



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA

Renata Garcia Carneiro

Análise da interação dos metabólitos de *Plasmodium falciparum* com os fármacos diidroartemisinina e anterolano mediada por heme

Brasília
2016

Renata Garcia Carneiro

Análise da interação dos metabólitos de *Plasmodium falciparum* com os fármacos diidroartemisinina e anterolano mediada por heme

Monografia de conclusão de curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau

Co-orientador: Prof. Dr. Darren Creek

Brasília
2016

Carneiro, Renata G.

Análise da interação dos metabólitos de Plasmodium falciparum com os fármacos diidroartemisinina e anterolano mediada por heme / Renata G. Carneiro; orientador Sébastien Olivier Charnau; co-orientador Darren Creek. -- Brasília, 2016.

56 p.

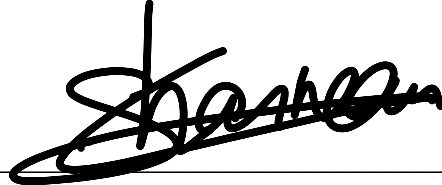
Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de Brasília, 2016.

1. malária. 2. Plasmodium falciparum. 3. metabolômica. 4. artemisinina. 5. OZ277. I. Olivier Charnau, Sébastien, orient. II. Creek, Darren, co orient. III. Título.

Renata Garcia Carneiro

Análise da interação dos metabólitos de *Plasmodium falciparum* com os fármacos diidroartemisinina e anterolano mediada por heme

BANCA EXAMINADORA



Orientador: Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau
(CEL/IB/Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Flávia da Silva Nader Motta
(FCE/Universidade de Brasília)

Profa. Visitante Dra. Aline Maria Araújo Martins
(FM/Universidade de Brasília)

Brasília
2016

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus pais, Jonas e Alcione, pelo exemplo de disciplina, força e humildade. Obrigada por me inspirarem a ser uma pessoa melhor a cada dia. A minha irmã Lorena, pelo companheirismo e por me ajudar em absolutamente tudo.

Ao meu orientador, Prof. Sébastien, pela dedicação, orientação e amizade desde quanto eu iniciei os projetos de iniciação científica. Os conhecimentos que ele me forneceu foram de grande valia para meu desenvolvimento pessoal e profissional. Agradeço por sempre me motivar a buscar soluções e a trabalhar com prazer e empolgação.

Ao meu co-orientador, Prof. Darren, pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório e principalmente pelo exemplo de pessoa e pesquisador que ele significa pra mim. Gostaria de agradecer o enorme apoio durante o desenvolvimento desse trabalho, os conhecimentos fornecidos e principalmente a gentileza com que fui recebida em seu laboratório.

À Anna Sexton pela amizade, por pacientemente me ensinar a realizar os experimentos e por ser um exemplo de organização e disciplina. Gostaria de agradecer o Carlo, por me ajudar a analisar os dados e pelas discussões científicas que tanto contribuíram para o meu trabalho. Gostaria de agradecer também aos outros membros do CreekLab, Katherine e Daniel por me ajudarem sempre que eu precisava e pela agradável convivência durante meu estágio em Melbourne.

À Thuany por me ensinar a cultivar o parasito e principalmente pelo carinho e amizade. Gostaria de agradecer aos outros membros do Grupo de Pesquisa da Malária Caroll, Carlos e Luz Helena e a todos os membros do LBQP que me ajudavam prontamente sempre que eu precisava e pelo agradável convívio.

Gostaria de agradecer ao Governo Federal e a Capes pela oportunidade de intercâmbio pelo Programa Ciência Sem Fronteiras.

Aos meus amigos Belly e Thales pelo apoio em momentos de aperto durante o estágio.

A todos que não estão presentes nestas linhas, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Nada se consegue sem esforço
próprio e sem uma dedicação à prova
de fraquezas”- Carlos Bernardo
González Pecoche

RESUMO

A malária causa significativa morbi-mortalidade e o *Plasmodium falciparum* é considerado a espécie mais virulenta por ser o responsável pela maioria dos casos de morte pela doença. Apesar de conhecida a eficácia da artemisinina e dos ozonídeos no tratamento da malária, os seus mecanismos de ação ainda não foram totalmente elucidados. Essas drogas têm em comum uma ligação endoperoxídica que é bioativada por clivagem redutiva mediada pelo grupo heme para formar radicais centrados em átomos de carbono capazes de alquilar componentes essenciais do parasito. A fim de orientar a otimização dos fármacos e a formulação de estratégias para contornar os mecanismos de resistência, um conhecimento mais abrangente do mecanismo de ação dos endoperoxídeos é essencial. Portanto, o objetivo desse trabalho é avaliar a interação dos fármacos OZ277 e diidroartemesinina (*dihydroartemesinin* - DHA), após bioativação, com o metaboloma extraído de *P. falciparum*. Extratos celulares foram obtidos, a partir de uma cultura celular, de um total de 1×10^8 glóbulos vermelhos (com 5% de parasitemia) lisados em solução de 60% Metanol/20% Clorofórmio/20% Água. Os extratos foram incubados por 2 horas com 0,03 mM de OZ277/DHA, 1 mM de hematina e 5 mM de ditionado de sódio, em paralelo com os controles sem as drogas. As amostras foram analisadas pela coluna ZIC-pHILIC acoplada ao espectrômetro de massa híbrido Quadrupolo-Orbitrap Q-Exactive™ e o *software* Ideom foi utilizado para a análise estatística dos dados. Adutos de L-isoleucil-L-prolina e de heme com radicais do OZ277 foram detectados. O anterolano demonstrou uma interação mais abrangente com o sistema antioxidante baseado em glutatona comparado à DHA. As concentrações de três importantes poliaminas (espermidina, putrescina e ornitina) foram diminuídas pela reação com a diidroartemesinina. Ambas as drogas apresentaram interação com peptídeos. Esse estudo forneceu um panorama acerca dos metabólitos que possuem maior potencial para serem alquilados pela DHA e pelo OZ277. As vias metabólicas afetadas nesse trabalho devem ser objeto de estudos metabolômicos direcionados a fim de confirmar a interação e avaliar as consequências para o parasito. Além disso, os adutos detectados nesse estudo devem ter sua estrutura confirmada por análises químicas mais detalhadas.

Palavras chaves: malária, *Plasmodium falciparum*, metabolômica, artemisinina, OZ277.

ABSTRACT

Malaria causes a significant mortality and *Plasmodium falciparum* is considered the most virulent specie, since it is responsible for the majority of deaths caused by this disease. In spite of the known potency of artemisinin derivatives and synthetic peroxides against malaria, the mechanism of action has not been fully elucidated. Those drugs have in common a peroxide bond that can suffer a reductive cleavage by heme, forming carbon centered radicals capable to alkylate vital cellular components. A better understanding of the mode of action of the peroxides antimalarials will aid our ability to optimize current treatment strategies and overcome drug resistance. Thus, the aim of this study is to analyse the heme mediated interaction between *P. falciparum* metabolites extract with OZ277 and dihydroartemisinin (DHA). An amount of 10^8 cells containing 5% infected red blood cells had their metabolites extracted by using 60%Methanol/20%Chloroform/20%Water solution. Extracts were incubated with 0.03 mM of OZ277/DHA, 1 mM of hematin and 5 mM of sodium dithionite for 2 hours and a control without the drug was carried out in parallel. Samples were analysed on a Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer coupled with ZIC-pHILIC column and data analysis was performed by IDEOM software. It was detected OZ277 adduct with L-isoleucyl-L-proline and heme. OZ277 demonstrated a stronger interaction with Glutathione antioxidant system compared with DHA. Three polyamines (spermidine, orthidine and putrecine) decreased in the samples by reacting with DHA. Both drugs interacted with peptides. This data provides evidences that a wide range of metabolites could be targeted by DHA and OZ277 in *Plasmodium falciparum*. It would be beneficial performs chemical analysis; in order to confirm molecular structure of adducts detected, and targeted studies, to evaluate the consequences of disturbance on these metabolic pathways.

Keywords: malaria, *Plasmodium falciparum*, metabolomics, artemisinin, OZ277.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática do ciclo de vida do <i>Plasmodium spp</i> , no mosquito e no ser humano (Centers for Disease Control and Prevention, CDC).....	11
Figura 2: Representação da estrutura da artemisinina e de alguns dos seus derivados semi-sintéticos usados na terapêutica da malária [Adaptado de (KUMAR; MAHAJAN; CHIBALE, 2009)].	14
Figura 3: Esquema representativo do mecanismo de bioativação da artemisinina que envolve a formação de radicais centrados em carbonos primários e secundários, após clivagem redutiva mediada por Fe^{2+} [Adaptado de (NEILL; BARTON; WARD, 2010)].....	16
Figura 4: Esquema representativo do mecanismo de alquilação do grupo Heme pela ART. O radical pode se ligar em qualquer uma das posições meso do anel porfirínico: β , α , δ e γ . [Adaptado de (ROBERT; COPPEL; MEUNIER, 2002a; ROBERT; COPPEL; MEUNIER, 2002b)].	17
Figura 5: Representação da estrutura do aduto formado pela alquilação da glutationa por radicais de ART (WANG; WU, 2000).....	19
Figura 6: Estrutura geral dos 1,2,4-trioxolanos [Adaptado de (DONG <i>et al.</i> , 2006)].	21
Figura 7: Representação da estrutura do OZ277 e do OZ439 [Adaptado de (VENNERTSTROM <i>et al.</i> , 2004;PHYO <i>et al.</i> , 2015)]	22
Figura 8: Representação dos mecanismos de bioativação do OZ277 por Fe^{2+} Esses radicais podem também reagir com oxigênio e formar os seguintes produtos de degradação: ceto-ácido (3), adamantano- lactona (4) e 4-ciclohexanona (5) (CREEK <i>et al.</i> , 2007).	23
Figura 9: Esquema representativo do mecanismo de alquilação do grupo heme pelos ozonídeos. O radical pode ligar-se em qualquer uma das posições meso do anel porfirínico: β , α , δ e γ (CREEK <i>et al.</i> , 2008).	23
Figura 10: Esquema representativo do desenho experimental desenvolvido nesse estudo contendo as fases: cultura do parasito, extração dos metabólitos, preparo das amostras, análise por espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida e análise de dados.....	29
Figura 11: Representação Volcano plot da comparação entre a amostra tratada com OZ277 e os controles quanto ao <i>fold change</i> dos metabólitos <i>versus</i> o valor de significância calculado pelo <i>software</i> Ideom por meio do Teste T. Os compostos (a) e (b) correspondem aos produtos finais da degradação da droga, respectivamente, adamantano-lactona e ceto-ácido. Os valores de massas identificados correspondem a picos detectados exclusivamente nas amostras, com massas superiores a da droga e valor de significância $p \leq 0,05$	31
Figura 12: Representação gráfica dos metabólitos que apresentaram decaimento $\geq 40\%$ nos extratos tratados com OZ277 em relação aos controles e que obtiveram um valor de significância por teste T $\leq 0,05$	32

- Figura 13:** Representação gráfica da comparação da abundância relativa do grupo heme nas amostras que reagiram com OZ277 (S) em relação aos controles (C). Os valores foram plotados juntamente com seus respectivos valores de desvio padrão. 34
- Figura 14:** Representação gráfica da abundância relativa do aduto Heme-OZ277 nas amostras que reagiram com o OZ277 (S), nos controles (C) e nas amostras de controle de qualidade (QC). Os valores foram plotados juntamente com seus respectivos valores de desvio padrão.....34
- Figura 15:** Comparação da abundância relativa do peptídeo L-isoleucil-L-prolina nas amostras tratadas com o OZ277 (S) em relação aos controles (C). Os valores foram plotados juntamente com seus respectivos valores de desvio padrão.....35
- Figura 16:** Abundância relativa do aduto L-isoleucil-L-prolina -OZ277 nas amostras tratadas com a droga (S), nos controles (C) e nas amostras de controle de qualidade (QC). Os valores foram plotados juntamente com seus respectivos valores de desvio padrão.....36
- Figura 17:** Representação Volcano plot da comparação entre a amostra tratada com DHA e os controles quanto ao fold change dos metabólitos versus o valor de significância calculado pelo Software Ideom através do Teste T. Os valores de massas identificados correspondem a picos detectados exclusivamente nas amostras tratadas com OZ277 que apresentaram massas superiores a da droga e valor de significância $p \leq 0,05$37
- Figura 18:** *Fold change* plot dos metabólitos que apresentaram decaimento $\geq 40\%$ nos extratos tratados com DHA em relação aos controles e que obtiveram um valor de significância por *t-test* $\leq 0,05$ 39
- Figura 19:** Fluoxugrama ilustrativo do metabolismo das poliaminas em *P. falciparum*. As enzimas representadas são: ornitina descarboxilase (ODC), S-adenosilmetionina (AdoMet), AdoMet descarboxilase (AdoMetDC), espermidina sintetase (SPDS), arginina descarboxilase (ARG), tiorredoxina redutase (TxrR), ornitina amino transferase (OAT), glutamato-5-semialdeídodesidrogenase (GSDG) [Adaptado de (HAIDER *et al.*, 2005)]..... 41

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem
®	marca registrada
°C	graus Celsius
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual
μL	microlitros
μM	micromolar
μm	micrometros
ACT	<i>Artemisinin Combination Therapies</i>
AdoMetDC	AdoMet descarboxilase
ART	artemisinina
CAPS	<i>3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid</i>
CHAPS	<i>3-[(3-cholamido-propyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i>
CO₂	gás carbônico
Da	daltons
DHA	diidroartemisinina
DHFR	diidrofolato redutase
DHPS	diidropteroato sintase
EGT	ergotioneina
Exp-1	<i>Exported Protein-1</i>
Fe²⁺	ferro
g/v	grama/volume
GR	glutaciona redutase
GSH	glutaciona
GSSG	glutaciona dimerizada
Hb	hemoglobina
HEPES	<i>2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid</i>
K13	<i>Kelch 13</i>

Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
KLHL8	<i>Kelch-like protein 8</i>
kV	quilovolt
V	volt
Milli-Q	água deionizada
min	minutos
mL	mililitros
mm	milímetros
mM	milimolar
N₂	gás nitrogênio
NaCl	cloreto de sódio
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotidephosphate
Nrf2	<i>Nuclear factor 2</i>
O₂	gás oxigênio
OAT	ornitina amino transferase
ODC	ornitina descarboxilase
OMS	Organização Mundial da Saúde
OZ277	anterolano
OZ439	artefenomel
PBS	solução tampão fosfato-salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
ppm	partes por milhão
PfATP6	bomba de cálcio dependente de ATP de <i>Plasmodium falciparum</i>
PfCRT	<i>Plasmodium falciparum</i> chloroquine resistance transporter
PfMDR1	<i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistance 1
PfMRP	<i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistance-associated protein
PfPI3K	<i>Plasmodium falciparum</i> phosphatidylinositol-3 kinase
PI	fosfatidilinositol
PI3P	fosfatidilinositol-3-fosfato
PIPES	<i>Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)</i>
QC	amostra de controle de qualidade
RNM	Ressonância Nuclear Magnética

ROS	espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
TRIS	<i>2-dimethylaminoethyl</i>
TrxR	thioredoxina redutase
xg	<i>times gravity</i>
ZIC-pHILIC	<i>Zwitterionic Stationary Phase Covalently for Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i>

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	v
SUMÁRIO	viii
1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Malária	10
1.2 Ciclo de vida do parasito	10
1.3 Métodos de prevenção tradicionais	12
1.4 Artemisinina	13
1.4.1 Mecanismo de ação da artemisinina	15
1.3.2 Mecanismo de resistência à artemisinina	20
1.5 Trioxolanos	21
2 JUSTIFICATIVA	24
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivos gerais	24
3.2 Objetivos específicos	25
4. METODOLOGIA	26
4.1 Cultura <i>in vitro</i> de <i>Plasmodium falciparum</i>	26
4.2 Extração dos metabólitos	26
4.3Preparação das amostras	27
4.4 Espectrometria de massas	27
2.5 Análise de dados	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Interação dos metabólitos com o OZ277 mediada por Heme	30
5.1.1 Alteração nas concentrações dos metabólitos	30
5.1.2 Formação de adutos.....	33
5.2 Interação dos metabólitos com o DHA mediada por Heme	36

5.2.1 Alteração nas concentrações dos metabólitos	36
5.2.2 Formação de adutos	41
6 CONCLUSÃO.....	42
7 REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária

A Malária é a uma doença infecciosa causada por protozoários, do gênero *Plasmodium*, e transmitida pela picada do mosquito fêmea, do gênero *Anopheles*. Essa protozoose é considerada uma das mais agressivas, devido aos seus altos níveis de morbi-mortalidade e ao grande impacto econômico causado, principalmente, nos países subdesenvolvidos em áreas subtropicais e tropicais do mundo (WHITE *et al.*, 2014). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 214 milhões de casos foram reportados em 2015; 480.000 deles vieram a óbito. Estima-se que os gastos com malária retardam o crescimento econômico anual em 1,3% nas áreas endêmicas. Visto que, o custo econômico é contabilizado, somente na África, em US\$ 12 bilhões por ano (WHO, 2015). No Brasil, foram registrados 143.549 casos de malária em 2014; e 99.5% dessas ocorrências se deram na região da Amazônia Legal Brasileira (BRASIL, 2013).

