



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**EXPLORING BIOORGANOMETALLIC COMPOUNDS
WITH RUTHENIUM MOIETIS AS ANTIMALARIALS**

Beatriz Rodrigues Duarte

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Julho, 2021



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**EXPLORING BIOORGANOMETALLIC COMPOUNDS
WITH RUTHENIUM MOIETIS AS ANTIMALARIALS**

Beatriz Rodrigues Duarte

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientadora: Investigadora Doutora Fátima Nogueira

Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) da Universidade Nova de Lisboa (NOVA)

Co-orientador: Investigadora Doutora Lis Lobo

Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) da Universidade Nova de Lisboa (NOVA)

Julho, 2021

“As pessoas tornam-se verdadeiramente notáveis quando começam a pensar que conseguem fazer coisas. É quando acreditam nelas mesmas que descobrem o primeiro segredo para o sucesso.”

- Norman Vincent Peale

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação é o resultado de muitas horas de trabalho árduo e da ajuda e suporte de bons amigos e família que me permitiram alcançar este grande objetivo da minha vida.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora, Dra. Fátima Nogueira, por confiar em mim para fazer este trabalho e por toda ajuda e ensinamentos ao longo do último ano. Muito obrigada por ser um grande exemplo para mim e por toda a paciência, disponibilidade e atenção que me deu.

À minha co-orientadora, Dra. Lis Lobo, muito obrigada por me receberes no laboratório e me ajudares a ambientar e me apoiares sempre que me sentia mais desamparada. Mostraste-me o funcionamento do laboratório e sei que não conseguiria terminar este trabalho sem ti. Muito obrigada por me responderes e ajudares mesmo quando estavas super ocupada para terminar a tua tese de doutoramento.

Ao Dr. Pedro Florindo da FFUL, por ceder os compostos testados e alvo de estudo.

A todos os meus colegas de laboratório Inês, Rafael, Márcia, Hélio, Guilherme, Clemente, Jéssica, Jessy, obrigada por todos os momentos divertidos nas pausas e horas de almoço, por me ajudarem e aconselharem e por dividirem comigo a “dor” de ser estudante. Um especial agradecimento à minha colega Andreia Lopes por toda a companhia nas boleias para o IHMT, por todos os desabafos e conselhos e, principalmente, por ser uma boa amiga. Obrigada, desejo-te o melhor!

Aos meus amigos Lindérrimos, Bianca Gama, Sofia Marques e Francisco Ferreira, obrigada por serem o melhor grupo nos últimos sete anos, por todas as gargalhadas, conversas sérias e choradeiras intermináveis. Vocês justificam a frase “o que a faculdade junta, ninguém separa”. Espero que continuemos a “panicar” todos juntos durante muitos anos. Ao Rúben Torres, que foi a melhor adição ao nosso grupo, muito obrigada por me aturares!

Aos meus manos, João Oliveira, Rita Peixoto, Rúben Silva e Gonçalo Caldeira, obrigada por me fazerem saber que posso contar convosco para tudo. Obrigada por todas as “escapadinhas” e festas e as horas passadas a estudar na sala de estudo do ISCTE.

E principalmente, ao André Almeida, o melhor namorado e amigo que alguém pode ter. Obrigada por acreditares sempre em mim, mesmo quando eu própria não acreditava. Obrigada por estares sempre lá na primeira fila a aplaudir os meus sucessos e seres o primeiro que me consola quando falho. Todos deviam ter um André na sua vida, esta tese é tanto minha como tua, obrigada!

E por fim, mas não menos importante, à minha família que me aturou nos piores momentos, me apoiou e ajudou a continuar e a acabar esta tese. Muito obrigada, mãe, pai, Adriana, Afonso e Matilde.

RESUMO

Explorando compostos bio organometálicos com uma porção de rutênio como antimaláricos.

Beatriz Rodrigues Duarte

A malária é uma das doenças parasitárias mais importantes no mundo, causada por cinco espécies de parasitas do género *Plasmodium*. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, em 2019, ocorreram 229 milhões de casos de malária no mundo e cerca de 409 000 mortes. Atualmente, a OMS recomenda a utilização de uma terapia combinada à base de artemisinina (ART) e derivados (ACTs), que conjuga um derivado de semivida curta com um derivado de longa semivida. Contudo, o maior desafio nestas terapêuticas é o facto do parasita *Plasmodium* desenvolver resistências aos antimaláricos mais rapidamente do que são introduzidos novos compostos. Já estão descritas resistências à grande maioria dos fármacos, incluindo aos derivados de artemisinina que fazem parte da terapêutica atualmente recomendada. O desenvolvimento de complexos organometálicos no campo da medicina tem progredido rapidamente na última década, sendo explorado o seu potencial como agentes antimaláricos. A ferroquina, um análogo ferroceno da cloroquina, tem sido um agente organometálico antimalárico particularmente bem-sucedido, uma vez que apresenta uma atividade elevada e grande seletividade contra estirpes resistentes de *P. falciparum*. Apesar do sucesso da ferroquina, com o constante aparecimento de resistências, continua a ser necessário procurar novas alternativas. Desta forma, foram realizados testes *in vitro* com dois objetivos: otimizar as condições do teste de suscetibilidade com SYBR™ Green I e avaliar a atividade antimalárica de cinco compostos organometálicos (RuGly1, RuGly2, TM34, PF1 e PF2) em culturas de três estirpes de *P. falciparum* (3D7, IPC5202 (1240) e Dd2). Os resultados obtidos permitiram concluir que foram otimizadas as condições do teste de suscetibilidade e que todos os compostos testados apresentavam atividade antimalárica em pelo menos uma das estirpes resistentes, corroborando o potencial antimalárico dos complexos organometálicos. Os compostos TM34 e PF1 foram os compostos mais promissores, apresentando valores de IC₅₀ inferiores a 100 nM.

Palavras-chave: malária, compostos organometálicos, *Plasmodium falciparum*, resistência, antimaláricos, cloroquina, SYBR Green I, IC₅₀.

