 134, n. 10, p. 1074–80, 1969.
- 97 BOWMAN, I. B. et al. The metabolism of *Plasmodium berghei*, the malaria parasite of rodents. 2. an effect of mepacrine on the metabolism of glucose by the parasite separated from its host cell. **Biochemical Journal**, v. 78, n. 3, p. 472–8, 1961.
- 98 KRUNGKRAI, J. et al. Mitochondrial oxygen consumption in asexual and sexual blood stages of the human malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 30, n. 4, p. 636–42, 1999.
- 99 SCHEIBEL, L. W.; ASHTON, S. H.; TRAGER, W. *Plasmodium falciparum*: microaerophilic requirements in human red blood cells. **Experimental Parasitology**, v. 47, n. 3, p. 410–8, 1979.
- 100 FRY, M.; WEBB, E.; PUDNEY, M. Effect of mitochondrial inhibitors on adenosinetriphosphate levels in *Plasmodium falciparum*. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 96, n. 4, p. 775–782, 1990.
- 101 SLAVIC, K. et al. Life cycle studies of the hexose transporter of *Plasmodium* species and genetic validation of their essentiality. **Molecular Microbiology**, v. 75, n.

6, p. 1402–1413, 2010.

102 KIRK, K.; HORNER, H. A.; KIRK, J. Glucose uptake in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is an equilibrative not an active process. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 82, n. 2, p. 195–205, 1996.

103 BOZDECH, Z. et al. The Transcriptome of the Intraerythrocytic Developmental Cycle of *Plasmodium falciparum*. **PLOS Biology**, v. 1, n. 1, p. e5, 2003.

104 MÜLLER, I. B. et al. Secretion of an acid phosphatase provides a possible mechanism to acquire host nutrients by *Plasmodium falciparum*. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 677–691, 2010.

105 KANAANI, J.; GINSBURG, H. Metabolic interconnection between the human malarial parasite *Plasmodium falciparum* and its host erythrocyte. Regulation of ATP levels by means of an adenylate translocator and adenylate kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 6, p. 3194–3199, 1989.

106 ATAMNA, H.; GINSBURG, H. The malaria parasite supplies glutathione to its host cell--investigation of glutathione transport and metabolism in human erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. **European Journal of Biochemistry**, v. 250, n. 3, p. 670–679, 1997.

107 ALI, S. N., FLETCHER, K. A.; MAEGRAITH, B. G. 2: 3 diphosphoglycerate in *P. berghei*-infected blood. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 1, p. 8–9, 1971.

108 DESLAURIERS, R. et al. NMR studies of malaria. ^{31}P nuclear magnetic resonance of blood from mice infected with *Plasmodium berghei*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 721, n. 4, p. 449–57, 1982.

109 MEHTA, M., SONAWAT, H. M. & SHARMA, S. Malaria parasite-infected erythrocytes inhibit glucose utilization in uninfected red cells. **FEBS Letters**, v. 579, n. 27, p. 6151–6158, 2005.

110 ROTH, E. F. et al. The enzymes of the glycolytic pathway in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* malaria parasites. **Blood**, v. 72, n. 6, p. 1922–5, 1988.

111 VIVAS, L. et al. *Plasmodium falciparum*: Stage specific effects of a selective inhibitor of lactate dehydrogenase. **Experimental Parasitology**, v. 111, n. 2, p. 105–114, 2005.

112 ROBIEN, M. A. et al. Crystal structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* at 2.25 Å resolution reveals intriguing extra electron density in the active site. **Proteins: structure, function, and bioinformatics**, v. 62, n. 3, p. 570–577, 2005.

113 SATCHELL, J. F. et al. Structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*. **Acta Crystallographica D**, v. 61, n. 9, p. 1213–1221, 2005.