As cinco espécies capazes de infectar o ser humano são: *Plasmodium falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. vivax* e *P. knowlesi*. O *P. vivax* e o *P. falciparum* são os mais incidentes, sendo esse último o responsável pela forma mais severa da doença: a malária cerebral.

De forma simplificada, o quadro clínico da doença pode ser dividido em: malária não complicada e malária complicada ou severa. Os primeiros sintomas aparecem sete dias após a inoculação do parasita e geralmente são febres, cefaléias, vômitos, tremores e mal estar. Se não tratada, a doença pode evoluir para condições mais severas, que envolvem complicações tais como malária cerebral, insuficiência renal, edema pulmonar e anemia grave (WHITE *et al.*, 2014). Os principais grupos de risco para o desenvolvimento da malária complicada são crianças com até cinco anos, que contabilizaram 78% das mortes na África, e gestantes, cujo agravamento da doença pode levar a distúrbios no feto e complicações na gravidez (WHO, 2015).

1.2 Ciclo de vida do parasito

O ciclo de vida do *Plasmodium spp* envolve uma fase sexuada no hospedeiro definitivo (o mosquito) e duas fases assexuadas no hospedeiro humano (o ciclo hepático e o ciclo intra-eritrocitário), como ilustrado na figura 1.

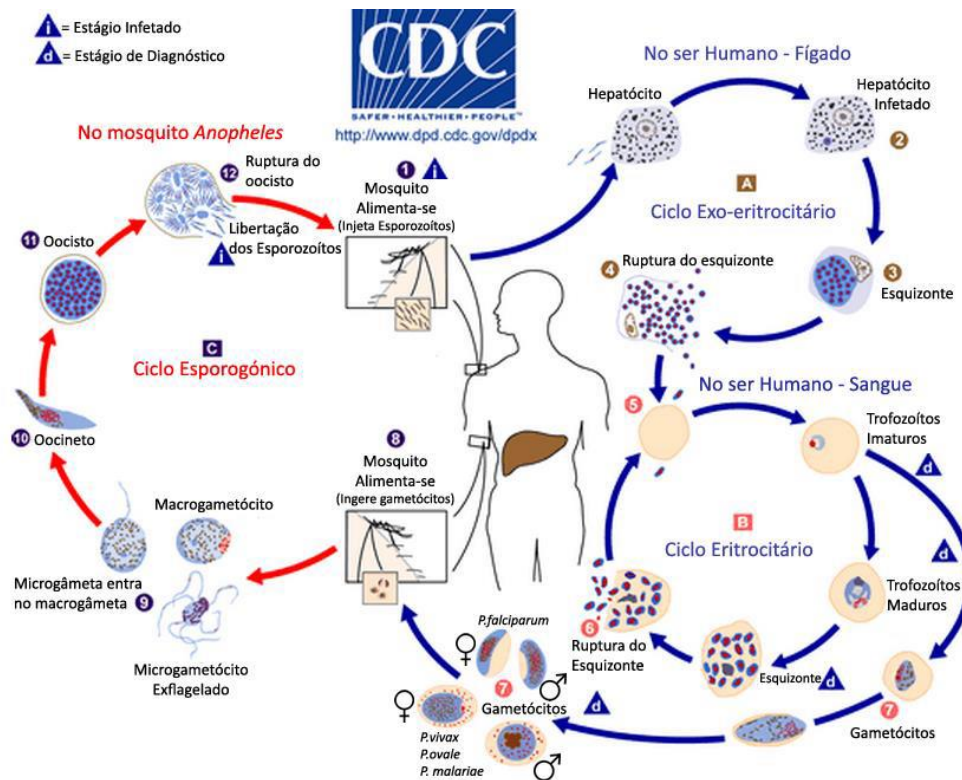


Figura 1: Representação esquemática do ciclo de vida do *Plasmodium* spp, no mosquito e no ser humano (Centers for Disease Control and Prevention, CDC).

A infecção inicia-se no momento da inoculação de esporozoítos pelo mosquito durante o repasto sanguíneo. Esses esporozoítos migram para o fígado, invadem hepatócitos e se diferenciam em esquizonte por meio da reprodução assexuada (Figura 1, ciclo a). Após a maturação, os esquizonte se rompem e liberam merozoítos na corrente sanguínea, que iniciarão o ciclo intraeritrocitário (BANNISTER *et al.*, 2000; WHITE *et al.*, 2014).

O ciclo intraeritrocitário é o mais estudado, pois é responsável pelas manifestações clínicas da doença e pode ser reproduzido em cultura contínua *in vitro*. Esse ciclo se inicia quando os merozoítos invadem os eritrócitos, se transformam, primeiramente, em estágios de anel e depois, em trofozoítos. Após completarem o período de crescimento vegetativo, os trofozoítos, por replicação assexuada, se diferenciam em esquizonte segmentado. No momento da ruptura dos eritrócitos, os esquizonte liberam de 16 a 24 merozoítos na circulação, que irão invadir outras hemácias e manter o ciclo (Figura 1, ciclo b). A lise dos eritrócitos e a consequente liberação de moléculas bioativas do parasita na circulação causam os sintomas característicos da doença, como os picos febris (BANNISTER *et al.*, 2000; WHITE *et al.*, 2014).

Alguns trofozoítos irão se diferenciar nas formas sexuais: gametócitos masculinos e femininos (Figura 1, ciclo c). Quando ingeridos pelo mosquito, eles se transformam, no lúmen do intestino, nas formas extracelulares microgametas e macrogametas, respectivamente. A fecundação do macrogameta pelo microgameta leva à formação do zigoto, que após a divisão meiótica, dá origem a forma móvel haplóide denominada oocineto. O oocineto se instala em baixo da parede do intestino, se transforma em oocisto, que, por esporogonia, gera vários esporozoítos os quais migram até as glândulas salivares do mosquito para reiniciar o ciclo (BANNISTER et al., 2000); WHITE *et al.*, 2014).

1.3 Métodos de prevenção tradicionais

A primeira medida de controle da malária baseia-se na erradicação do mosquito transmissor por meio do monitoramento ambiental de criadouros do inseto e do uso de inseticidas, como o diclorosifenilcloroetano (DDT). Essas intervenções contribuíram para a eliminação da doença em mais de 10 países durante o Programa de Erradicação Global da Malária aplicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de 1955 a 1969 (NAJERA; GONZALEZ-SILVA; ALONSO, 2011). Entretanto, a falta de recursos financeiros para manter programas de qualidade, principalmente em países emergentes, e a resistência generalizada a vários dos inseticidas disponíveis limitam essa medida de prevenção (HEMINGWAY *et al.*, 2016).

Apesar dos muitos esforços, o desenvolvimento de uma vacina viável que confira total proteção à infecção por *Plasmodium* ainda se apresenta como um grande desafio (WELLS; VAN HUIJSDUIJNEN; VAN VOORHIS, 2015). O parasito carrega mais de 60 variantes do gene *var*, responsável por codificar proteínas de membrana, além do fato de que a expressão dessas proteínas varia a depender do estágio de desenvolvimento, o que permite ao parasito enganar o sistema imunitário do hospedeiro por meio da criação de novos sítios de ligação para anticorpos (KYES *et al.*, 2007; KYES; KRAEMER; SMITH, 2007). Até o momento, a única vacina que passou por testes clínicos de fase III, denominada Mosquirix®, tem como antígeno o peptídeo RTS,S/AS01 e foi desenvolvida pela GlaxoSmithKline e colaboradores. Essa vacina demonstrou eficácia na imunização contra a malária severa durante o período de 18 meses de acompanhamento em apenas 34% das crianças e 27% dos recém-nascidos tratados, além de

apresentar um alto custo e ainda não ter sido aprovada para comercialização (PARTNERSHIP, 2014).

Tradicionalmente, a malária tem sido tratada por quimioterapia baseada em quinolonas e antifolatos. Entretanto, muitas dessas drogas apresentam limitações e baixa eficácia em áreas endêmicas, principalmente devido ao crescente desenvolvimento de resistência a esses tratamentos (HANBOONKUNUPAKARN; WHITE, 2016).

A descoberta do quinino, um produto natural extraído de árvores do gênero *Cinchona*, suscitou o desenvolvimento de quinolonas sintéticas, como a primaquina, mefloquina e cloroquina (RUDRAPAL, 2011). Essa última foi, por muitos anos, a primeira escolha para o tratamento da malária, em razão de sua alta efetividade, do baixo custo e da baixa toxicidade. O seu mecanismo de atuação se baseia na inibição das heme-polimerases, induzindo à acumulação de heme livre, que é tóxico para o parasito (LORIA *et al.*, 1999). Infelizmente, muitas cepas de *Plasmodium* se tornaram resistentes à cloroquina devido ao desenvolvimento de mecanismos de efluxo da droga do vacúolo digestivo, que correspondem à expressão das proteínas PfCRT (transportador de resistência a cloroquina), pfMDR1 e PfMRP, que são transportadoras associadas à resistência a múltiplas drogas (WELLEMS; PLOWE, 2001; TRAVASSOS; LAUFER, 2009). Contudo, algumas quinolonas, ainda hoje, são utilizadas no tratamento da malária não complicada ou como adjuvantes no tratamento de malária complicada, tais como mefloquina e primaquina (WELLS; VAN HUIJSDUIJNEN; VAN VOORHIS, 2015).

Os antifolatos são fármacos que inibem a biosíntese do folato, cofator essencial para a síntese das pirimidinas. Existem dois grupos de antifolatos: os que inibem a enzima diidrofolato redutase (DHFR), de que são exemplos as biguanidas, e os que inibem a enzima diidropteroato sintase (DHPS), como as sulfonamidas (HYDE, 2005). A resistência a essas drogas tem emergido devido a mutações nos genes que codificam as enzimas DHFR e DHPS (HEINBERG; KIRKMAN, 2015).

1.4 Artemisinina

A crescente resistência aos fármacos tradicionais tornou-se uma grande preocupação em 1980, quando a artemisinina (ART) foi descoberta e significou uma nova esperança na luta contra a malária (BUTLER; WU, 1992). A ART, extraída das folhas da planta *Artemisia annua*, é uma lactona sesquiterpênica que contém uma ponte endoperoxídica (1,2,4-trioxano) essencial para a

sua atividade antiparasitária. O mecanismo de ação da ART ainda não foi totalmente elucidado e aparenta envolver diversos alvos de ação. Apesar da alta efetividade e baixa toxicidade, limitações significativas têm dificultado seu uso na prática clínica. A extração da ART a partir da sua fonte vegetal permanece sendo a única opção prática para a obtenção do fármaco. Esse processo envolve um alto custo de produção e flutuações na oferta, o que limita o seu acesso, principalmente em áreas mais pobres. Além disso, a ART apresenta um tempo de meia vida curto e, portanto, torna-se necessário que o tratamento seja combinado com outras drogas para evitar recrudescência (MESHNICK, 2002; KINDERMANS *et al.*, 2007). Por último, a ART apresenta uma baixa solubilidade em água e em óleo. Contudo, essa limitação foi parcialmente contornada por meio do desenvolvimento de seus derivados semissintéticos, como a diidroartemisinina (DHA), o arteméter, o arteéter e o artesunato de sódio (Figura 2) (SRIRAM *et al.*, 2004). A DHA é muito utilizada na prática clínica em inúmeros países e, sendo também o metabólito ativo comum da ART e dos derivados semissintéticos após metabolização, é também muito empregada em estudos *in vitro* e *in vivo*.

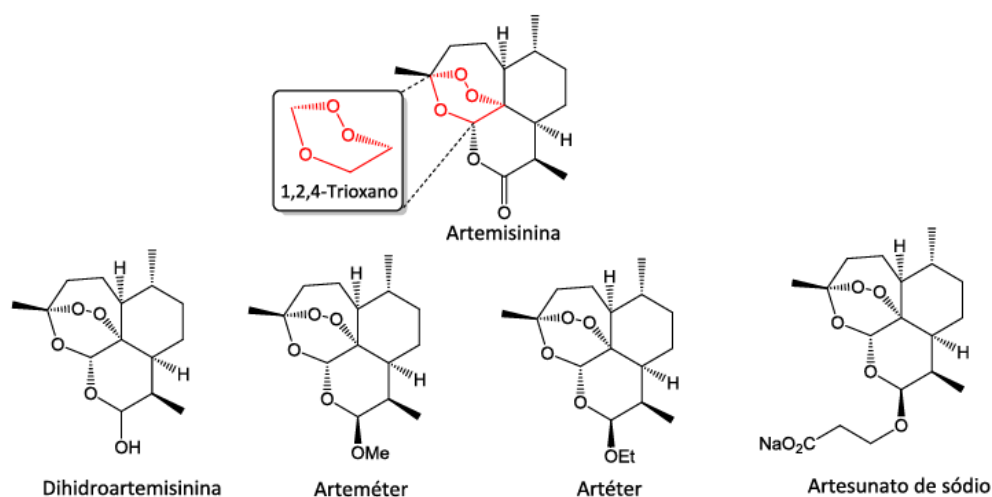


Figura 2: Representação da estrutura da artemisinina e de alguns dos seus derivados semi-sintéticos usados na terapêutica da malária [Adaptado de (KUMAR; MAHAJAN; CHIBALE, 2009)].

A ACT (terapia combinada com artemisinina) é considerada pela OMS, a primeira linha de tratamento da malária complicada e cinco combinações são recomendadas: artemeter–lumefantrina, artesunato–amodiaquina, artesunato–mefloquina, artesunato-sulfadoxine–pirimetamine e diidroartemisinina–piperquina (WHO, 2015). No entanto, em 2008, observou-se

o desenvolvimento de resistência a ART na fronteira entre a Tailândia e o Camboja, onde se detectou, anteriormente, o aparecimento de multirresistência de *P. falciparum* a cloroquina, sulfadoxina-pirimetamina, mefloquina, piperaquina, amodiaquina e pyronaridina (NOEDL *et al.*, 2008; DAS *et al.*, 2009). Atualmente, a propagação dessas cepas resistentes tem gerado grande preocupação, visto que podem ser encontradas também em outros países asiáticos, como Myanmar, Vietnã, Laos e China (ASHLEY *et al.*, 2014^a; PALOQUE *et al.*, 2016). Além disso, a resistência à ART causa uma sobrecarga aos fármacos adjuvantes e, conseqüentemente, induz ao aumento do número de cepas resistentes aos mesmos (WOODROW; WHITE, 2016).