ABSTRACT

Exploring bioorganometallic compounds with ruthenium moieties as antimalarials

Beatriz Rodrigues Duarte

Malaria is one of the most important parasitic diseases in the world, caused by five species of parasites of the genus *Plasmodium*. The World Health Organization (WHO) estimates that, in 2019, there were 229 million new cases and around 409 000 deaths. Currently, the WHO recommends the use of artemisinin-based combination therapy (ACTs), combining a short half-life drug with a long half-life drug. The *Plasmodium* parasite develops resistance to antimalarials faster than new compounds are developed and approved, and there is already resistance to most available therapies, including artemisinin derivatives that are part of the currently recommended therapy. The development of organometallic complexes in the medical field has progressed rapidly over the past decade. Ferroquine, a ferrocene analog of chloroquine, has been a particularly successful antimalarial organometallic agent since it has high activity and high selectivity against resistant strains of *P. falciparum*. Despite the success of ferroquine, with the constant appearance of new resistances, it is still necessary to look for new alternatives. Thus, *in vitro* tests were carried out with two objectives: to optimize the conditions of the susceptibility test with SYBR[™] Green I and to evaluate the antimalarial activity of five organometallic compounds (RuGly1, RuGly2, TM34, PF1 and PF2) in cultures of three different strains of *P. falciparum* (3D7, IPC5202 (1240) and Dd2). The results obtained allowed to conclude that the conditions of the susceptibility test were optimized and that all tested compounds had antimalarial activity in at least one of the resistant strains. Compounds TM34 and PF1 were the most promising, with IC₅₀ values below 100 nM.

Key words: malaria, organometallic compounds, *Plasmodium falciparum*, resistance, antimalarials, chloroquine, SYBR Green I, IC₅₀.

ABREVIATURAS

ABC - ATP – *Binding Cassette*

ACT – *Terapia combinada de derivados de artemisinina*

ARDS – *Síndrome de dificuldade respiratória aguda*

ART – *Artemisinina*

ATM – *Artemeter*

ATN – *Artesunato*

ATP – *Adenosina trifosfato*

CQ – *Cloroquina*

CS – *Proteínas circunsesporozoíticas*

CSP – *Proteína circunsporozoíta principal*

DHA – *Dihidroartemisinina*

dhfr – *Dihidrofolato redutase*

dhps – *Dihidropteroato sintetase*

EDTA – *Ácido etilenodiamino tetra-acético*

Fe – *Ferro*

Fe (II) – *Ferro II*

FQ – *Ferroquina*

FPXI – *Ferriprotoporfirina IX*

HTC – *Hematócrito*

IC₅₀ – *Concentração inibitória de um fármaco, necessária para matar 50% dos parasitas*

IHMT – *Instituto de Higiene e Medicina Tropical*

iRBCs – *Eritrócitos infetados*

IR – *Índice de resistência*

IRS – *Pulverizações residuais no interior*

ITNs – *Redes mosquiteiras tratadas com inseticidas*

K13 – *Proteína Kelch 13*

LMF – *Lumefantrina*

MEF – *Mefloquina*

OMS – *Organização Mundial de Saúde*

PBS – *Tampão de fosfato e salina*

P. falciparum – *Plasmodium falciparum*

PfCytB – *Citocromo b de P. falciparum*

pfmdr1 – *Gene MDR1 de P. falciparum*

Pgh1 – *Homólogo 1B P-glicoproteína*

PQP – *Piperaquina*

PtdIns3P – *Fosfatidilinositol-3-fosfato*

QN – *Quinino alcalóide*

RBCs – *Eritrócitos*

RPMI – *Meio de cultura (“Roswell Park Memorial Institute”)*

Ru – *Ruténio*

Ru (II) – *Ruténio II*

SP – *Sulfadoxina-pirimetamina*

TRAP – *Proteínas adesivas relacionadas com a trombospondina*

ts – *Timidilato sintetase*

uRBCs – *Eritrócitos não infectados*

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| AGRADECIMENTOS..... | IV |
| RESUMO..... | V |
| ABSTRACT..... | VI |
| ABREVIATURAS..... | VII |
| ÍNDICE..... | II |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | IV |
| ÍNDICE DE TABELAS..... | V |
| I – INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1. MALÁRIA..... | 2 |
| 1.1.1. Distribuição geográfica da malária..... | 3 |
| 1.1.2. Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> spp..... | 4 |
| 1.1.3. Biologia do <i>Plasmodium</i> spp..... | 6 |
| 1.1.4. Estratégias de prevenção e tratamento..... | 7 |
| 1.1.4.1. Controlo vetorial..... | 7 |
| 1.1.4.2. Vacinação..... | 7 |
| 1.2. ANTIMALÁRICOS..... | 7 |
| 1.2.1. Resistência aos antimaláricos..... | 9 |
| 1.2.2. Resistência à cloroquina..... | 11 |
| 1.3. COMPOSTOS ORGANOMETÁLICOS..... | 12 |
| 1.3.1. Compostos organometálicos utilizados como antimaláricos..... | 12 |
| 1.3.2. Alvos parasitários dos compostos organometálicos..... | 13 |
| 1.3.3. Desenvolvimento de novos compostos organometálicos..... | 14 |
| II – OBJETIVOS..... | 15 |
| 2.1. Objetivo Geral..... | 16 |
| 2.2. Objetivos Específicos..... | 16 |
| III – MATERIAIS E MÉTODOS..... | 17 |
| 3.1. MATERIAL BIOLÓGICO..... | 18 |
| 1.3.4. Estirpes de <i>Plasmodium falciparum</i> | 18 |
| 1.3.5. Eritrócitos humanos não parasitados a 50%..... | 18 |
| 3.2. REAGENTES E SOLUÇÕES..... | 19 |
| 3.2.1. Meio de cultura RPMI completo (RPMIc)..... | 19 |
| 3.2.2. Solução PBS (Phosphate Buffered Saline) estéril..... | 19 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.2.3. | Solução Corante Giemsa a 20% (v/v)..... | 19 |
| 3.2.4. | Água tamponada (pH = 7,2)..... | 19 |
| 3.2.5. | Solução A (descongelamento)..... | 19 |
| 3.2.6. | Solução B (descongelamento)..... | 20 |
| 3.2.7. | Solução C (descongelamento)..... | 20 |
| 3.2.8. | Solução de limpeza do citómetro de fluxo..... | 20 |
| 3.2.9. | Solução de SYBR™® Green I..... | 20 |
| 3.3. | DESCRIÇÃO DE TÉCNICAS..... | 20 |
| 3.3.1. | Descongelamento de amostras criopreservadas de <i>P. falciparum</i> | 20 |
| 3.3.2. | Cultura <i>in vitro</i> de <i>Plasmodium falciparum</i> e manutenção..... | 21 |
| 3.3.3. | Coloração de Giemsa em esfregaço..... | 21 |
| 3.3.4. | Determinação da parasitemia..... | 21 |
| 3.4. | METODOLOGIA..... | 22 |
| 3.4.1. | Ensaio de suscetibilidade <i>in vitro</i> de <i>P. falciparum</i> (citometria de fluxo)..... | 22 |
| 3.4.2. | Determinação do valor de IC ₅₀ | 24 |
| 3.4.3. | Determinação do Índice de Resistência..... | 24 |
| IV | – RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 25 |
| 4.1. | Otimização das condições do teste de suscetibilidade na estirpe 3D7..... | 26 |
| 4.2. | Atividade antimalárica <i>in vitro</i> | 28 |
| 4.2.1. | Ensaio de suscetibilidade..... | 29 |
| VI | - REFERÊNCIAS..... | 36 |
| VII | – APÊNDICES..... | 41 |
| 4.3. | APÊNDICE I..... | 43 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-------------------------------------|
| Figura 1 - Representação da distribuição geográfica de casos de malária, por país, em 2019. Adaptada de (WHO,2020). | 3 |
| Figura 2 - Ciclo de vida do Plasmodium falciparum. Adaptado de (CDC, 2020). | 4 |
| Figura 3 - Organização morfológica esquemática do Plasmodium falciparum. Adaptado de (Wunderlich et al., 2012). | Erro! Marcador não definido. |
| Figura 4 - Mapa detalhado da distribuição de resistências de P. falciparum à CQ, SP e ART em África e Sudoeste Asiático. Cada ponto representa uma região de emergência de uma resistência a um fármaco (WHO, 2019)..... | 10 |
| Figura 5 - Esquema da placa de 96 poços de fundo plano do ensaio de suscetibilidade in vitro de P. falciparum usando SyBR Green I. | 23 |
| Figura 6 - Configurações do laser para obtenção de dados, através de citometria de fluxo. | 24 |
| Figura 7 - Estratégia de gating usada para detetar e registar a parasitemia das amostras testadas através da definição de populações de eventos que detetam o SYBR Green I. | 27 |
| Figura 8 - Curvas de dose-resposta para P. falciparum, para os três controlos testados: A – cloroquina, CQ; B – primaquina, PQ e C - DHA..... | 29 |
| Figura 9 - Curvas de dose-resposta para P. falciparum, para os cinco compostos testados: A - RuGly1; B - RuGly2; C - TM34; D - PF1 e E - PF2..... | 30 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Fármacos utilizados como antimaláricos na infecção por <i>P. falciparum</i> | 8 |
| Tabela 2 - Parasitémia (%), calculada por citometria de fluxo e microscopia ótica, após incubação de 72 horas..... | 28 |
| Tabela 3 - Valores de IC50 para <i>P. falciparum</i> , calculados por citometria de fluxo com SYBR Green I, para os novos compostos testados e controlos após 72 horas de incubação. | 31 |