- 114 BRADY, R. L.; CAMERON, A. Structure-based approaches to the development of novel anti-malarials. **Current Drug Targets**, v. 5, n. 2, p. 137–49, 2004.
- 115 PARTHASARATHY, S. et al. Structure of the Plasmodium falciparum triosephosphate isomerase-phosphoglycolate complex in two crystal forms: characterization of catalytic loop open and closed conformations in the ligand-bound state. **Biochemistry**, v. 41, n. 44, p. 13178–88, 2002.
- 116 PAL-BHOWMICK, I. et al. Protective properties and surface localization of Plasmodium falciparum enolase. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 11, p. 5500–5508, 2007.
- 117 GHOSH, A. K. et al. From the Cover: Plasmodium ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 41, p. 17153–17158, 2011.
- 118 HERNÁNDEZ-ROMANO, J. et al. Conserved peptide sequences bind to actin and enolase on the surface of Plasmodium berghei ookinetes. **Parasitology**, v. 138, n. 11, p. 1341–1353, 2011.
- 119 VEGA-RODRIGUEZ, J. et al. Multiple pathways for Plasmodium ookinete invasion of the mosquito midgut. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 4, p. e492-500, 2014.
- 120 PAL BHOWMICK, I. et al. Plasmodium falciparum enolase: stage-specific expression and sub-cellular localization. **Malaria Journal**, v. 8, n. 179, p. 1–16, 2009.
- 121 PAL-BHOWMICK, I.; VORA, H. K.; JARORI, G. K. Sub-cellular localization and post-translational modifications of the Plasmodium yoelii enolase suggest moonlighting functions. **Malaria Journal**, v. 6, n. 1, p. 45, 2007.
- 122 NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. Lehninger principles of biochemistry. New York: W.H. Freeman, 2008.
- 123 MEDICINES FOR MALARIA VENTURE. **Our mission & vision**. Disponível em: <<https://www.mmv.org/about-us/our-mission-vision>>. Acesso em : 10 maio 2017.
- 124 SPANGENBERG, T. et al. The open access malaria box: a drug discovery catalyst for neglected diseases. **PLoS One**, v. 8, n. 6, 2013.
- 125 GAMO, F.-J. et al. Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. **Nature**, v. 465, n. 7296, p. 305–310, 2010.
- 126 PLOUFFE, D. et al. *In silico* activity profiling reveals the mechanism of action of antimalarials discovered in a high-throughput screen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 26, p. 9059–9064, 2008.
- 127 GUIGUEMDE, W. A. et al. Chemical genetics of Plasmodium falciparum. **Nature**, v. 465, n. 7296, p. 311–315, 2010.
- 128 MALUF, F. V. **Estudos estruturais e de química medicinal aplicados às**

enzimas da via glicolítica de protozoários: enolase de *Plasmodium falciparum* e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*. 2015. 135 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

129 CHOU, T. C.; TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 22, p. 27–55, 1984.

130 VORA, H. K. et al. Effect of deletion of a plant like pentapeptide insert on kinetic, structural and immunological properties of enolase from *Plasmodium falciparum*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 485, n. 2, p. 128–138, 2009.

131 PAL-BHOWMICK, I.; KRISHNAN, S.; JARORI, G. K. Differential susceptibility of *Plasmodium falciparum* versus yeast and mammalian enolases to dissociation into active monomers. **FEBS Journal**, v. 274, n. 8, p. 1932–1945, 2007.

132 VAN VOORHIS, W. C. et al. Open source drug discovery with the malaria box compound collection for neglected diseases and beyond. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 7, p. 1–23, 2016.

133 BASCO, L. K.; RINGWALD, P. Analysis of the Key pfcr1 point mutation and in vitro and in vivo response to Chloroquine in Yaoundé, Cameroon. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 12, p. 1828–1831, 2001.

134 LOWIS, D. R. HQSAR: A New Highly Predictive QSAR Technique. **Tripes Technical Notes**, v. 1, n. 5, 1997.

135 OPREA, T. I. 3D QSAR modeling in drug design. **Computational Medicinal Chemistry and Drug Discovery**, p. 571–616, 2004.

136 GOLBRAIKH, A. & TROPSHA, A. Beware of q²! **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 20, n. 4, p. 269–276, 2002.

137 MOFFAT, J. G. et al. Opportunities and challenges in phenotypic drug discovery: an industry perspective. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 8, p. 531–543, 2017.

138 NOSTEN, F. & BRASSEUR, P. Combination Therapy for Malaria. **Drugs**, v. 62, n. 9, p. 1315–1329, 2002.

139 KATSUNO, K. et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 751–758, 2015.

140 SCHWEDHELM, K. F. et al. Spin State of Chloroquine-Heme Complexes: Formation of a Hemin Tetramer Adduct. **Open Spectroscopy Journal**, v. 2, p. 10–18, 2008.

141 GATTON, M. L.; MARTIN, L. B.; CHENG, Q. Evolution of resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2116–2123, 2004.

142 SIBLEY, C. H. et al. Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 12, p. 582–588, 2001.

143 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2005**. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43213/1/9241593199_eng.pdf>. Acesso em: 07 dez. 2017.

144 MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R. Mechanism of Toxicity of nitro compounds used in the chemotherapy of trichomoniasis. **Environmental Health Perspectives**, v. 64, p. 199–208, 1985.

145 FOLEY, M.; TILLEY, L. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 79, n. 1, p. 55–87, 1998.