1.4.1 Mecanismo de ação da artemisinina

O mecanismo de ação da ART tem sido alvo de muitos estudos, entretanto, esse continua sendo um tópico de muito debate, dada a sua complexidade. A atividade da ART e dos seus derivados depende da ativação do grupo endoperoxídeo pelo ferro na forma livre ou pelo constituinte do grupo heme. Essa reação gera espécies reativas que induzem a um aumento do estresse oxidativo capaz de causar dano em componentes essenciais do parasito (NEILL; BARTON; WARD, 2010).

A teoria mais aceita para o mecanismo de ativação da artemisinina é a da clivagem redutiva pelo ferro. O Fe^{2+} liga-se ao oxigênio 1 da ligação peroxídica da artemisinina e origina um radical centrado no oxigênio, que sofre isomerização, formando um radical centrado em um carbono primário, por meio de uma clivagem da ligação C-C adjacente ao radical oxigênio, como esquematizado na Figura 3. Alternativamente, essa ligação pode ocorrer no oxigênio 2 e produzir igualmente uma espécie com um radical centrado em oxigênio que, por meio de uma migração do hidrogênio, gera um isômero com um radical centrado em um carbono secundário (POSNER; OH, 1992; POSNER *et al.*, 1994). A identificação por RNM (Ressonância Nuclear Magnética) de adutos provenientes da ligação de proteínas (WANG *et al.*, 2015), metabólitos (WANG; WU, 2000) e do grupo heme (ROBERT; COPPEL; MEUNIER, 2002a) com esses radicais são evidências que sustentam esse modelo. Alternativamente, esses radicais podem reagir com oxigênio e formar inúmeros produtos de degradação da droga.

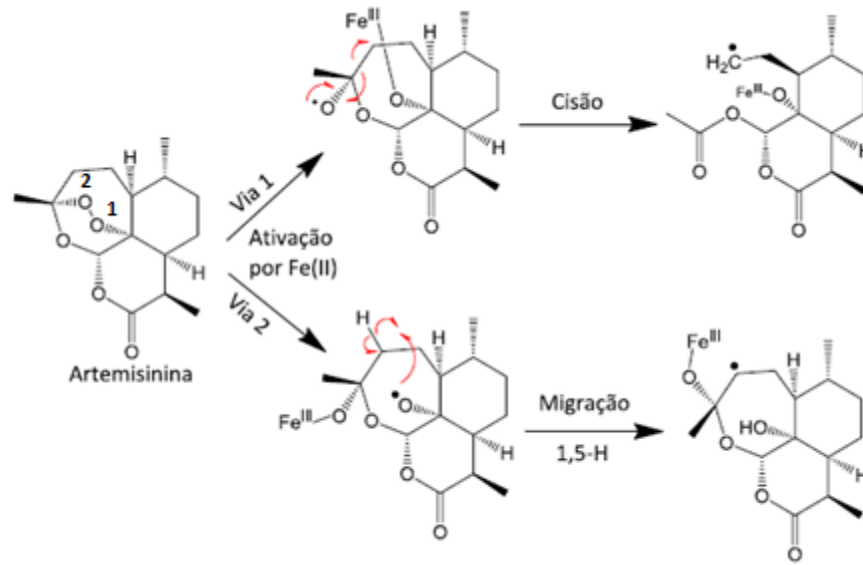


Figura 3: Esquema representativo do mecanismo de bioativação da artemisinina que envolve a formação de radicais centrados em carbonos primários e secundários, após clivagem redutiva mediada por Fe^{2+} [Adaptado de (NEILL; BARTON; WARD, 2010)].

O grupo heme é abundante no parasito e é um importante bioativador dos endoperóxidos (MESHNICK *et al.*, 1991). Na fase eritrocitária, o *Plasmodium* recorre às enzimas proteolíticas para degradar a hemoglobina do hospedeiro no seu vacúolo alimentar, a fim de obter aminoácidos essenciais para formação de suas proteínas. Esse processo resulta na liberação do grupo heme, que é um produto final tóxico para o parasito, uma vez que induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). O *Plasmodium* não possui uma enzima específica para degradação do grupo heme, no entanto, de forma a evitar a sua toxicidade, o parasito possui um mecanismo não enzimático de desintoxicação que consiste na formação da hemozoína, um polímero não tóxico e insolúvel (FONG; WRIGHT, 2013; MEUNIER; ROBERT, 2010).

Embora estudos demonstrem que a ART e derivados possam reagir com heme e ferro livre, esses fármacos são mais rapidamente e eficazmente ativados pelo grupo heme (ZHANG; GERHARD, 2008). Observou-se que os inibidores de hemoglobinases antagonizaram os efeitos da ART (KLONIS *et al.*, 2011), enquanto a presença do quelante desferrioxamina apenas reduziu sua atividade (STOCKS *et al.*, 2007). Ademais, os peróxidos são estáveis na presença de proteínas que contêm ferro em suas estruturas, como a hemoglobina (Hb) e enzimas citocromo P450. Sendo assim, a reação com o heme pode explicar a sua especificidade por eritrócitos

parasitados, uma vez que o *Plasmodium* contém altas concentrações de heme livre, comparado às das células de mamífero e a artemisinina é tóxica em nanogramas ao parasito e em microgramas às hemácias (CREEK *et al.*, 2009; POSNER; O'NEILL, 2004).

Alguns autores sugerem que o grupo heme, além de ativador, seja também um alvo de ação da ART, já que os radicais formados têm a habilidade de alquilar o seu anel porfirínico, em qualquer uma de suas quatro posições meso, e formar um aduto, conforme demonstrado na Figura 4 (ROBERT; COPPEL; MEUNIER, 2002a). A formação desses adutos inibe a polimerização do heme em hemozoína (LOUP *et al.*, 2007; KANNAN; SAHAL; CHAUHAN, 2002). Esses complexos foram encontrados em amostras de urina de camundongos infectados com *P. vinckei* (ROBERT; COPPEL; MEUNIER, 2002b) e em concentrações inferiores em ratos inoculados com cepas resistentes à ART (ROBERT *et al.*, 2013).

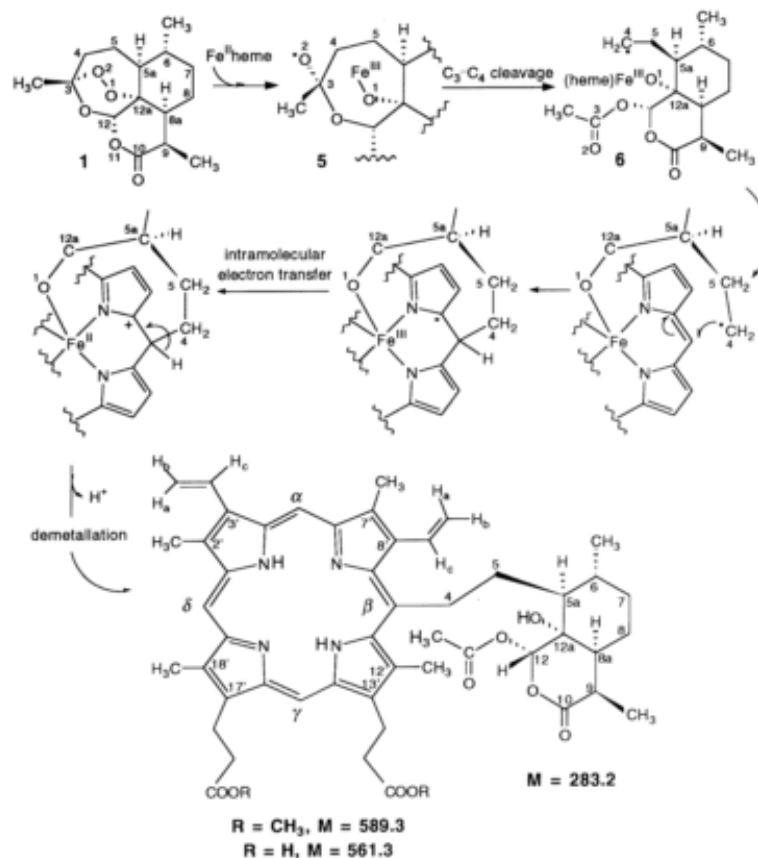


Figura 4: Esquema representativo do mecanismo de alquilação do grupo Heme pela ART. O radical pode se ligar em qualquer uma das posições meso do anel porfirínico: β , α , δ e γ . [Adaptado de (ROBERT; COPPEL; MEUNIER, 2002a; ROBERT; COPPEL; MEUNIER, 2002b)].

Além do grupo heme, foram sugeridos outros alvos de ação dos peróxidos, como proteínas e lipídios (TILLEY *et al.*, 2016). Os radicais formados causam dano às membranas celulares do parasito pela peroxidação lipídica que leva a despolarização das membranas (HARTWIG *et al.*, 2009; ANTOINE *et al.*, 2014; CRESPO *et al.*, 2008). Wang e colaboradores (2015) identificaram 125 proteínas plasmodiais susceptíveis à alquilação pela ART, por meio de reações com artemisinina acoplada a corantes fluorescentes, o que indica um espectro de ação amplo no proteoma.

No entanto, torna-se necessário avaliar quais desses alvos contribuem mais efetivamente para a toxicidade da droga. Eckstein-Ludwing e colaboradores (2003) demonstraram que a artemisinina tem a capacidade de inibir a PfATP6, que é uma ATPase transportadora de cálcio localizada no retículo endoplasmático e na mitocôndria do parasito cuja função é reduzir a concentração de cálcio livre no citosol. A proteína PfPI3K, responsável pela fosforilação do PI em PI3P, também foi mencionada como um possível alvo, já que a inibição da mesma pela DHA reduziu indiretamente o transporte da hemoglobina até o vacúolo digestivo (VAID *et al.*, 2010). As cepas resistentes apresentaram uma concentração 3 vezes maior dessa enzima, logo a proteína cinase PfPI3K pode estar envolvida também com o mecanismo de resistência à ART. Por último, Lisewski e colaboradores, 2014 demonstraram que o artesunato inibe a proteína de membrana Exp-1, envolvida no transporte da glutathiona para o vacúolo digestivo.

Além dos lipídios e proteínas, metabólitos também são possíveis alvos de ação da artemisinina, a glutathiona (GSH), por exemplo, também sofre alquilação pelos radicais (Figura 5) (WANG; WU, 2000). Esse metabólito tem um importante papel como antioxidante e o nível de glutathiona está intimamente relacionado com a sensibilidade do parasito à artemisinina e à cloroquina (VEGA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2015; LEHANE *et al.*, 2012).

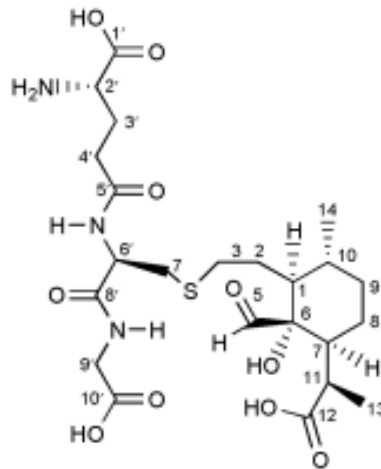
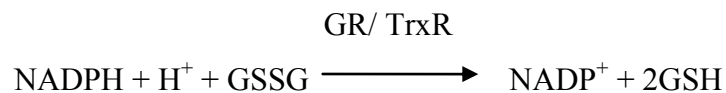


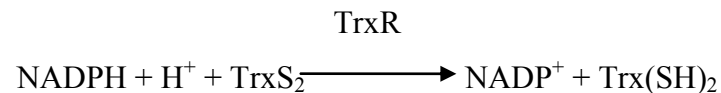
Figura 5: Representação da estrutura do aduto formado pela alquilação da glutatona por radicais de ART (WANG; WU, 2000).

A GSH controla o estresse oxidativo causado pelo grupo heme no vacúolo digestivo do parasito, visto que esse metabólito possui um grupo sulfidrila facilmente oxidável que atua como um receptor não-enzimático de radicais livres e ROS. Nesse processo, a GSH se dimeriza para formar GSSG que é reduzida posteriormente pela ação das proteínas glutatona redutase (GR) ou tiorredoxina redutase (TrxR), na presença do cofator NADPH, conforme mostrado nas reações abaixo. O potencial redox do sistema GSH/GSSG é alto no parasito quando comparado a outros organismos devido à manutenção constante de concentrações elevadas de GSH e do balanço 99,9%GSH/0,1% GSSG (GUTSCHER *et al.*, 2013). Nota-se também que ocorre uma troca desse metabólito entre o eritrócito e o parasito. As hemácias infectadas possuem uma capacidade reduzida de produção da GSH; o parasito, em contraste, possui um sistema eficiente de síntese de GSH. Portanto, o parasito excreta GSSG para a hemácia infectada que transforma a GSSG em GSH para seu uso próprio (BECKER *et al.*, 2004).



Além do sistema antioxidante baseado em glutatona, o parasito conta também com as tiorredoxinas, proteínas que se caracterizam pela presença do domínio Cys-Gly-Pro-Cys. As cisteínas formam uma ponte dissulfeto quando a proteína é oxidada pelos radicais, e essa

molécula é renovada por meio da ação da TrxR, também em presença do cofator NADPH (KANZOK *et al.*, 2000). Esse cofator atua como coenzima doadora de hidrogênio em sistemas redutores e é produzido no parasito, principalmente, na via da pentoses-fosfato pelas enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase e glutamato desidrogenase (MÜLLER, 2015).



1.3.2 Mecanismo de resistência à artemisinina

A resistência à artemisinina e derivados, se expressa clinicamente como uma maior taxa de recrudescência e um aumento no tempo de eliminação do parasito (*clearance* parasitário) (ASHLEY *et al.*, 2014b). Muitos estudos buscaram identificar a base genética para essa alteração e encontrou-se uma forte associação entre o aumento do *clearance* e mutações no domínio Kelch do cromossomo 13 (K13) (DHORDA *et al.*, 2015; HERLEKAR, 2014). Essa região do genoma do *Plasmodium* compartilha aproximadamente 30% de similaridade com o domínio equivalente aos genes humanos que codificam as proteínas KLHL8 e Keap1. Nas células de mamífero, a Keap 1 regula o fator de transcrição Nrf2, que medeia a síntese de proteínas envolvidas com a resposta ao estresse oxidativo. Embora essa via de sinalização seja restrita aos mamíferos, autores sugerem que o gene K13 do *Plasmodium* exerça uma função similar (CULLINAN *et al.*, 2003; LACHER *et al.*, 2015; CHANAS *et al.*, 2002; LIEBERT, 2006). Essa hipótese foi consolidada pela observação de níveis elevados de proteínas ubiquitinadas em cepas resistentes (RON; WALTER, 2007; AMM; SOMMER; WOLF, 2014). O sistema de ubiquitinação é responsável pela marcação de proteínas danificadas para que o proteassoma as elimine.

Duas alternativas foram propostas para contornar esse mecanismo de resistência. A primeira seria uma extensão do tempo de tratamento, uma vez que o aumento da exposição à droga ainda é capaz de eliminar mesmo as cepas mutantes (TILLEY *et al.*, 2016). A segunda refere-se a combinação da ART com drogas que sejam capazes de reverter o mecanismo de resistência. Nesse sentido, o Carfilzomib e o Bortezomib, inibidores do proteassoma utilizados clinicamente em tratamento anticancer, demonstraram atividade antimalárica, além de efeito sinérgico com a ART em cepas resistentes (DOGOVSKI *et al.*, 2015).