I – INTRODUÇÃO

1.1. MALÁRIA

A malária é uma doença parasitária causada por um protozoário do género *Plasmodium*, um grupo taxonómico amplo e diverso que inclui parasitas de pássaros, répteis, roedores, macacos e humanos (Meibalan and Marti, 2017). Existem cinco espécies que podem infetar o ser humano. *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*, sendo o *P. falciparum* responsável pela maioria dos casos graves ou fatais (WHO, 2020; Despommier et al., 1995). Em 2017, foi demonstrada a capacidade do parasita *P. simium* infetar seres humano, além de macacos, correspondendo a uma zoonose (Brasil et al., 2017). A malária humana é transmitida pela picada de um mosquito fêmea do género *Anopheles*, que injeta o parasita na corrente sanguínea do hospedeiro (Gomes et al., 2011).

A doença malária pode ser classificada em malária não complicada ou malária severa (Silvie et al., 2008; Wiley, 2014). Os sinais e sintomas de malária não complicada são muito similares a outras doenças febris. Estes compreendem dores de cabeça, fadiga, desconforto abdominal, muscular e dores nas articulações, normalmente acompanhados por febre, arrepios, suores e vômitos (Silvie et al., 2008). Em crianças, é comum surgirem outros sintomas, tais como letargia, falta de apetite e tosse. Caso não exista tratamento, e a infeção tenha ocorrido por *P. falciparum*, a doença pode progredir para malária severa. Esta, geralmente, manifesta-se de diversas formas: coma (malária cerebral), acidose metabólica, anemia severa, hipoglicemia, falência renal ou edema pulmonar (Guerrant, 2006). Se não for tratada, a malária grave é fatal na maioria dos casos (WHO, 2015).

O diagnóstico passa pela observação ao microscópio da presença de parasitas no sangue, ou a realização de um teste rápido ao sangue (WHO, 2019). O diagnóstico por microscopia ótica tem duas vertentes consoante o objetivo do diagnóstico: a gota espessa (para detetar a presença do parasita) e o esfregaço (para a identificação da espécie).

A malária é a segunda doença infecciosa com maior impacto na história mundial, pois, a seguir à tuberculose, é a patologia que mais mata dentro das várias doenças transmissíveis no mundo (WHO, 2019).

1.1.1. Distribuição geográfica da malária

Milhões de pessoas são afetadas anualmente ao longo das regiões tropicais e subtropicais, principalmente na África, América do Sul e Central, Índia, Oceânia e Sudoeste Asiático (Su et al., 2019). A OMS estima que, em 2019, ocorreram 229 milhões de casos no mundo e cerca de 409 000 mortes. Cerca de 85% dos casos de malária a nível mundial, concentravam-se em 19 países: Índia e 18 países africanos. Mais de 50% dos mesmos ocorreram na Nigéria (25%), República Democrática do Congo (12%), Uganda (5%) e Costa do Marfim, Moçambique e Níger (4%, cada). Crianças com idades inferiores a 5 anos representam o grupo mais afetado, com 67% das mortes por malária, em 2019 (WHO, 2020).

A taxa de incidência de malária, a nível global, diminuiu entre 2010 e 2019. Na Figura 1 é possível observar a distribuição geográfica, por país, em 2019 (WHO, 2020).