1.5 Trioxolanos

O alto custo de produção da artemisinina e derivados e as características farmacocinéticas desfavoráveis dessas drogas, foram as razões que levaram a uma busca intensa por substituintes sintéticos com eficácia comparável e tempo de meia vida mais prolongado. Nesse contexto, os ozonídeos (1,2,4-trioxolanos) possuem a mesma ponte endoperoxídica e se apresentam como fortes candidatos a novos antimaláricos, devido à alta efetividade, ao tempo de ação mais prolongado, a maior biodisponibilidade após administração oral e a um custo de produção economicamente viável (VENNERSTROM *et al.*, 2004; KAISER *et al.*, 2007; VALECHA *et al.*, 2012; WELLS; VAN HUIJSDUIJNEN; VAN VOORHIS, 2015). Apesar de apresentarem mecanismo de ação semelhante à artemisinina, os ozonídeos demonstraram atividade em modelos de *P. falciparum* resistentes à artemisinina provavelmente, devido ao tempo de meia-vida mais estendido (YANG *et al.*, 2016; WHITE, 2016).

A estrutura geral dos 1,2,4-trioxolanos está representada na Figura 6, onde os grupos substituintes (R, R1, R2 e R3) representam combinações de grupos funcionais. Através da associação de diferentes grupos nessas posições, é possível controlar a reatividade e promover uma atividade seletiva desses fármacos. A união de um grupo adamantil com um anel ciclohexílico oferece uma maior estabilidade. O grupo adamantil dificulta o acesso ao átomo de oxigênio por parte do ferro (II) enquanto o grupo ciclohexilil o facilita, ou seja, essa combinação permite um equilíbrio entre um grupo endoperoxídeo demasiado exposto, sendo muito reativo nessa forma, e um grupo endoperoxídeo impedido estericamente, praticamente inativo (DONG *et al.*, 2006; DONG *et al.*, 2010).

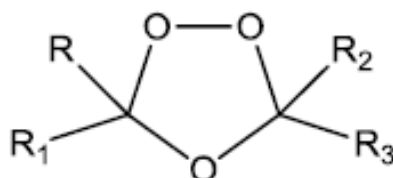


Figura 6: Estrutura geral dos 1,2,4-trioxolanos [Adaptado de (DONG *et al.*, 2006)].

Dentre os ozonídeos que apresentam essa estrutura otimizada, dois membros têm sido largamente estudados: o anterolado (OZ277) e o artefonomel (OZ439) (Figura 7). O anterolano passou por estudos de fase III e demonstrou tempo de meia vida duas a três vezes maior que o da ART. A combinação de OZ277 e piperquina foi desenvolvida e aprovada para seu uso na Índia,

com o nome comercial Synriam® (TOURE *et al.*, 2016). Entretanto, o OZ277 sofre metabolização rápida no fígado, gerando a necessidade da administração de uma dose alta para se obter o efeito antimalárico desejado, o que aumenta o risco de toxicidade (SAHA *et al.*, 2014). O OZ439 tem sido testado em estudos de fase II em humanos e aparenta possuir tempo de meia-vida quarenta vezes superior ao do OZ277 (MOEHRLE *et al.*, 2013; PHYO *et al.*, 2015; MOEHRLE *et al.*, 2013).

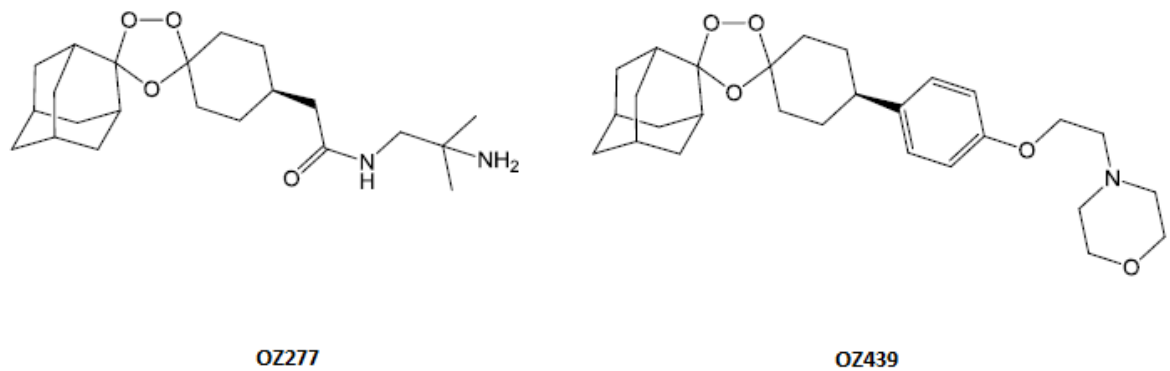


Figura 7: Representação da estrutura do OZ277 e do OZ439 [Adaptado de (VENNERSTROM *et al.*, 2004;PHYO *et al.*, 2015)]

Assim como a artemisinina, a atividade dos ozonídeos requer uma bioativação mediada pelo grupo heme (STOCKS *et al.*, 2007). O OZ277 realiza uma clivagem hemolítica que dá origem a radicais centrados em átomos de oxigênio, que se rearranjam por cisão beta para formar radicais centrados em átomos de carbono, como ilustrado na Figura 8 (CREEK *et al.*, 2007). Esses radicais formados podem alquilar componentes essenciais do parasito ou reagir com o oxigênio para formar os produtos de degradação: ceto-acido, adamantano- lactona e 4-ciclohexanona. Apesar de serem bioativados de maneira similar à ART, estudos apontam que os ozonídeos interagem de maneira diferente com os mesmos alvos moleculares, uma vez que o OZ277 apresentou maiores índices de alquilação do heme e uma inibição menos potente da PfATP6 (UHLEMANN *et al.*, 2007). Um semelhante padrão de ligação entre o OZ277 e o grupo heme é esperado (Figura 9) e sua atividade antimalarial *in vitro* esta fortemente associada ao nível de alquilação do heme (CREEK *et al.*, 2008).

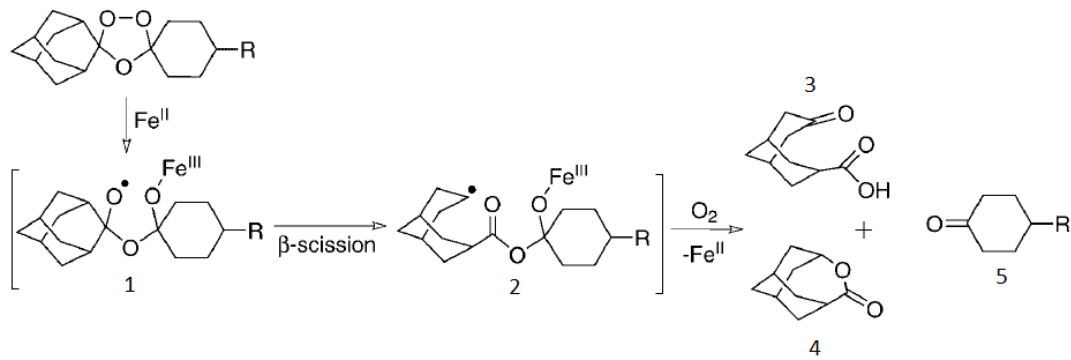


Figura 8: Representação dos mecanismos de bioativação do OZ277 por Fe²⁺. Esses radicais podem também reagir com oxigênio e formar os seguintes produtos de degradação: ceto-ácido (3), adamantano- lactona (4) e 4-ciclohexanona (5) (CREEK *et al.*, 2007).

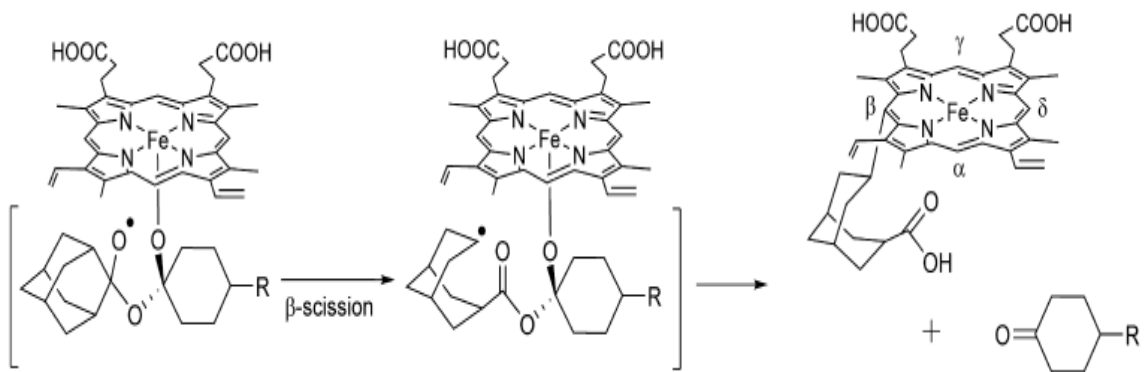


Figura 9: Esquema representativo do mecanismo de alquilação do grupo heme pelos ozonídeos. O radical pode ligar-se em qualquer uma das posições meso do anel porfirínico: β, α, δ e γ (CREEK *et al.*, 2008).

2 JUSTIFICATIVA

A terapia combinada com artemisinina, apesar de apresentar notáveis limitações, ainda é considerada pela OMS a primeira linha de tratamento da malária grave por *P. falciparum* (WHO, 2015). Entretanto, o aparecimento crescente de mutações que conferem resistência a esse tratamento e o espalhamento dessas cepas resistentes pelo continente asiático têm gerado uma grande preocupação, já que o tratamento quimioterápico é uma medida importante para o controle da doença (WELLS; VAN HUIJSDUIJNEN; VAN VOORHIS, 2015).

Os ozonídeos são endoperóxidos sintéticos facilmente produzidos, extremamente versáteis para otimização e eficazes contra o *P. falciparum*. Contudo, os mecanismos de atuação dos endoperóxidos ainda não foram completamente elucidados, dado que tais drogas atuam de maneira abrangente no parasito. Um entendimento mais amplo dos alvos de ação mais relevantes para a toxicidade induzida pela droga possibilitaria a formulação de estratégias para a otimização dos ozonídeos, para o desenho de novos fármacos e para a controle do desenvolvimento de resistência (WELLS; VAN HUIJSDUIJNEN; VAN VOORHIS, 2015).

A metabolômica envolve o estudo de várias classes de pequenas moléculas (com peso molecular de até 1000 Da) envolvidas em funções essenciais da célula, como aminoácidos, açúcares, peptídeos e lipídios. Abordagens metabolômicas não direcionadas (que analisam várias classes de moléculas ao mesmo tempo) são capazes de fornecer um panorama geral da interação desses fármacos com os metabólitos (CREEK; BARRETT, 2014). Ademais, os metabólitos também são potentes alvos de alquilação pelos endoperóxidos, como demonstrado para a GSH (LAKSHMANAN, 2011). O estudo do metaboloma pode ainda fornecer maior entendimento dos sistemas de proteção parasito, o que contribuiria largamente na busca por alternativas para contornar o mecanismo de resistência.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar a interação das drogas OZ277 e DHA com o metaboloma de *P. falciparum* na presença de heme.

3.2 Objetivos específicos

-Analisar a alteração das concentrações dos metabólitos devido à presença das drogas OZ277 e DHA ativadas pelo grupo heme.

-Avaliar a formação de adutos de radicais provenientes das drogas OZ277 e DHA com os metabólitos extraídos.

4. METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no laboratório da *Monash Institute of Pharmaceutical Science-Monash University - Parkville Campus* em Melbourne (Austrália) sob a supervisão do Prof. Dr. Darren Creek.

4.1 Cultura *in vitro* de *Plasmodium falciparum*

Culturas de *P. falciparum* da cepa 3D7, com parasitemia acima de 3%, haviam sido previamente congeladas por meio da adição do tampão de congelamento, preparado com 0,15% (g/v) de glicerol, 3 g de sorbitol, 0,65 g de NaCl em 72 mL de água Milli-Q. Essa solução foi misturada lentamente com as hemácias (centrifugadas a 800 xg por 5 min) para o armazenamento posterior a -80 °C (DIGGS *et al.*, 1975).

O criotubo foi retirado do congelador e mantido em temperatura ambiente até o completo descongelamento. Em seguida, 1 mL de hemácias foram transferidas para um tubo *falcon* de 15 mL, onde 0,2 mL da solução de cloreto de sódio 12% em PBS, foi adicionada gota a gota sob agitação lenta. Após incubação de 1 min, 10 mL da solução de cloreto de sódio 10% em PBS foi incluída, seguida da adição gradual da solução de cloreto de sódio 1,6% em PBS e, por último, da solução de 0,9% de cloreto de sódio e 0,2% (g/v) de glicose em PBS. A solução final foi centrifugada a 644 xg por 5 min, o sobrenadante foi descartado e as hemácias foram ressuspensas em meio de cultura (DIGGS *et al.*, 1975).

A cultura do parasito foi mantida, segundo o método descrito por Trager e Jensen (1976). Os isolados de *P. falciparum* foram cultivados em meio RPMI-1640 suplementado com 25 mM de HEPES, 0,5% de Albumax e 0,1 g/mL de hipoxantina. As placas de *petri* foram acondicionadas em uma caixa hermética gaseificada com 1% O₂, 5% CO₂ e 94% N₂ e incubadas a 37 °C em estufa. A parasitemia foi monitorada mediante microscopia de esfregaços corados com Giemsa (Merck &Co, NJ, USA) do *kit* Panúptico rápido. As diluições da cultura eram realizadas a cada dois dias para obter 0,5-1% de parasitemia. O hematócrito foi mensurado por meio do hematocitômetro e mantido a 3% com eritrócitos humanos.

4.2 Extração dos metabólitos

Para extração dos metabólitos, um total de 1×10^8 células com 5% de parasitemia, contendo principalmente trofozoítos (que é uma forma do parasito metabolicamente muito ativa)

foram lavadas com PBS e ressuspensas em 135 μ L da solução de extração (60% de Metanol /20% de Clorofórmio e 20% de água Milli-Q). As soluções foram misturadas rapidamente, mantidas em gelo por uma hora para a completa extração dos metabólitos e centrifugadas a 1000 xg por 10 min para retirada de 100 μ L do sobrenadante. Esses extratos foram liofilizados sob pressão contínua, ressuspensos em 100 μ L de água Milli-Q e homogeneizados (CREEK *et al.*, 2008).

4.3 Preparação das amostras

As reações foram realizadas como descrito por Creek e colaboradores (2008). O extrato foi incubado com 0,03 mM das drogas OZ277 e DHA, 1 mM de Hematina e 5 mM de ditionato de sódio por 2h a 37 °C em triplicata para cada condição juntamente com amostras controle que não continham a droga. O ditionato de sódio foi incluído a fim de remover o oxigênio dissolvido e manter o ferro no grupo heme na forma reduzida a Fe (II). A água Milli-Q foi utilizada como branco. As amostras de controle de qualidade foram preparadas por meio da adição de 20 μ L de cada amostra tratada, controle e branco após a o término do período de incubação em um mesmo tubo e esse procedimento foi repetido para cada condição.

4.4 Espectrometria de massas

As amostras, os brancos, as amostras de controle de qualidade, os controles e os 256 metabólitos padrão foram analisadas pela coluna ZIC-pHILIC 150 mm \times 4,6 mm, 5 μ m (Merck Sequant) acoplada ao espectrômetro de massas do tipo Quadrupolo-Orbitrap Q-Exactive™ MS/MS (Thermo Fisher Scientific) por meio da utilização de duas fases móveis, que foram A: 20 mM de carbamato de amônio em água e B: isopropanol. O espectrômetro de massas Q-Exactive utiliza o tipo ESI (eletrospray) de ionização e possui um sistema quadrupolo para filtragem de massas acoplado a ao analisador do tipo Orbitrap. O instrumento é também capaz de selecionar íons precursores para fragmentações do tipo MS/MS. O gradiente linear aplicado foi: redução progressiva de 80 a 20% de B no período de 0 min a 18 min, seguido por um período lavagem com 5% de B por 5 min e posteriormente um aumento linear de 5% a 100% de B por 9 min. Portanto, o tempo total da corrida de cada amostra foi de 32 min. Os tubos foram mantidos no amostrador a 4 °C e 10 μ L de cada amostra passou pela coluna com uma vazão de 300 μ L/min.

Entre as corridas o sistema injetor era lavado com uma mistura de 50:50 isopropanol e água Milli-Q.

O Espectrômetro de massas foi operado no modo alternado (positivo e negativo) e os parâmetros do equipamento foram: faixa de m/z 70 – 1050, resolução de 70000, temperatura do gás de varredura 1 °C, gás auxiliar 20 °C, temperatura de solvatação 275 °C e temperatura do capilar 250 °C. Para o modo de ionização positivo, a tensão do capilar foi de 4 kV a 55 V e a do modo negativo, -3,5 kVs a -55 V. A calibração foi efetuada para o modo negativo e positivo antes da corrida das amostras por meio de metabólitos padrões com valores de m/z abaixo de 1400 dos kits *Pierce™ ESI Positive Ion Calibration Solution* e *Pierce™ ESI Negative Ion Calibration Solution* (Thermo Fisher Scientific). O *software* Xcalibur 2.0 (Thermo Fisher Scientific Inc.) foi utilizado para controle instrumental e aquisição de dados (ZHANG *et al.*, 2012).

2.5 Análise de dados

A análise dos dados foi realizada por meio da utilização dos *softwares*: XCMS Centwave para detectar os picos e MZMatch para alinhar e relacionar os mesmos. O *software* IDEOM foi utilizado para identificação dos metabólitos por meio da comparação com os valores de m/z e tempo de retenção dos padrões e com os valores contidos nas bases de dados, considerando também os adutos formados com H^+ , NH_4^+ e Na^+ durante a ionização (CREEK *et al.*, 2012). O *software* IDEOM foi configurado com os seguintes parâmetros para garantir a filtragem de artefatos: faixa de acurácia de massas de 2 ppm e janela de tempo de retenção de 35%. A quantificação relativa dos metabólitos é baseada na média da altura dos picos e no resultado estatístico pelo teste de Welch. A reprodutibilidade do sinal foi verificada pela análise simultânea de quatro padrões internos que foram adicionados a cada amostra: CHAPS, TRIS, PIPES e CAPS.

Com o objetivo de analisar a formação de adutos, realizou-se uma abordagem do tipo direcionada através do *software* Ideom. A massa do radical proveniente da DHA (284,1628 m/z) foi somado à massa de cada um dos metabólitos detectados e esse valor final foi procurado dentre todos os picos detectados. O mesmo procedimento foi realizado para o OZ277, cuja massa do radical é 166,09938 m/z . O esquema representativo do desenho experimental escolhido para esse estudo esta ilustrado na Figura 10.

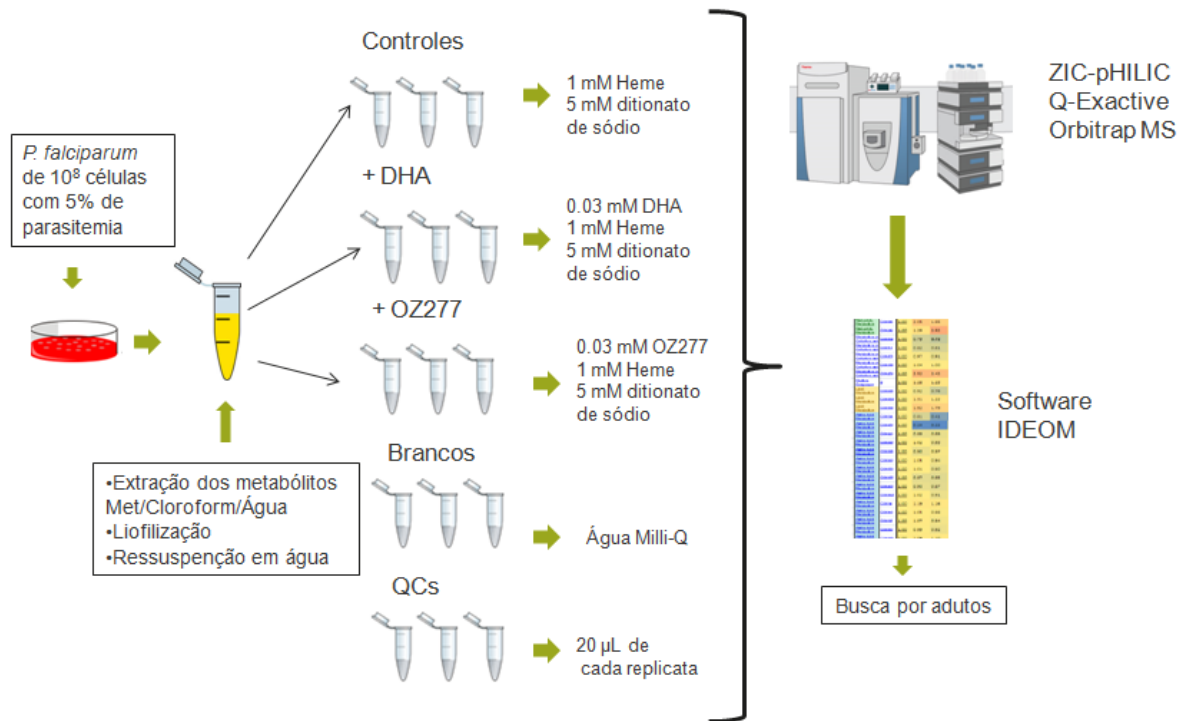


Figura 10: Esquema representativo do desenho experimental desenvolvido nesse estudo contendo as fases: cultura do parasito, extração dos metabólitos, preparo das amostras, análise por espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida e análise de dados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Interação dos metabólitos com o OZ277 mediada por Heme

5.1.1 Alteração nas concentrações dos metabólitos

Com o objetivo de investigar a interação dos metabólitos com o OZ277, realizou-se, em triplicata, a reação do extrato com a droga ativada pelo heme, nas amostras; e com o heme, nos controles. O Volcano Plot (Figura 11) compara esses grupos quanto ao *fold change* (razão entre as concentrações de metabólitos nas amostras e nos controles) e ao valor estatístico *p*, calculado pelo Teste T. Para análise, foram considerados os metabólitos detectados que apresentaram nível de significância *p* inferior a 0,05.

As massas dos produtos da degradação do OZ277 foram identificadas no Volcano Plot como (a) e (b), que correspondem respectivamente ao adamantano-lactona (166,145 m/z) e ceto-ácido (182,654 m/z). A presença desses subprodutos comprova que o anterolano foi ativado pelo heme nas amostras.

Os picos que foram detectados, significativamente, somente nas amostras e apresentavam valores de m/z superiores ao da droga (392,531 m/z) foram identificados na Figura 11 quanto aos valores de massa, que foram: 630,986 m/z, 530,876 m/z, 564,876 m/z, 613,355 m/z e 1007,220 m/z. No entanto, não foi encontrada relação entre essas massas e possíveis combinações de radicais com metabólitos, em contrapartida as reações de alquilação podem envolver rearranjos, o que dificulta a detecção desses adutos por esse método.

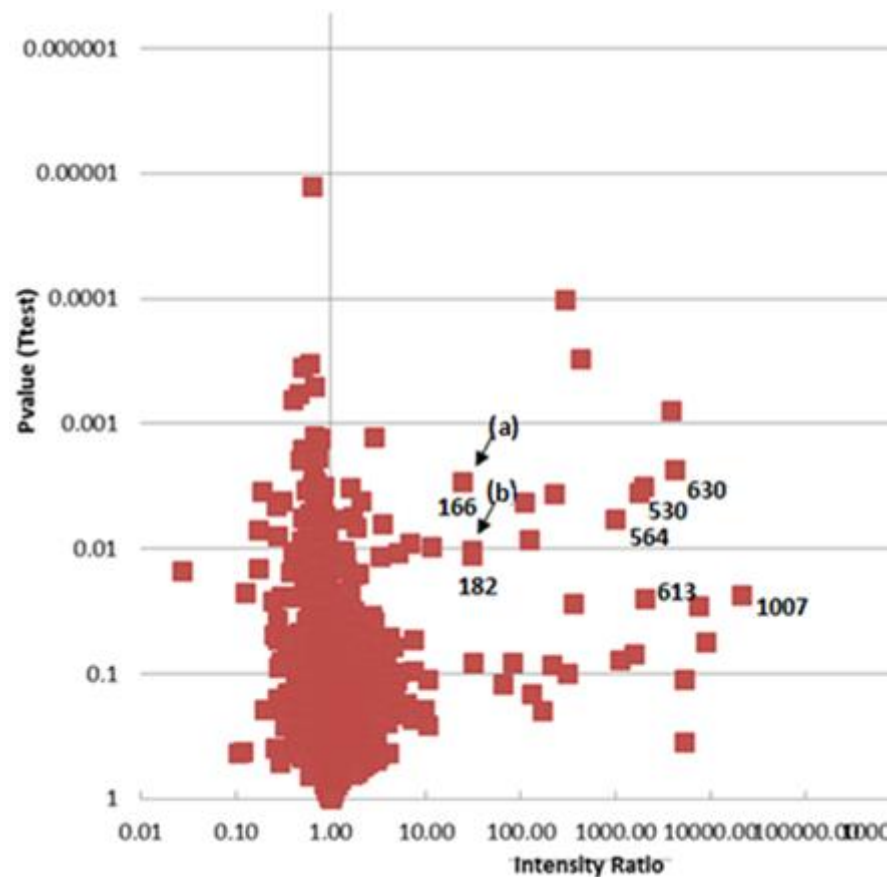


Figura 11: Representação Volcano plot da comparação entre a amostra tratada com OZ277 e os controles quanto ao *fold change* dos metabólitos *versus* o valor de significância calculado pelo *software* Ideom por meio do Teste T. Os compostos (a) e (b) correspondem aos produtos finais da degradação da droga, respectivamente, adamantano-lactona e ceto-ácido. Os valores de massas identificados correspondem a picos detectados exclusivamente nas amostras, com massas superiores a da droga e valor de significância $p \leq 0,05$.

No intuito de avaliar a interação com o anterolano, foram selecionados para análise os metabólitos que sofreram diminuição em sua concentração superior a 40% em relação aos controles e que apresentaram um valor $p \leq 0,05$ e esses dados estão ilustrados na Figura 12. Nota-se que a glutathione, cujo aduto com a ART já foi elucidado, teve sua concentração deprimida em aproximadamente 81% nas amostras que reagiram com OZ277, portanto, infere-se o que a GSH seja também um candidato a alquilação pelo anterolano. A ligação dos peróxidos com a GSH pode prejudicar sua função na neutralização dos ROS formados no metabolismo, o que pode contribuir para o aumento do estresse oxidativo do parasito.

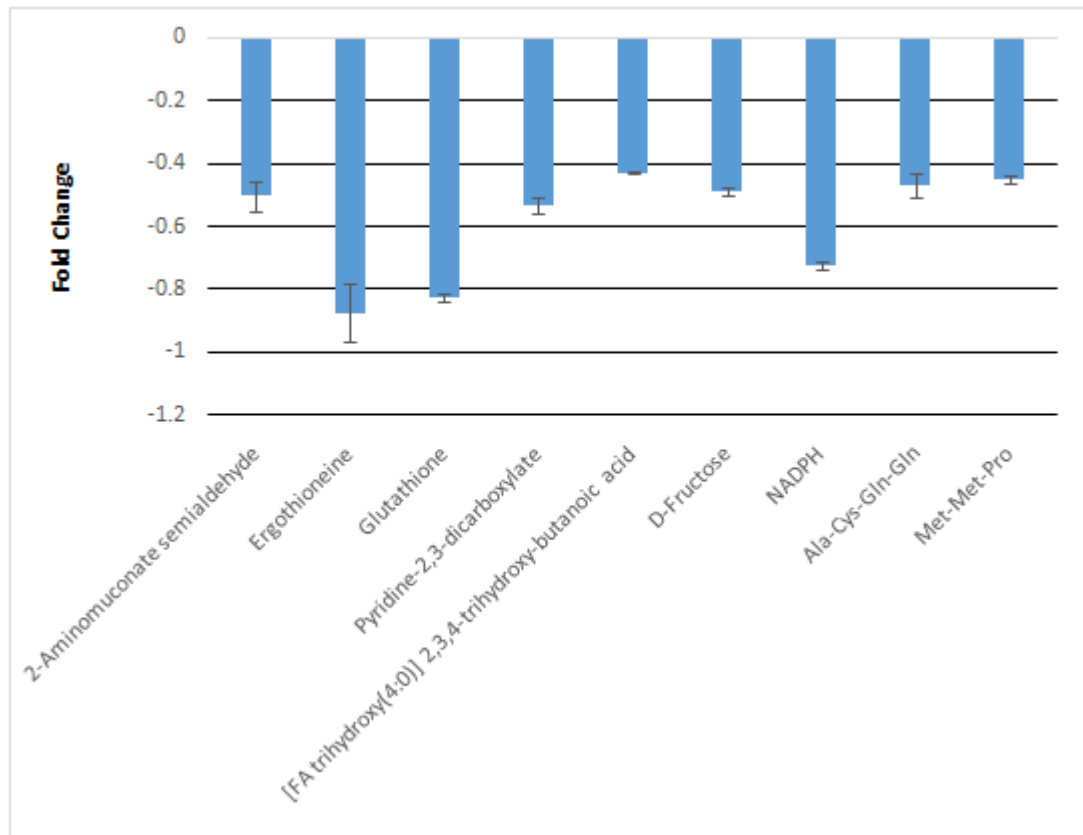


Figura 12: Representação gráfica dos metabólitos que apresentaram decaimento $\geq 40\%$ nos extratos tratados com OZ277 em relação aos controles e que obtiveram um valor de significância por teste $T \leq 0,05$.

O NADPH, cofator utilizado na redução da GSSG em GSH, sofreu uma diminuição de cerca de 67% na presença do OZ277 e essa interação pode resultar em um prejuízo na eficácia dos sistemas antioxidantes, já que esse cofator atua também na redução das tioredoxinas. Se os endoperóxidos são mais efetivamente bioativados no parasito devido à abundância de heme, o fato de a GSH e o NADPH desempenharem funções igualmente importantes nas células humanas não os invalida de serem alvos relevantes para a toxicidade desse fármaco no parasito.

Observa-se que a concentração do 2,3,4-triidroxi-butanóico foi 41% inferior nas amostras que reagiram com o OZ277 em relação aos controles. A presença desse lipídio nos extratos é esperada uma vez que ácidos graxos poliidroxiados são formados no parasito durante a peroxidação lipídica na membrana do vacúolo digestivo (SCHWARZER *et al.*, 2003). Não se tem um entendimento profundo sobre a função desses ácidos graxos poliidroxiados no parasito. Caso os mesmos sejam apenas produtos da degradação dos lipídios, a interação com o OZ277

pode não gerar nenhum efeito para o parasito. É importante ressaltar que a coluna pHILIC, utilizada para esse estudo, não é apropriada para a análise de lipídeos, dado seu caráter hidrofílico.

A ergotioneína é um antioxidante presente nos eritrócitos e, nesse experimento, a EGT sofreu diminuição de aproximadamente 83% nas amostras tratadas em relação aos controles. Esse aminoácido é produzido em alguns fungos a partir da histidina e adquirido pelos mamíferos por meio da dieta. Os eritrócitos apresentam uma maior abundância desse aminoácido em relação a outros tecidos do corpo (CHEAH; HALLIWELL, 2012). Sabe-se que o desenvolvimento da doença, de fato, depende da capacidade do eritrócito de resistir ao estresse oxidativo induzido pelo parasito. Pessoas com deficiência na glicose-6-fosfato desidrogenase, por exemplo, são imunes a infecção por *Plasmodium*, visto que a atividade deficiente dessa enzima não é capaz de produzir quantidades suficientes de NADPH para manter os sistemas antioxidantes (RUWENDE *et al.*, 1998). Todavia, a fim de confirmar se os radicais são capazes de atingir a EGT no eritrócito infectado, torne-se necessário tratar a cultura com a droga e analisar a interação com a EGT. Nesse experimento, a droga reagiu com o extrato da cultura e teve acesso livre a essa molécula, porém não se pode afirmar que isso aconteceria *in vivo*.