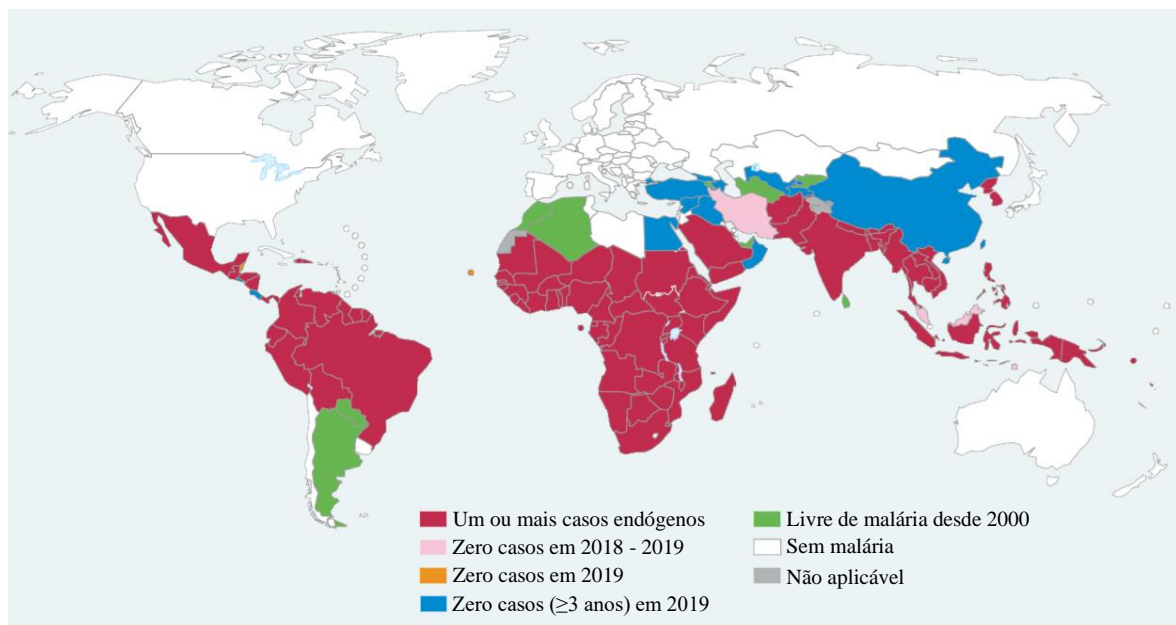


Figura 1 - Representação da distribuição geográfica de casos de malária, por país, em 2019. Adaptada de (WHO,2020).

1.1.2. Ciclo de vida do *Plasmodium* spp.

Todas as espécies de *Plasmodium* capazes de infectar humanos partilham um ciclo de vida semelhante (Gaur et al., 2016). Para este ser completo, são necessários dois hospedeiros: um vertebrado, o *Homo Sapiens*, e um invertebrado, um mosquito *Anopheles* spp (Cowman and Crabb, 2006). O ciclo biológico de *P. falciparum* (Figura 2) pode ser dividido em duas fases: a fase assexuada ou esquizogónica e a fase sexuada ou esporogónica. A fase assexuada ocorre no humano, primeiro no fígado (fase pré-eritrocitária) e depois nos eritrócitos (fase eritrocitária). A fase sexuada ocorre no mosquito (Cowman and Crabb, 2006).

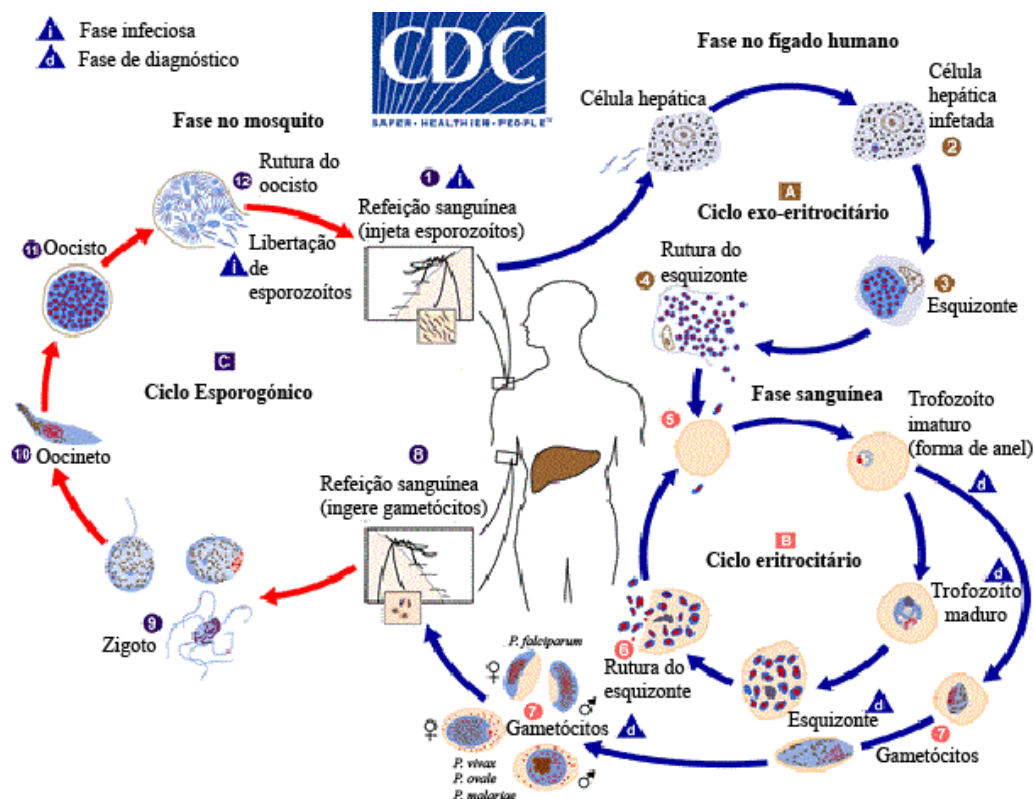


Figura 2 - Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*. Adaptado de (CDC, 2020).

O ciclo de vida do *P. falciparum* inicia-se após a picada e consequente alimentação sanguínea da fêmea do mosquito do género *Anopheles*, num hospedeiro vertebrado. O mosquito inocula os esporozoítos infetantes, que entram na corrente sanguínea e migram até ao fígado (Mota and Rodriguez, 2002). Uma vez dentro das células do fígado, ocorre a divisão assexuada do parasita do tipo esquizogónica, originando-se assim esquizontes tecidulares e, posteriormente, um elevado número de merozoítos (Cox, 2002;

Despommier et al., 1995). O ciclo assexuado é característico pela sua sincronização e periodicidade, completando um ciclo de invasão em 48 horas. Nos hepatócitos, ocorre a maturação, que requer 5 a 7 dias, sendo que cada esporozoíto produz cerca de 40 000 merozoítos(Liehl et al., 2015; Mota, 2001).

Quando os merozoítos são libertados do fígado, entram na corrente sanguínea, invadem os eritrócitos e iniciam a fase eritrocitária da infecção (Mota, 2001). Uma vez dentro da célula, o parasita começa a diferenciar-se em trofozoítos em forma de anel (trofozoítos jovens) e, depois em trofozoítos maduros. Estes estabilizam os grupo heme da hemoglobina (Moore et al., 2006). Sendo este grupo altamente tóxico para o parasita, é sequestrado dentro da célula, através da sua conversão para uma forma insolúvel, a hemozoína. Esta acumula-se no vacúolo digestivo do parasita, na forma de cristais. A quantidade e o tamanho dos cristais de hemozoína depende do estadio de desenvolvimento do parasita, sendo que é detetada em menor quantidade no estadio de trofozoítos, na fase de anel, e em maior quantidade no estadio de esquizonte (Moore et al., 2006). Os trofozoítos maduros sofrem divisão assexuada, esquizogonia, e tornam-se esquizontes compostos por merozoítos. Este estadio utiliza a hemoglobina como fonte de aminoácidos (Milani et al., 2015), de forma a garantir o crescimento do parasita. Com a consequente destruição da hemácia, ocorre a libertação dos merozoítos na corrente sanguínea e a invasão de novos eritrócitos. É importante realçar que nem todos os merozoítos se desenvolvem de forma assexuada. Alguns diferenciam-se em gametócitos, formas sexuadas do ciclo.