5.1.2 Formação de adutos

A abundância relativa do grupo heme foi inferior nas amostras tratadas com OZ277 comparado aos controles, como mostrado na Figura 13. Além disso, a massa do grupo heme ligado ao radical adamantino (derivado do anterolano) foi detectada nas amostras tratadas, em menor concentração nas amostras de controle de qualidade e não foi visualizada nos controles (Figura 14). Esses dados fornecem evidências da formação de um aduto heme-OZ277 nesse experimento. A complexação do heme com OZ277 já foi detectada por espectrometria de massas em outros estudos (CREEK *et al.*, 2008), entretanto, essa molécula ainda não teve sua estrutura elucidada, como foi realizado para o aduto heme-ART (ROBERT; COPPEL; MEUNIER, 2002a).

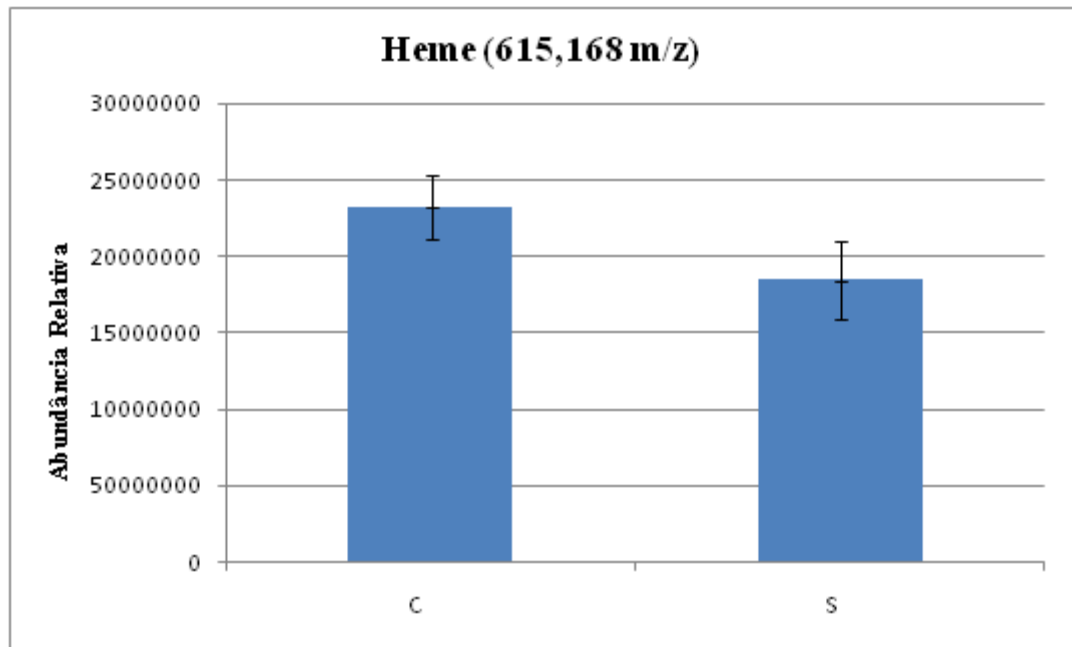


Figura 13: Representação gráfica da comparação da abundância relativa do grupo heme nas amostras que reagiram com OZ277 (S) em relação aos controles (C). Os valores foram plotados juntamente com seus respectivos valores de desvio padrão.

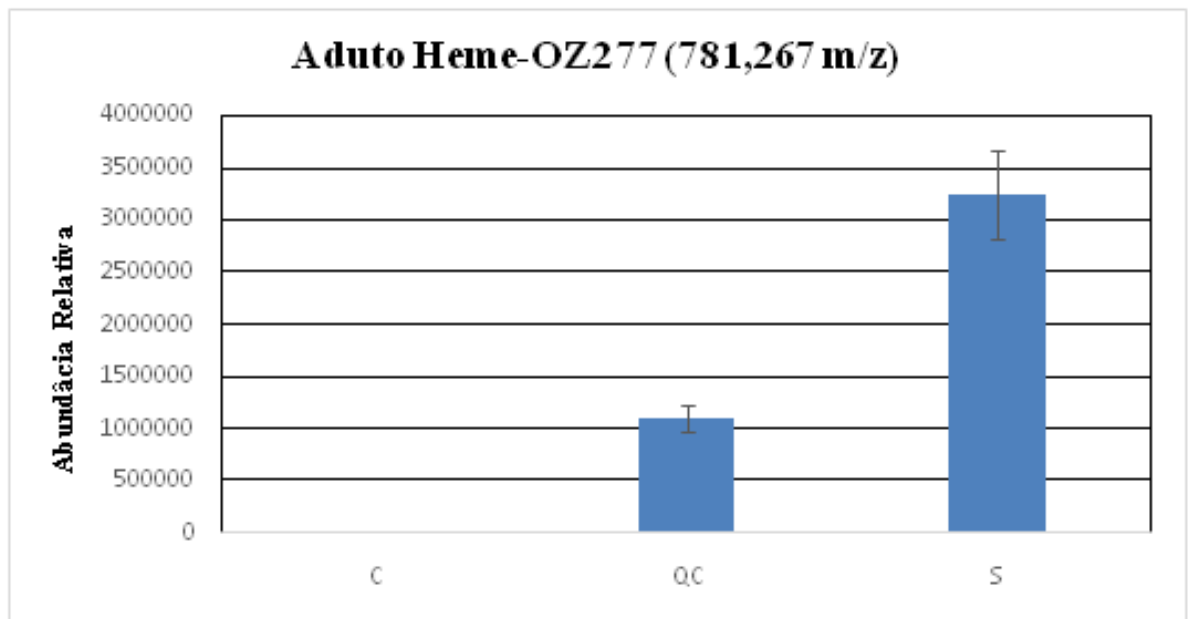


Figura 14: Representação gráfica da abundância relativa do aduto Heme-OZ277 nas amostras que reagiram com o OZ277 (S), nos controles (C) e nas amostras de controle de qualidade (QC). Os valores foram plotados juntamente com seus respectivos valores de desvio padrão.

Um cenário similar foi observado para o dipeptídeo L-isoleucil-L-prolina: as concentrações foram inferiores nas amostras e a detecção do aduto L-isoleucil-L-prolina-OZ277 se deu somente nas amostras e nos QCs, conforme ilustrado nas Figuras 15 e 16 respectivamente. A fim de investigar se esse dipeptídeo é proveniente da cultura e não apenas um artefato da corrida, foi realizado um experimento extra em que se reagiu apenas o OZ277 com o grupo heme e ditionato de sódio nas mesmas concentrações descritas. Esse pico não foi detectado nesse teste, portanto infere-se o que esse metabólito é um possível candidato à alquilação pelo anterolano. Nota-se que esse dipeptídeo possui um resíduo de prolina e é conhecida a capacidade desse aminoácido de se ligar diretamente a determinados radicais, devido ao baixo poder de ionização do anel pirrolidínico (MATYSIK *et al.*, 2002; YOUNG; MARTIN, 1971; CLENNAN *et al.*, 1989).

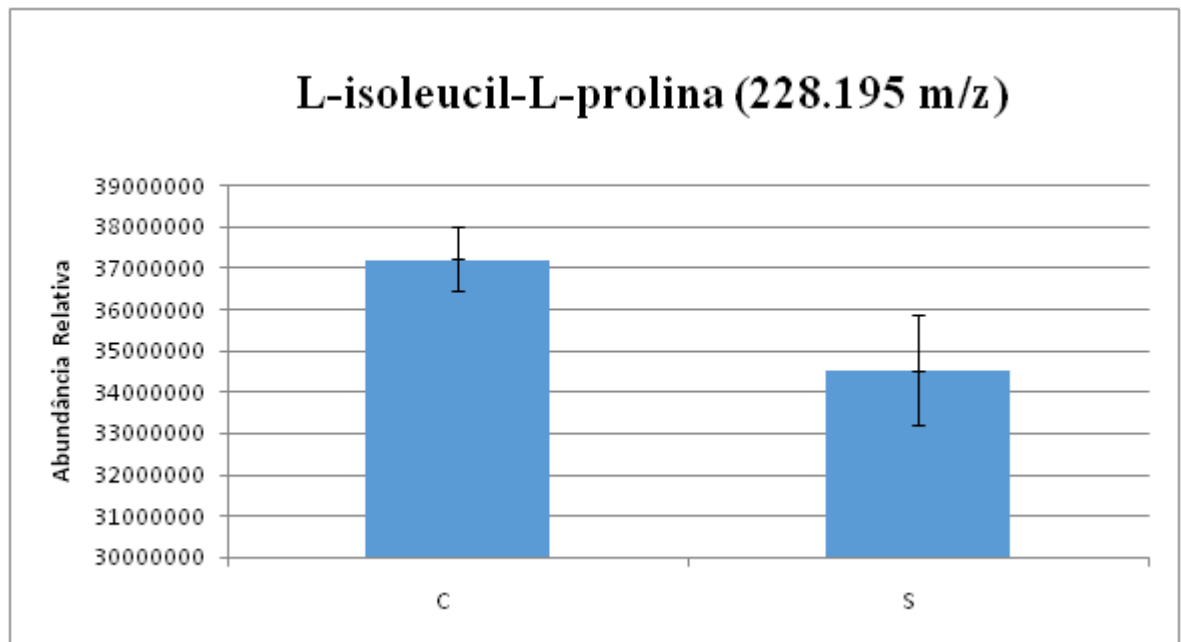


Figura 15: Comparação da abundância relativa do peptídeo L-isoleucil-L-prolina nas amostras tratadas com o OZ277 (S) em relação aos controles (C). Os valores foram plotados juntamente com seus respectivos valores de desvio padrão.

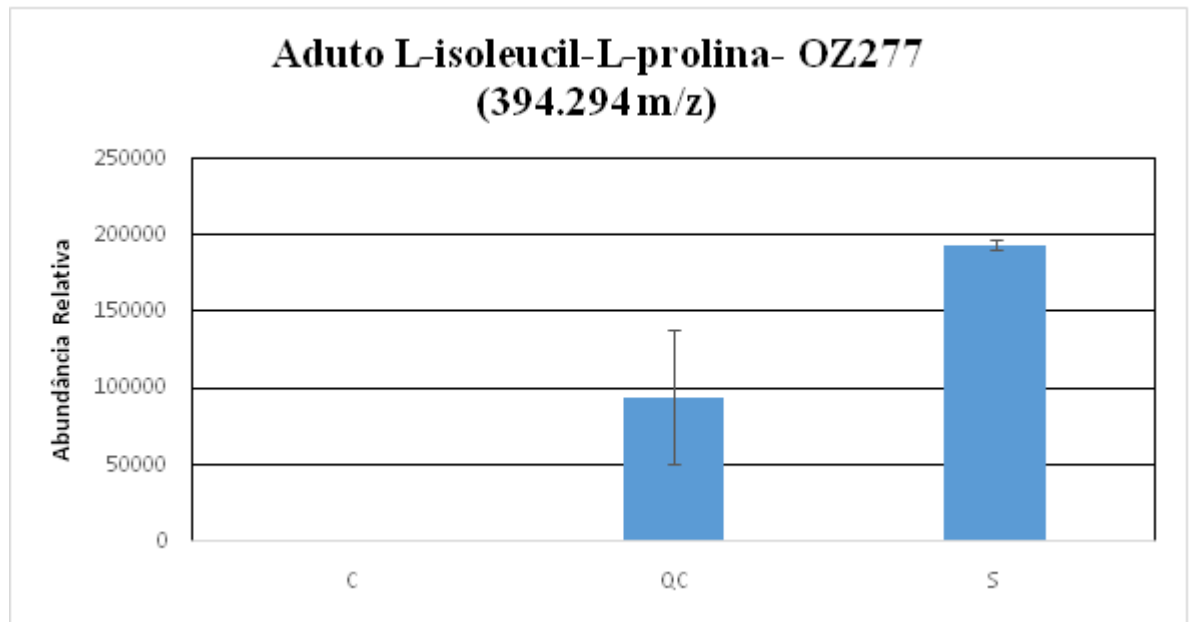


Figura 16: Abundância relativa do aduto L-isoleucil-L-prolina -OZ277 nas amostras tratadas com a droga (S), nos controles (C) e nas amostras de controle de qualidade (QC). Os valores foram plotados juntamente com seus respectivos valores de desvio padrão.

5.2 Interação dos metabólitos com o DHA mediada por Heme

5.2.1 Alteração nas concentrações dos metabólitos

Para fins de análise dos dados, os metabólitos presentes nas amostras e nos controles foram comparados quanto ao *fold change* e ao valor estatístico p calculado pelo Teste T no Volcano Plot (Figura 17). Os picos detectados somente nas amostras, que apresentaram valor p inferior a 0,05 e a massa superior a da droga (328,488 m/z), foram identificados no Volcano Plot e seus valores exatos de m/z são: 394,741 m/z 405,563 m/z, 414,324 m/z, 424,968 m/z e 736,489 m/z. No entanto, não foi encontrada relação dessas massas com combinações de radicais e metabólitos.

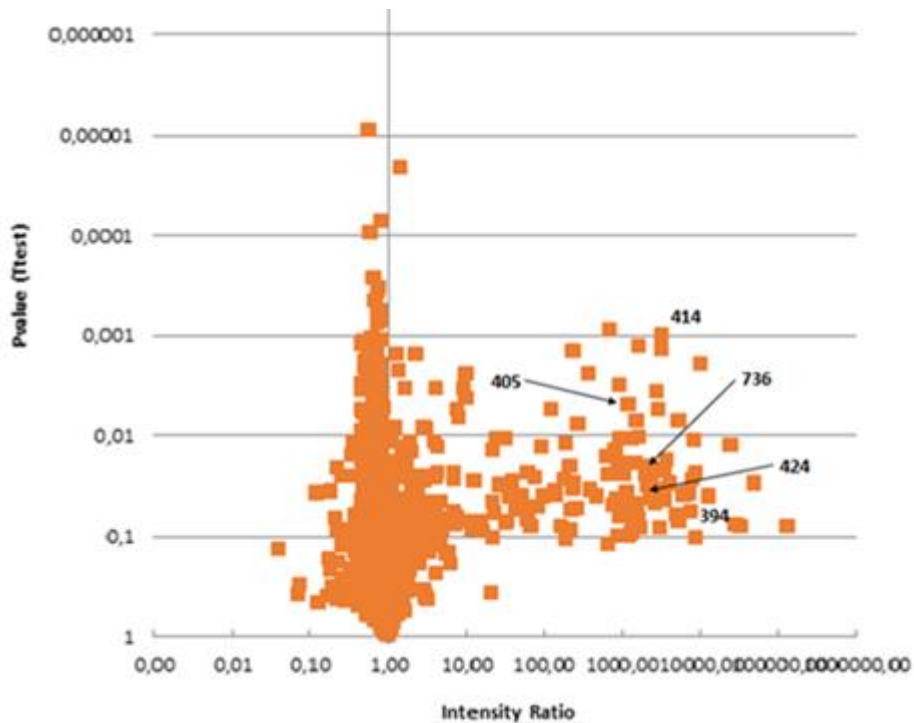


Figura 15: Representação Volcano plot da comparação entre a amostra tratada com DHA e os controles quanto ao *fold change* dos metabolitos *versus* o valor de significância calculado pelo *Software* Ideom através do Teste T. Os valores de massas identificados correspondem a picos detectados exclusivamente nas amostras tratadas com OZ277 que apresentaram massas superiores a da droga e valor de significância $p \leq 0,05$

Os metabólitos que sofreram uma diminuição significativa em presença da DHA (mais que 40% em relação aos controles) e que apresentaram um valor $p \leq 0,05$ foram selecionados para estudo e estão ilustrados na Figura 18. Observa-se que a glutathiona interagiu de maneira menos intensa com DHA (0,43 de *fold change*) do que com o OZ277 (0,81) e não foi verificada alteração das concentrações de NADPH na presença da DHA, tal como observado para o OZ277.

A abundância relativa de 8 peptídeos foram inferiores nas amostras que reagiram com a DHA em comparação com os controles: Ala-Ala-Cys-Arg, His-Lys-Met-Pro, Ile-Ile-Ser-Ser, Glu-Glu-Pro, Glu-Glu-Thr, Ile-Lys-Pro, Lys-Thr-Ser, Asn-Pro, Ala-Pro. Enquanto 2 peptídeos tiveram suas concentrações reduzidas na presença do anterolano: Ala-Cys-Gln-Gln e Met-Met-Pro. Cobbold *et al.* (2016) observaram uma notória diminuição dos peptídeos derivados da hemoglobina após tratamento com a droga *in vitro*. Dentre os peptídeos que reagiram nesse

estudo, apenas a Asn-Pro pode corresponder a um produto da catálise da hemoglobina, visto que essa sequência também está presente na estrutura da Hb.

Além da EGT, outros metabólitos exclusivos de eritrócitos tiveram suas concentrações diminuídas pela interação com drogas nesse experimento. A reação com a DHA levou ao decaimento de 65% na concentração do metabólito sulfoacetaldeído, que é utilizado para renovação do NADPH através da oxidoreductase sulfoacetaldeído desidrogenase. Analogicamente, a concentração do aminomuconato-semialdeído diminuiu em 45% pela reação com a droga e esse metabólito realiza a mesma função por meio da aminomuconato-semialdeído desidrogenase. Não há indícios da presença dos genes que codificam essas proteínas no *Plasmodium spp* e essa função é realizada no parasito principalmente pela glutamato desidrogenase (WAGNER *et al.*, 1998). Além desses metabólitos, a prostaglandina E1 (PGE1) também está presente somente nos eritrócitos e sofreu diminuição de 84% em presença da DHA. Não há indícios da ação dessas drogas em alvos moleculares específicos dos eritrócitos parasitados. Nesse experimento, a droga ativada teve acesso livre a esses metabólitos, porém não se pode afirmar que isso aconteceria *in vivo*.

Os resultados da interação com a diidroartemisinina indicam que essa droga possivelmente interfira no metabolismo das poliaminas, pois três membros dessa família tiveram suas concentrações deprimidas: espermidina (60%), n-acetilputrescina (53%) e L-ornitina (51%). As poliaminas correspondem a 14% do metaboloma do parasito, e suas concentrações aumentam de 10 a 30 vezes da fase de anel à fase de esquizonte (ASSARAF *et al.*, 1984; CLARK *et al.*, 2010). Esses metabólitos estão intimamente relacionados com a síntese protéica e estabilização do DNA, portanto, o envolvimento da DHA com essa via pode prejudicar a proliferação e diferenciação do parasito.

A síntese da espermidina se inicia com a produção da ornitina e sua conversão em putrescina pela enzima ornitina descarboxilase (ODC). A espermidina sintetase é capaz de transformar putrescina em espermidina na presença do AdoMet, descarboxilado pela enzima AdoMetDC. Diferente dos outros organismos, as enzimas ODC e AdoMetDC de *Plasmodium spp* formam uma estrutura acoplada bifuncional e esse complexo é regulado de uma forma mais simples (HAIDER *et al.*, 2005).

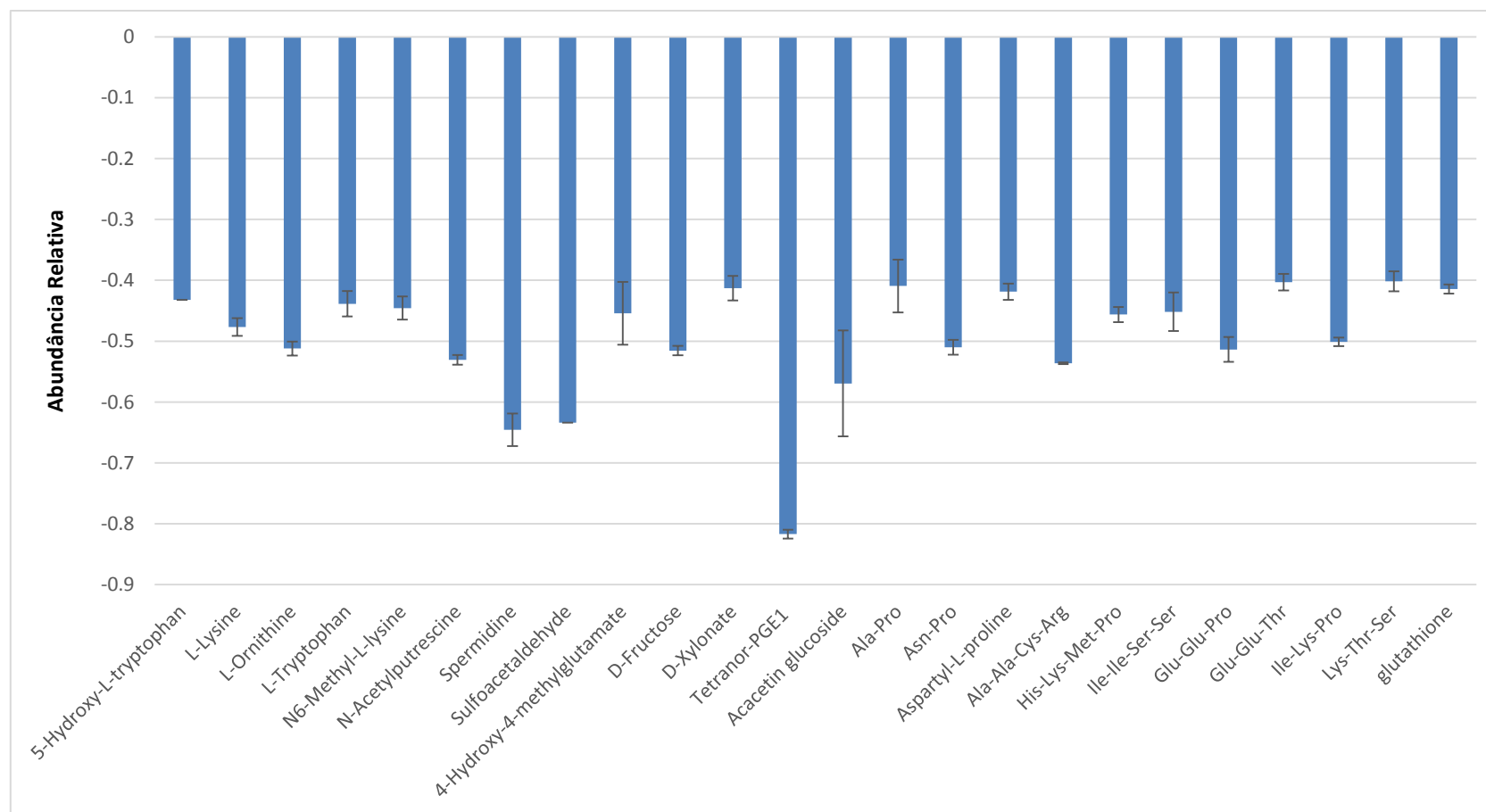


Figura 16: *Fold change* plot dos metabólitos que apresentaram decaimento $\geq 40\%$ nos extratos tratados com DHA em relação aos controles e que obtiveram um valor de significância por *t-test* $\leq 0,05$.

A eflornitina (DFMO), molécula inibidora da biosíntese de e L-ornitina, é atualmente utilizado para o tratamento da doença do sono causada pelo *Trypanosoma brucei* (BRUN; BURRI; GICHUKI, 2001). No entanto, a inibição simultânea do complexo ODC/AdoMetDC não foi capaz de curar ratos infectados com *P. berghei*. Niemand e colaboradores (2012) demonstraram que o *Plasmodium* possui sistemas de captação de putrescina e espermidina e a redução da concentração dessas poliaminas é compensada pelo aumento do transporte dessas moléculas do hospedeiro para o parasito. Se a interação da DHA com as poliaminas for revertida também por esse mecanismo, a interferência nessa via pode não corresponder a uma parte essencial do mecanismo de atuação da droga.

Por outro lado, a ornitina amino transferase (OAT) em *Plasmodium spp* esta envolvida com homeostase da ornitina, uma vez que sua função é catalisar a conversão de ornitina em glutamato-5-semialdeído e, diferente de outros organismos, no parasito a OAT é regulada pelo estado oxidativo. Os resíduos de cisteína 154 e 163 interagem com tiorredoxinas para ativação da OAT. Essa porção da enzima é extremamente conservados em *Plasmodium spp* e inexistente em outros organismos. (JORTZIK *et al.*, 2010). Sturm e colaboradores (2009) sugeriram que as tiorredoxinas tenham ainda habilidade de ativar a enzima AdoMet sintetase, responsável pela síntese do AdoMet, cofator para a produção de espermidina, conforme ilustrado na Figura 19. Portanto, o envolvimento dos endoperóxidos nos sistemas antioxidantes pode indiretamente, alterar também a homeostase das poliaminas.

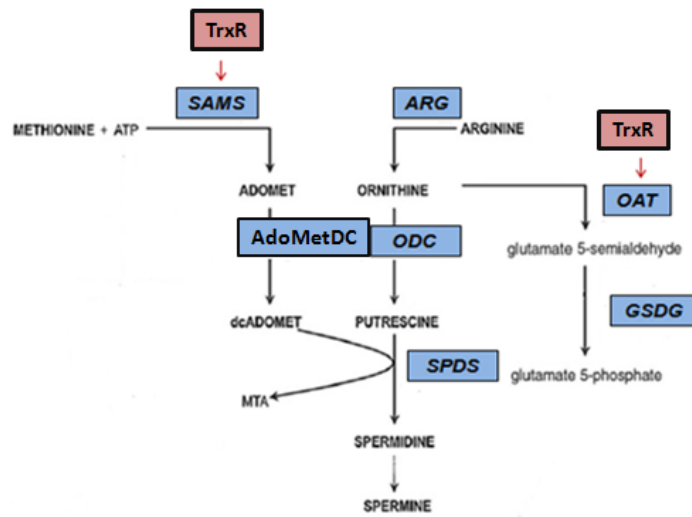


Figura 17: Fluoxograma ilustrativo do metabolismo das poliaminas em *P. falciparum*. As enzimas representadas são: ornitina descarboxilase (ODC), S-adenosilmetionina (AdoMet), AdoMet descarboxilase (AdoMetDC), espermidina sintetase (SPDS), arginina descarboxilase (ARG), tiorredoxina redutase (TrxR), ornitina amino transferase (OAT), glutamato-5- semialdeídodesidrogenase (GSDG) [Adaptado de (HAIDER *et al.*, 2005)]

5.2.2 Formação de adutos

Nesse experimento, não foram detectados adutos de DHA com metabólitos ou com o grupo heme. A DHA é uma molécula quimicamente mais instável que o OZ277, portanto, é mais propensa a sofrer reações paralelas à de alquilação pelo radical. O aduto ART-heme, por exemplo contém um grupo carbonila reativo no carbono 10 que pode sofrer trasesterificação para dar origem a um aldeído no carbono 12 por hidrólise do anel lactâmico.

6 CONCLUSÃO

O tratamento com ART apresenta diversas limitações, tais como: alto custo e curto tempo de meia vida. Além disso, o crescente desenvolvimento de resistência à ART pode reduzir a efetividade desse tratamento no futuro. A busca por substituintes sintéticos levou à descoberta de ozonídeos com eficácia comparável a ART. Apesar de não se possuir um conhecimento abrangente do mecanismo de ação dos endoperóxidos, esse trabalho confirmou experimentalmente que essas drogas possuem a habilidade de se ligar, simultaneamente, a vários componentes essenciais da célula após a bioativação pelo grupo heme. Ademais, esse estudo forneceu um panorama acerca dos metabólitos que possuem maior potencial para serem alquilados pela DHA e pelo OZ277.

Os resultados obtidos evidenciaram que o OZ277 interagiu mais pronunciadamente com sistema antioxidante baseado em glutatona, uma vez que, além de apresentar um *fold change* aproximadamente duas vezes maior que a DHA, o anterolano deprimiu as concentrações também do NADPH (cofator utilizado pela GR para reciclar a GSH).

A DHA apresentou uma interação notória com via de biosíntese das poliaminas, visto que causou a diminuição das concentrações da espermidina e de seus precursores: putrescina e L-ornitina. A DHA demonstrou inibição dos peptídeos derivados da hemoglobina em estudos metabolômicos não direcionados (COBBOLD *et al.*, 2016), entretanto, nessa análise, apenas um, dos 8 peptídeos que tiveram sua abundância relativa deprimida pela reação com a DHA, pode ser proveniente da catálise da Hb: Asn-Pro.

A busca direcionada por adutos revelou a formação de dois adutos com radicais provenientes do OZ277. O complexo heme-OZ277 foi detectado e a massa encontrada está em conformidade com a que foi descrita em outros estudos (CREEK *et al.*, 2008). O aduto com o dipeptídeo L-isoleucil-L-prolina foi descrito pela primeira vez nesse trabalho e acredita-se que esse radical se ligue ao resíduo de prolina, uma vez que o anel pirrolidínico tem capacidade de interagir com radicais. Entretanto, essa hipótese requer confirmação por meio de técnicas químicas mais detalhadas.

Não se pode afirmar que as interações observadas nessa análise ocorrem efetivamente no parasito, visto que a relação das drogas com o metaboloma é dinâmica e as concentrações do grupo heme e da droga são inferiores às testadas nesse experimento. Portanto, os metabólitos que tiveram suas concentrações diminuídas, nesse trabalho, devem ser alvos de estudos

metabolômicos direcionados com a finalidade de confirmar se as interações ocorrem e quais as consequências para o parasito.

Os lipídios também são alvos de ação prováveis dos endoperóxidos, entretanto a coluna ZIC-pHILIC utilizada nesse experimento não permite a separação adequada do lipidoma. Logo, é recomendável a realização de uma análise com por meio de colunas cromatográficas de caráter mais hidrofóbico.

O desenvolvimento de resistência, associado a mutações no domínio Kelch do cromossomo 13 (K13), envolve um aumento da eficiência dos sistemas de proteção do parasito frente aos danos causados pela ART, portanto, observa-se que esse mecanismo apresenta um caráter inespecífico. A formulação estratégias para contornar os mecanismos de resistência depende de um entendimento mais global de como as diversas vias metabólicas interagem entre si. Nesse sentido, as técnicas metabolômicas podem ser combinadas com outras "Omicas", como transcriptômica, proteômica e genômica, a fim de se obter uma análise ampla da biologia do parasito.