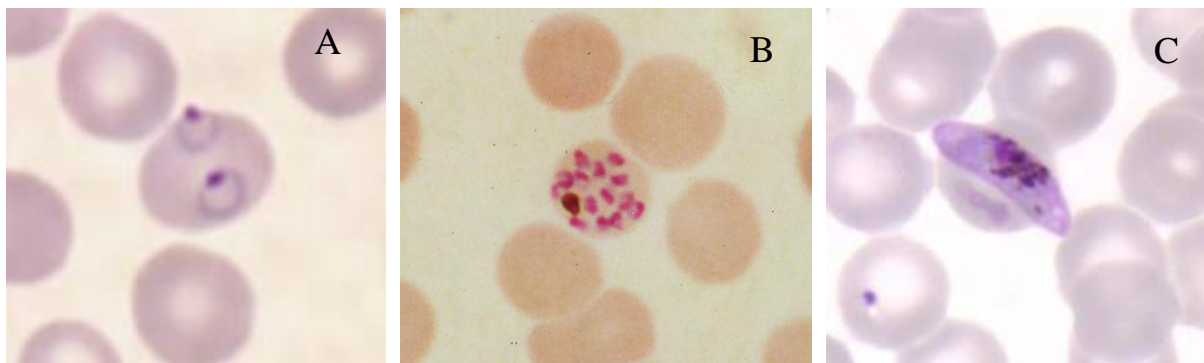
Durante a refeição sanguínea pelo mosquito fêmea *Anopheles*, esta ingere as formas sanguíneas do parasita, mas apenas os gametócitos se desenvolvem e iniciam a fase esporogónica do ciclo. A gametogénese inicia-se no intestino médio do mosquito, resultando em dois tipos de gâmetas: o macrogâmeta, originado pelo gametócito feminino, e oito microgâmetas, originado pelo gametócito masculino através de exflagelação. Cada um destes microgâmetas pode fertilizar um macrogâmeta, formando um ovo ou zigoto (diploide) (Despommier et al., 1995). O resultado da fertilização origina oocinetos (única forma diploide no ciclo), que penetram a parede do intestino, alojando-se no epitélio do intestino médio, denominando-se, neste momento, oocisto. Esta transformação ocorre no período de 24 horas após a refeição sanguínea. De seguida, inicia-se o processo de multiplicação esporogónica, que consiste em sucessivas divisões

meióticas e mitóticas, gerando elevados números de esporozoítos (cerca de 1000 esporozoítos por cada oocisto) nas glândulas salivares (Despommier et al., 1995). Quando ocorre uma nova refeição sanguínea pelo mosquito fêmea, os novos esporozoítos são injetados na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, reiniciando um novo ciclo.

1.1.3. Biologia do *Plasmodium* spp.

O *Plasmodium* é um protozoário que pertence ao filo Apicomplexa, um grupo onde se inserem diversos eucariotas que apresentam um complexo apical especializado, que permite o parasita invadir e estabelecer-se em células hospedeiras (Lim and McFadden, 2010; Marchiafava, 1885). Este insere-se na ordem Haemosporida (parasitas intraeritrocitários) e na família Plasmodiidae (Adl et al., 2012).

Os estadios sanguíneos do *P. falciparum* podem tomar diferentes formas, consoante a fase do ciclo de vida, tal como observado na Figura 3 (Hopkins et al., 1999).



Na fase assexuada do ciclo eritrocitário, durante a invasão do eritrócito pelo merozoíto, ocorre a inclusão do parasita numa invaginação da membrana, chamado vacúolo parasitóforo, separado do citoplasma do eritrócito (Bakar et al., 2010). Para suportar o seu crescimento e replicação, o parasita consome o citosol do eritrócito e digere o seu constituinte principal, a hemoglobina, num organelo ácido especializado, chamado de vacúolo digestivo (Bakar et al., 2010; Nyboer et al., 2018). A degradação proteolítica da hemoglobina resulta na libertação do grupo heme, sendo este tóxico para o parasita.

Assim, a destoxificação do grupo heme e formação da hemozoína ou pigmento malárico, é essencial para a sobrevivência do parasita no eritrócito (Wunderlich et al., 2012).

1.1.4. Estratégias de prevenção e tratamento

A perspectiva de um mundo livre de malária ainda está longe, e um dos grandes obstáculos para a sua eliminação é o complexo ciclo de vida do parasita. Ao longo dos anos têm sido desenvolvidas várias estratégias com esse fim.

1.1.4.1. Controlo vetorial

O controlo vetorial é eficaz na prevenção da infeção e na redução da transmissão da doença (Benelli et al., 2016). As medidas de controlo passam pela utilização de redes mosquiteiras tratadas com inseticidas (ITNs) e pulverizações residuais no interior das habitações (IRS). Além destes dois métodos principais, existem outros métodos como a modificação/manipulação do habitat, medidas de proteção pessoal (WHO, 2019) e manipulação genética dos mosquitos (Benelli et al., 2016). As desvantagens do controlo vetorial são dependerem do utilizador, das condições ambientais e geográficas e do próprio mosquito (Benelli et al., 2016).

1.1.4.2. Vacinação

Atualmente, existem diversas vacinas em desenvolvimento, que procuram atuar em diferentes fases do ciclo de vida do *Plasmodium*. A vacina mais avançada contra o *P. falciparum*, chamada RTS,S, encontra-se na fase IV dos ensaios clínicos, já estando a ser aplicada em alguns países africanos (Draper et al., 2018; Gosling and Seidlein, 2016). Visto que ainda não existe nenhuma vacina eficaz a longo prazo, é necessário continuar paralelamente, o desenvolvimento de novas estratégias, tais como novos antimaláricos (Kennedy and Read, 2018).

1.2. ANTIMALÁRICOS

Existem diversos antimaláricos, que diferem no seu modo de ação, consoante as diferenças regionais das resistências do parasita e do acesso das populações ao medicamento (Hooft van Huijsduijnen and Wells, 2018).