7 REFERÊNCIAS

- AMM, I.; SOMMER, T.; WOLF, D. H. Protein quality control and elimination of protein waste: The role of the ubiquitin-proteasome system. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 1, p. 182–196, 2014.
- ANTOINE, T. et al. Rapid kill of malaria parasites by artemisinin and semi-synthetic endoperoxides involves ROS-dependent depolarization of the membrane potential. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 4, p. 1005–1016, 2014.
- ASHLEY, E. A. et al. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. **The New England journal of medicine**, v. 371, n. 5, p. 411–23, 2014a.
- ASHLEY, E. A. et al. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. **N.Engl.J.Med.**, v. 371, n. 1533–4406 (Electronic), p. 411–423, 2014b.
- ASSARAF, Y. G. et al. Polyamine levels and the activity of their biosynthetic enzymes in human erythrocytes infected with the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. **The Biochemical journal**, v. 222, n. 3, p. 815–9, 1984.
- BANNISTER, L. H. et al. A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. **Parasitology Today**, v. 16, n. 10, p. 427–433, 2000.
- BECKER, K. et al. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: Host-parasite interactions. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 163–189, 2004.
- BRUN, R.; BURRI, C.; GICHUKI, C. W. The story of CGP 40 215: Studies on its efficacy and pharmacokinetics in African green monkey infected with *Trypanosoma brucei rhodesiense*. **Tropical Medicine and International Health**, v. 6, n. 5, p. 362–368, 2001.
- BUTLER, A. R.; WU, Y.-L. Artemisinin (qinghaosu): a new type of antimalarial drug. **Chemical Society Reviews**, v. 21, p. 85–90, 1992.
- CHANAS, S. A. et al. Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase *Gsta1*, *Gsta2*, *Gstm1*, *Gstm2*, *Gstm3* and *Gstm4* genes in the livers of male and female mice. **Biochemical Journal**, v. 365, n. 2, p. 405–416, 2002.
- CHEAH, I. K.; HALLIWELL, B. Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1822, n. 5, p. 784–93, 2012.
- CLARK, K. et al. Functional consequences of perturbing polyamine metabolism in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. **Amino Acids**, v. 38, n. 2, p. 633–644, 2010.
- CLENNAN, E. L. et al. Solvent effects on the ability of amines to physically quench singlet oxygen as determined by time-resolved infrared emission studies. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 54, n. 15, p. 3581–3584, 1989.
- COBBOLD, S. A. et al. Metabolic dysregulation induced in *Plasmodium falciparum* by

- dihydroartemisinin and other front-line antimalarial drugs. **Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 2, p. 276–286, 2016.
- CREEK, D. J. et al. Relationship between antimalarial activity and heme alkylation for spiro- and dispiro-1,2,4-trioxolane antimalarials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1291–1296, 2008.
- CREEK, D. J. et al. Stability of peroxide antimalarials in the presence of human hemoglobin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3496–3500, 2009.
- CREEK, D. J.; BARRETT, M. P. Determination of antiprotozoal drug mechanisms by metabolomics approaches. **Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 83–92, 2014.
- CRESPO, P. et al. Artemisinin and a Series of Novel Endoperoxide Antimalarials Exert Early Effects on Digestive Vacuole Morphology Artemisinin and a Series of Novel Endoperoxide Antimalarials Exert Early Effects on Digestive Vacuole Morphology □ ‡. 2008.
- CULLINAN, S. B. et al. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. **Molecular and cellular biology**, v. 23, n. 20, p. 7198–209, 2003.
- DAS, D. et al. Artemisinin Resistance in. **The new england journal of medicine**, v. 361, n. 5, p. 455–467, 2009.
- DHORDA, M. et al. Spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Myanmar: A cross-sectional survey of the K13 molecular marker. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 415–421, 2015.
- DIGGS C. et al. Protein synthesis in vitro by cryopreserved *Plasmodium falciparum*. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, 24: 760–763, 1975.
- DOGOVSKI, C. et al. Targeting the Cell Stress Response of *Plasmodium falciparum* to Overcome Artemisinin Resistance. **PLoS Biology**, v. 13, n. 4, p. 1–26, 2015.
- DONG, Y. et al. Effect of functional group polarity on the antimalarial activity of spiro and dispiro-1,2,4-trioxolanes. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 18, p. 6368–6382, 2006.
- DONG, Y. et al. The structure - Activity relationship of the antimalarial ozonide arterolane (OZ277). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 481–491, 2010.
- ECKSTEIN-LUDWIG, U. et al. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 424, n. 6951, p. 957–961, 2003.
- FONG, K. Y.; WRIGHT, D. W. Hemozoin and antimalarial drug discovery. **Future Med. Chem.**, v. 5, n. 12, p. 1437–1450, 2013.
- GUTSCHER, M. et al. Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. **Chemosphere**, v. 35, n. 6, p. 461–473, 2013.

- HAIDER, N. et al. The spermidine synthase of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: Molecular and biochemical characterisation of the polyamine synthesis enzyme. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 142, n. 2, p. 224–236, 2005.
- HANBOONKUNUPAKARN, B.; WHITE, N. J. The threat of antimalarial drug resistance. **Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines**, v. 2, n. 1, p. 10, 2016.
- HARTWIG, C. L. et al. Accumulation of artemisinin trioxane derivatives within neutral lipids of *Plasmodium falciparum* malaria parasites is endoperoxide-dependent. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, n. 3, p. 322–336, 2009.
- HEINBERG, A.; KIRKMAN, L. The molecular basis of antifolate resistance in *Plasmodium falciparum*: Looking beyond point mutations. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1342, n. 1, p. 10–18, 2015.
- HEMINGWAY, J. et al. Averting a malaria disaster : will insecticide resistance derail malaria control ? v. 6736, n. 15, p. 12–15, 2016.
- HERLEKAR, I. The resistance gene in malaria parasite identified. **Current Science**, v. 106, n. 3, p. 345, 2014.
- HYDE, J. E. Exploring the folate pathway in *Plasmodium falciparum*. **Acta Tropica**, v. 94, n. 3 SPEC. ISS., p. 191–206, 2005.
- JORTZIK, E. et al. Redox regulation of *Plasmodium falciparum* ornithine ??-aminotransferase. **Journal of Molecular Biology**, v. 402, n. 2, p. 445–459, 2010.
- KAISER, M. et al. Peroxide bond-dependent antiplasmodial specificity of artemisinin and OZ277 (RBx111160). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 8, p. 2991–2993, 2007.
- KANNAN, R.; SAHAL, D.; CHAUHAN, V. S. Heme-artemisinin adducts are crucial mediators of the ability of artemisinin to inhibit heme polymerization. **Chemistry and Biology**, v. 9, n. 3, p. 321–332, 2002.
- KANZOK, S. M. et al. The thioredoxin system of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Glutathione reduction revisited. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 51, p. 40180–40186, 2000.
- KINDERMANS, J.-M. et al. Ensuring sustained ACT production and reliable artemisinin supply. **Malaria journal**, v. 6, n. 1, p. 125, 2007.
- KLONIS, N. et al. Artemisinin activity against *Plasmodium falciparum* requires hemoglobin uptake and digestion. 2011.
- KYES, S. et al. *Plasmodium falciparum* var gene expression is developmentally controlled at the level of RNA polymerase II-mediated transcription initiation. **Molecular Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1237–1247, 2007.

- KYES, S. A.; KRAEMER, S. M.; SMITH, J. D. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*: Gene organization and regulation of the var multigene family. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 9, p. 1511–1520, 2007.
- LACHER, S. E. et al. Beyond antioxidant genes in the ancient Nrf2 regulatory network. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, n. Part B, p. 452–465, 2015.
- LEHANE, A. M. et al. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance Degrees of chloroquine resistance in Plasmodium – Is the redox system involved? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 47–57, 2012.
- LIEBERT, M. A. Rescue Systems. **Stress: The International Journal on the Biology of Stress**, v. 8, p. 76–87, 2006.
- LISEWSKI, A. M. et al. Supergenomic network compression and the discovery of exp1 as a glutathione transferase inhibited by artesunate. **Cell**, v. 158, n. 4, p. 916–928, 2014.
- LORIA, P. et al. Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials. v. 370, p. 363–370, 1999.
- LOUP, C. et al. Trioxaquinones and heme-artemisinin adducts inhibit the in vitro formation of hemozoin better than chloroquine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 10, p. 3768–3770, 2007.
- MATYSIK, J. et al. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. **Current Science**, v. 82, n. 5, p. 525–532, 2002.
- MESHNICK, S. R. et al. Artemisinin (qinghaosu): the role of intracellular heme in its mechanism of antimalarial action. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 49, n. 2, p. 181–189, 1991.
- MESHNICK, S. R. Artemisinin: Mechanisms of action, resistance and toxicity. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 13, p. 1655–1660, 2002.
- MEUNIER, B.; ROBERT, A. Heme as Trigger and Target for Trioxane- Containing Antimalarial Drugs †. **Accounts of Chemical Research**, v. 43, n. 11, 2010.
- MOEHRLE, J. J. et al. First-in-man safety and pharmacokinetics of synthetic ozonide OZ439 demonstrates an improved exposure profile relative to other peroxide antimalarials. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 2, p. 535–548, 2013.
- N??JERA, J. A.; GONZ??LEZ-SILVA, M.; ALONSO, P. L. Some lessons for the future from the global malaria eradication programme (1955-1969). **PLoS Medicine**, v. 8, n. 1, 2011.
- NEILL, P. M. O.; BARTON, V. E.; WARD, S. A. The Molecular Mechanism of Action of Artemisinin—The Debate Continues. p. 1705–1721, 2010.
- 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.

PALOQUE, L. et al. *Plasmodium falciparum*: multifaceted resistance to artemisinins. **Malaria Journal**, v. 15, p. 1–12, 2016.

PARTNERSHIP, S. C. T. Efficacy and Safety of the RTS , S / AS01 Malaria Vaccine during 18 Months after Vaccination : A Phase 3 Randomized , Controlled Trial in Children and Young Infants at 11 African Sites. v. 11, n. 7, 2014.

PHYO, A. P. et al. Antimalarial activity of artefenomel (OZ439), a novel synthetic antimalarial endoperoxide, in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria: An open-label phase 2 trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3099, n. 15, p. 1–9, 2015.

POSNER, G. H. et al. Mechanism-Based Design , Synthesis and in Vitro Antimalarial Testing of New 4-Methylated Trioxanes Structurally Related to Artemisinin : The Importance of a Carbon-Centered Radical for Antimalarial Activity? **Journal of medicinal chemistry**, v. 37, n. 9, p. 1256–1258, 1994.

POSNER, G. H.; O'NEILL, P. M. Knowledge of the proposed chemical mechanism of action and cytochrome P450 metabolism of antimalarial trioxanes like artemisinin allows rational design of new antimalarial peroxides. **Accounts of Chemical Research**, v. 37, n. 6, p. 397–404, 2004.

POSNER, G.; OH, C. Regiospecifically oxygen-18 labeled 1, 2, 4-trioxane: a simple chemical model system to probe the mechanism (s) for the antimalarial activity of artemisinin (qinghaosu). **Journal of the American Chemical Society**, n. 16, p. 8328–8329, 1992.

ROBERT, A. et al. Correlation between *plasmodium yoelii nigeriensis* susceptibility to artemisinin and alkylation of heme by the drug. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 3998–4000, 2013.

ROBERT, A.; COPPEL, Y.; MEUNIER, B. Alkylation of heme by the antimalarial drug artemisinin. n. January, p. 414–415, 2002a.

ROBERT, A.; COPPEL, Y.; MEUNIER, B. NMR characterization of covalent adducts obtained by alkylation of heme with the antimalarial drug artemisinin. v. 339, p. 488–496, 2002b.

RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 7, p. 519–529, 2007.

RUDRAPAL, M. A brief review on malaria and current antimalarial drugs. **Current Pharma Research**, v. 1, n. 3, p. 286–292, 2011.

RUWENDE, C. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 76, n. 8, p. 581–8, 1998.

SAHA, N. et al. Safety, tolerability and pharmacokinetic profile of single and multiple oral doses of arterolane (RBx11160) maleate in healthy subjects. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 54, n. 4, p. 386–393, 2014.

SCHWARZER, E. et al. Malaria-parasitized erythrocytes and hemozoin nonenzymatically generate large amounts of hydroxy fatty acids that inhibit monocyte functions. **Blood**, v. 101, n. 2, p. 722–728, 2003.

SRIRAM, D. et al. Progress in the research of artemisinin and its analogues as antimalarials: an update. **Natural Product Research**, v. 18, n. 6, p. 503–527, 2004.

STOCKS, P. A. et al. Evidence for a common non-heme chelatable-iron-dependent activation mechanism for semisynthetic and synthetic endoperoxide antimalarial drugs. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 46, n. 33, p. 6278–6283, 2007.

STURM, N. et al. Identification of proteins targeted by the thioredoxin superfamily in *Plasmodium falciparum*. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 4, 2009.

TILLEY, L. et al. Artemisinin Action and Resistance in *Plasmodium falciparum*. **Trends in Parasitology**, v. xx, p. 1–15, 2016.

TOURE, O. A. et al. A Phase 3, Double-Blind, Randomized Study of Arterolane Maleate-Piperaquine Phosphate vs Artemether-Lumefantrine for Falciparum Malaria in Adolescent and Adult Patients in Asia and Africa. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 8, p. 964–971, 2016.

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

TRAVASSOS, M. A.; LAUFER, M. K. Resistance to antimalarial drugs: molecular, pharmacological and clinical considerations. **Pediatric Research**, v. 65, n. 5 Pt 2, p. 64R–70R, 2009.

UHLEMANN, A. C. et al. Mechanism of antimalarial action of the synthetic trioxolane RBX11160 (OZ277). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 667–672, 2007.

VAID, A. et al. PfPI3K, a phosphatidylinositol-3 kinase from *Plasmodium falciparum*, is exported to the host erythrocyte and is involved in hemoglobin trafficking. **Blood**, v. 115, n. 12, p. 2500–2507, 2010.

VALECHA, N. et al. Arterolane maleate plus piperaquine phosphate for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: A comparative, multicenter, randomized clinical trial. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 5, p. 663–671, 2012.

VEGA-RODRÍGUEZ, J. et al. Implications of glutathione levels in the plasmodium berghei response to chloroquine and artemisinin. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–15, 2015.

VENNERSTROM, J. L. et al. Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate. **Nature**, v. 430, n. 7002, p. 900–904, 2004.

VIGILÂNCIA, S. DE. Boletim Epidemiológico n. 1 2013. v. 44, p. 1–16, 2013.

WAGNER, J. T. et al. Glutamate dehydrogenase, the marker protein of *Plasmodium falciparum*--

cloning, expression and characterization of the malarial enzyme. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 258, n. 2, p. 813–819, 1998.

WANG, D.-Y.; WU, Y.-L. A possible antimalarial action mode of qinghaosu (artemisinin) series compounds. Alkylation of reduced glutathione by C-centered primary radicals produced from antimalarial compound qinghaosu and 12-(2,4-dimethoxyphenyl)-12-deoxyqinghaosu. **Chemical Communications**, n. 22, p. 2193–2194, 2000.

WANG, J. et al. Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. **Nat Commun**, v. 6, p. 10111, 2015.

WELLEMS, T. E.; PLOWE, C. V. Chloroquine-resistant malaria. **J.Infect.Dis.**, v. 184, n. 6, p. 770–776, 2001.

WELLS, T. N. C.; VAN HUIJSDUIJNEN, R. H.; VAN VOORHIS, W. C. Malaria medicines: a glass half full? **Nature reviews. Drug discovery**, v. 14, n. 6, p. 424–442, 2015.

WHITE, N. J. et al. Malaria. **The Lancet**, v. 383, n. 9918, p. 723–735, 2014.

WHITE, N. J. Can new treatment developments combat resistance in malaria? **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 6566, n. May, p. 14656566.2016.1187134, 2016.

WHO. Global technical strategy for malaria 2016-2030. **WHO Geneva**, p. 1–35, 2015.

WOODROW, C. J.; WHITE, N. J. The clinical impact of artemisinin resistance in Southeast Asia and the potential for future spread. **FEMS microbiology reviews**, n. April, p. 1–15, 2016.

YANG, T. et al. Comparison of the exposure time dependence of the activities of synthetic ozonide antimalarials and dihydroartemisinin against K13 wild-type and mutant *Plasmodium falciparum* Strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 8, p. 4501–4510, 2016.

YOUNG, R. H.; MARTIN, R. L. On the Mechanism of Quenching. v. 455, n. 1962, p. 5183–5185, 1971.

ZHANG, S.; GERHARD, G. S. Heme activates artemisinin more efficiently than hemin , inorganic iron , or hemoglobin. v. 16, p. 7853–7861, 2008.

ZHANG, T. et al. Evaluation of Coupling Reversed Phase, Aqueous Normal Phase, and Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography with Orbitrap Mass Spectrometry for Metabolomic Studies of Human Urine. 2012.