O desenvolvimento de novos medicamentos é crucial, uma vez que atualmente, o *P. falciparum* já desenvolveu resistência à maioria dos fármacos disponíveis (Tabela 1). Estes novos antimaláricos podem derivar de medicamentos já existentes ou serem sintetizados através de novos compostos que tenham diferentes alvos no parasita (Cui et al., 2015).

Tabela 1 - Fármacos utilizados como antimaláricos na infecção por *P. falciparum*.

| Grupo do fármaco | Antimalárico | Utilização (WHO, 2019) | Mecanismo de ação | Mecanismo de resistência |
|---------------------------------|---|---|--|--|
| Antifolatos | Pirimetamina Proguanil Sulfadoxina | ACT's Prevenção em crianças Prevenção na gravidez | Inibição da via metabólica dos folatos (Gregson and Plowe, 2005) | Mutações nos genes <i>PfDHPS</i> e <i>PfDHFR</i> (Sibley et al., 2001) |
| Quinolinas e álcoois arilaminas | Cloroquina Quinino Amodiaquina Mefloquina Primaquina Píperaquina Lumefantrina | ACT's Tratamento de malária severa Tratamento na gravidez Profilaxia | Impedimento da destoxificação do grupo heme (Ferreira, 2004) | Mutações nos genes <i>PfMDR</i> e <i>PfCRT</i> . (Haldar et al., 2018) |
| Endoperóxidos | Artemisinina Dihidroartemisina Arteméter Artesunato | ACT's Tratamento de malária severa Redução da transmissão | Indução <i>stress</i> oxidativo (Gomes et al., 2011) | Mutações no gene <i>PfK13</i> (Ariey et al., 2014) |
| Hidroxinaftoquinona | Atovaquona | Profilaxia Tratamento de malária não complicada em áreas não endêmicas | Inibição do complexo bc1 (Nixon et al., 2013) | Mutações no gene <i>Pfcytb</i> (Vaidya and Mather, 2000) |
| Antibióticos | Clindamicina Tetraciclina | Profilaxia Tratamento na gravidez | Inibição da síntese proteica (Dharia et al., 2010) | Mutações no rRNA do apicoplasto (Dahl and Rosenthal, 2007) |

A utilização da artemisinina (ART) disseminou-se no final da década de 90, e atualmente, continua a ser recomendada pela OMS em combinação com outros fármacos, como tratamento de primeira linha contra o *P. falciparum* (WHO, 2020). Esta atua contra todas as fases sanguíneas do parasita, e após administração permanece na corrente sanguínea do paciente, convertendo-se em dihidroartemisinina (DHA), metabólito ativo (Tekete et al., 2009). Porém, apresenta uma semivida muito curta, de 2 a 5 horas, o que levou ao desenvolvimento de novos compostos derivados da ART, que apresentam uma semivida mais longa (Greenwood, 2010).

Atualmente, a OMS recomenda a utilização de uma terapia combinada à base de ART ou um derivado, de semivida curta com um fármaco de semivida mais longa (ACTs). Assim, é possível obter um tratamento mais eficaz com uma curta duração, nomeadamente até 3 dias (Qiguin and R. Hickman, 2015; WHO, 2020).

Consoante a distribuição geográfica das zonas endémicas e as suas respetivas resistências, podem ser tomadas diferentes combinações de ACTs. As mais recomendadas são (WHO, 2020):

- ATM + Lumefantrina
- ATN + Amodiaquina
- ATN + Mefloquina
- DHA + Piperaquina
- ATN + Sulfadoxina-pirimetamina
- ATN + Pironaridina

1.2.1. Resistência aos antimaláricos

Em 1987, a OMS definiu a resistência a antimaláricos como “a habilidade de uma estirpe de parasita sobreviver e/ou multiplicar-se apesar da administração e absorção de um fármaco em doses iguais ou superiores às habitualmente recomendadas, respeitando os limites de tolerância do paciente” (WHO, 2010).

A Figura 4 apresenta a distribuição de algumas resistências descritas para *P. falciparum*, em 2019.

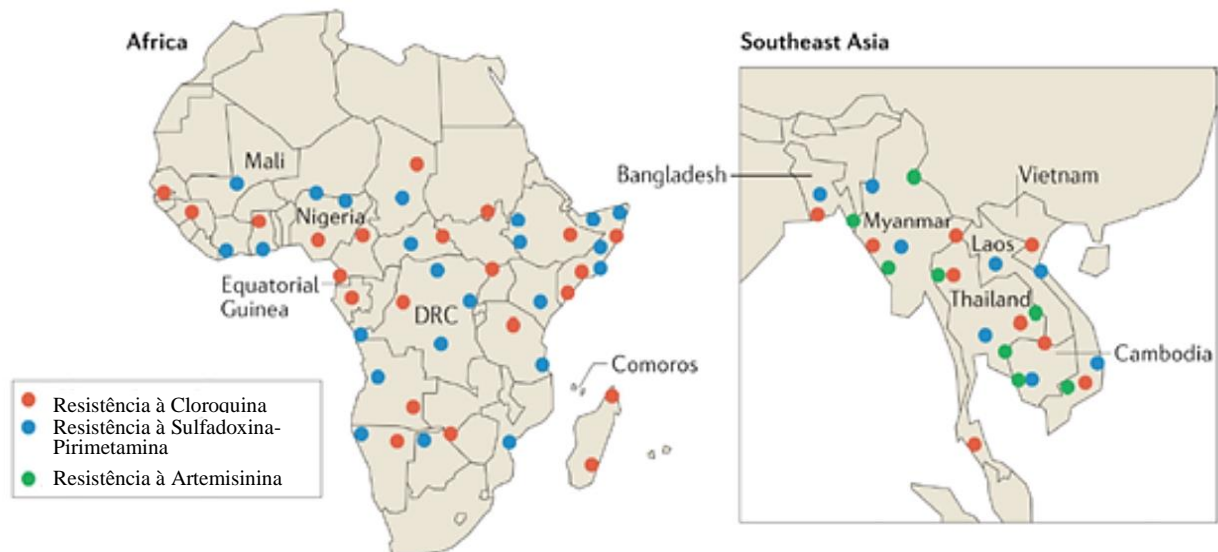


Figura 3 - Mapa detalhado da distribuição de resistências de *P. falciparum* à CQ, SP e ART em África e Sudoeste Asiático. Cada ponto representa uma região de emergência de uma resistência a um fármaco (WHO, 2019).

A resistência a fármacos pode ser identificada por um mecanismo catalítico direto, ocorrendo devido a uma amplificação do gene codificante da enzima ou do transportador alvo que bombeia o fármaco para fora do parasita. Adicionalmente, a resistência pode ser mediada por processos que mitigam a toxicidade induzida pelo medicamento (Haldar et al., 2018).

Tal como indicado na Tabela 1, a resistência aos antifolatos é originada por mutações pontuais nas regiões codificantes do centro ativo da enzima bifuncional dihidrofolato redutase (dhfr) – timidilato sintetase (ts) e da enzima dihidropteroato sintetase (dhps) (Fernandes et al., 2007). Estas mutações pontuais parecem ser suficientes para conferir elevados níveis de resistências, explicando assim a rápida falha terapêutica deste medicamento (Sibley et al., 2001).

A atovaquona associada ao proguanil origina o medicamento produzido pela GlaxoSmithKline, chamado Malarone (Haldar et al., 2018). Devido ao seu custo elevado e ao surgimento de resistências, este fármaco é utilizado geralmente por viajantes e não por populações residentes em países endêmicos. A atovaquona tem como alvo o citocromo b do *P. falciparum* (*PfCytB*), que é um doador de elétrons mitocondrial. Mutações no *Pfcytb*, levam a alterações na atividade catalítica, conferindo assim

resistência à atovaquona (Vaidya and Mather, 2000). Notavelmente, parasitas que apresentam mutações no *pfcytb*, demonstram uma diminuição na transmissão para mosquitos. Assim, apesar do parasita desenvolver resistência à atovaquona, esta não se dissemina facilmente, pelo que o fármaco Malarone é útil como profilaxia em estratégias de eliminação, onde é importante bloquear a transmissão para vetores (Vaidya and Mather, 2000).

Em relação à artemisinina e seus derivados, estudos demonstraram a ligação entre a resistência do parasita e mutações no gene codificante para a proteína Kelch 13 (K13) (Almeida et al., 2016), que está envolvida no crescimento celular, proliferação, diferenciação e sobrevivência do *Plasmodium* (Gomes et al., 2011; Haldar et al., 2018).

1.2.2. Resistência à cloroquina

A cloroquina (CQ) é um fármaco que atua por acumulação de concentrações muito elevadas no vacúolo digestivo do parasita (Tekete et al., 2009). No vacúolo, interfere com a destoxificação dos grupos heme e a polimerização da hemozoína. A polimerização dos grupos heme libertados na digestão da hemoglobina é bloqueada, o que impede a formação da hemozoína (Haldar et al., 2018), e conseqüentemente, a destoxificação da ferriprotoporfirina IX (FPIX). Desta forma, ocorre a acumulação deste composto a níveis letais, quer a nível do vacúolo digestivo do parasita, quer a nível do citoplasma (Ferreira, 2004; Sharma, 2005).

A resistência do *P. falciparum* à cloroquina parece estar associada ao aumento da capacidade do parasita em expelir o fármaco a uma taxa muito mais elevada, cerca de 40 a 50 vezes mais. Desta forma, são mantidos níveis de concentração intracelular de cloroquina abaixo da concentração necessária para inibir metabolicamente a formação da hemozoína (Ferreira, 2004; Haldar et al., 2018). Esta expulsão rápida deve-se a mutações nos genes *PfMDR* e *PfCRT*, que estão envolvidos na acumulação da cloroquina no vacúolo digestivo do parasita (Haldar et al., 2018).

1.3. COMPOSTOS ORGANOMETÁLICOS

Compostos organometálicos são complexos onde existe uma ligação entre um metal e um carbono, fazendo este último parte de um grupo orgânico (Chavain and Biot, 2010). Os compostos organometálicos constituem um grande grupo de substâncias importantes no desenvolvimento químico e farmacêutico (Chavain and Biot, 2010).

O desenvolvimento de complexos organometálicos no campo da medicina tem progredido rapidamente na última década (Biot and Dive, 2010). Os complexos metálicos são especialmente atrativos para o desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que estes oferecem possibilidades estruturais ou físico-químicas que um composto orgânico não oferece (Dive and Biot, 2008). Assim, após se observar o sucesso clínico de complexos metálicos como agentes anti cancerígenos e anti reumáticos, surgiu o interesse de estudar compostos organometálicos como potenciais agentes antimaláricos (Biot and Dive, 2010; Salas et al., 2013).

1.3.1. Compostos organometálicos utilizados como antimaláricos

As propriedades físico-químicas inerentes aos complexos organometálicos podem oferecer diferentes modos de ação e atingir diferentes alvos nos parasitas (Mbaba et al., 2020). Vários grupos metálicos foram testados até à data, sendo que apenas dois obtiveram atividade anti-malárica assinalável: o grupo do ferroceno (organometálicos com centro metálico de ferro (Fe)) e os metais do grupo da platina, nomeadamente o ruténio (Ru) (Mbaba et al., 2020).

O ferroceno é um composto metálico que pode ser complexado com diferentes antimaláricos. Este apresenta atividade antimalárica quando complexado com a artemisinina e derivados da quinolina (quinino, cloroquina, amodiaquina e mefloquina) (Xiao et al., 2020).

Os organometálicos complexados com metais do grupo da platina, nomeadamente com Ru apresentam um comportamento análogo ao da ferroquina, chamado de rutenocina (Martínez et al., 2017).

De um ponto de vista farmacêutico, o ruténio é considerado o metal de transição mais promissor para o desenvolvimento de novas drogas devido à sua seletividade e baixa citotoxicidade (Macedo et al., 2016).

O complexo organometálico de Ru associado à CQ tem sido estudado como potencial antimalárico. No parasita, este complexo demonstra atuar em diferentes fases do ciclo de vida do *Plasmodium*. À semelhança da CQ, a rutenoquina apresenta atividade antimalárica em todas as formas sanguíneas assexuadas do parasita (anéis, trofozoítos e esquizontes) e ainda, os autores observaram forte atividade contra as formas sanguíneas sexuadas (gametócitos) (Macedo et al., 2016; Salas et al., 2013).

Estudos comparando a atividade do complexo de Ru com a atividade da CQ isolada, mostraram que a utilização de um complexo de Ru induziu a morte dos parasitas mais rapidamente e mostrou uma atividade mais prolongada, observando-se redução de parasitémia após 18 horas de contacto com o complexo. Esta atividade antimalárica é atrativa, uma vez que se torna possível encurtar o tratamento e prevenir a infeção de novos hospedeiros (Macedo et al., 2016; Martínez et al., 2017).

1.3.2. Alvos parasitários dos compostos organometálicos

A complexação da CQ com o ferroceno, origina a ferroquina, que influencia a oxidação do Fe (II) e a atividade antiparasitária (Chavain and Biot, 2010). Estudos *in vivo* mostraram que, nas mesmas quantidades, a ferroquina acumula-se 50x mais no vacúolo digestivo do que a CQ livre (Salas et al., 2013).

A atividade da rutenoquina pode ter mais do que um alvo no parasita. Por um lado, o seu mecanismo de ação é em parte semelhante ao da CQ, baseado na inibição da formação da hemozoína no vacúolo digestivo do parasita (Biot and Dive, 2010; Dive and Biot, 2008), resultando de uma modificação estrutural da molécula que dificulta a ação da proteína PfCRT que é responsável por secretar a CQ do vacúolo digestivo (de Souza et al., 2015). Por outro lado, esta aumenta os níveis de espécies reativas de oxigénio (ROS) na fase de trofozoítos (Macedo et al., 2016).

Para além disso, a complexação com um metal resulta na modificação da molécula de CQ, de forma que o centro metálico altera a forma, o volume, a lipofilicidade e a basicidade da molécula orgânica, e conseqüentemente, o seu comportamento farmacodinâmico, levando a uma elevada atividade antimalárica da rutenoquina em isolados resistentes à CQ (Dive and Biot, 2008).

1.3.3. Desenvolvimento de novos compostos organometálicos

O sucesso da ferroquina e da rutenoquina (de Souza et al., 2015) desencadeou uma busca por novos fármacos organometálicos antimaláricos, focando-se principalmente em híbridos metálicos associados à cloroquina ou a derivados da artemisinina (Xiao et al., 2020).

A ferroquina tem sido particularmente bem-sucedida, tendo terminado em outubro de 2019 a fase II dos ensaios clínicos com uma eficácia de cerca de 81% (Sanofi, 2020).

Apesar do potencial deste agente antimalárico, o desenvolvimento de novos organometálicos é importante, uma vez que a imergência de novas resistências à ferroquina continua a ser uma preocupação (de Souza et al., 2015). Assim, com este trabalho, estudou-se o efeito antimalárico de diferentes compostos organometálicos com ruténio no parasita.

II – OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimalárica *in vitro* de novos compostos organometálicos em estirpes sensíveis e resistentes de *Plasmodium falciparum*.

2.2. Objetivos Específicos

1. Otimizar as condições de gating do teste de suscetibilidade com SYBR™ Green I usando citometria de fluxo.
2. Avaliar a atividade antimalárica *in vitro* de novos compostos RuGly1, RuGly2, TM34, PF1 e PF2 em três estirpes de *P. falciparum* sensíveis e resistentes a diferentes fármacos

III – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. Compostos organometálicos

Os cinco compostos testados no decorrer deste trabalho, foram sintetizados na Faculdade de farmácia da Universidade de Lisboa e foram gentilmente cedidos pelo Prof.^a Dr. Pedro Florindo, para que fossem testadas suas atividades antimaláricas *in vitro*.

3.1.2. Estirpes de *Plasmodium falciparum*

3D7 (Rosario, 1981): Estirpe criopreservada da coleção do laboratório de malária do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT). A estirpe 3D7 foi originada a partir do isolado NF54 obtido inicialmente a partir de um doente em Luanda, e após diluições limitadas, sendo caracterizada pela sua sensibilidade à cloroquina.

IPC5202 (MRA-1240, MR4, ATCC Manassas Virginia®): A estirpe 1240 foi isolada em 2011, a partir de um doente no Camboja, demonstrando resistência à artemisinina (a estirpe foi disponibilizada por BEI Resources, NIAID, NIH: *Plasmodium falciparum*, estirpe disponibilizada por Didier Ménard).

Dd2 (Odulola et al., 1988): Estirpe criopreservada da coleção do laboratório de malária do IHMT. Após pressão *in vitro* com mefloquina em culturas de W2 originou-se a Dd2, resistente quer à mefloquina como à cloroquina.

3.1.3. Eritrócitos humanos não parasitados a 50%

Culturas *in vitro* de *P. falciparum* necessitam de eritrócitos não infetados (uRBCs) frescos para que ocorram novos ciclos de invasão. A colheita de sangue total venoso foi feita por um Técnico de Análises Clínicas do IHMT a dadores voluntários saudáveis portadores do grupo sanguíneo do tipo O, sem história de contacto prévio com *Plasmodium spp.*, através de punção venosa e recorrendo ao sistema SARSTEDT Monovette® com tubos suplementados com EDTA KE/9 mL. O consentimento informado foi assinado pelos dadores de sangue (Apêndice I).

O sangue total foi centrifugado a 2500 rotações por minuto (rpm) durante 3 minutos e o plasma foi aspirado. Com o objetivo de a solução ficar reduzida a eritrócitos, o *pellet* resultante da aspiração foi lavado com PBS estéril (aproximadamente 10 mL) com

recurso à centrifugação. Estes últimos passos foram repetidos 5 vezes. Após cada centrifugação, o sobrenadante foi removido por aspiração. Ao volume final de eritrócitos resultantes adicionou-se igual volume de meio RPMIc ficando a solução final com um hematócrito de 50%. A mistura foi armazenada a 4 °C, não excedendo 15 dias.

3.2. REAGENTES E SOLUÇÕES

3.2.1. Meio de cultura RPMI completo (RPMIc)

Foi preparado um meio de cultura de *Plasmodium falciparum* com um volume final de 1 L. Foi dissolvido 10,44 g de meio RPMI 1640 (biowest®), 5 g de AlbuMAX^T II (Gibco®, Life TechnologiesTM, 11021-037), 0,1 g de Hipoxantina (Sigma-Aldrich), 5,94 g de HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid) (VWR®) e 2 g de bicarbonato de sódio num litro de água ultrapura Milli-Q. A solução final foi esterilizada através da sua passagem por um filtro com poro de 0.22 µm e armazenada a 4 °C, sendo o seu pH de 7,8.

3.2.2. Solução PBS (Phosphate Buffered Saline) estéril

Adicionou-se uma pastilha de PBS (VWR®) a 200 mL de água ultrapura Milli-Q. Após a mistura ter sido autoclavada, esta foi mantida a 4 °C.

3.2.3. Solução Corante Giemsa a 20% (v/v)

A preparação da coloração de Giemsa a 20% (v/v) foi realizada ao adicionar-se 20 mL de uma solução de Giemsa puro a 80 mL de água tamponada (pH = 7,2) (VWR®), para perfazer os 100 mL de Giemsa a 20%. Após ter sido filtrada com papel de filtro, a mistura foi posteriormente armazenada a 4 °C.

O Giemsa é uma coloração de ácido nucleico usada para distinguir visualmente os parasitas de *Plasmodium spp.* das células circundantes.

3.2.4. Água tamponada (pH = 7,2)

Adicionou-se uma pastilha (VWR®) a 1 L de água ultrapura Milli-Q.

3.2.5. Solução A (descongelção)

Adicionou-se 12% de NaCl em água destilada e esterilizou-se por filtração.

3.2.6. Solução B (descongelamento)

Adicionou-se 1,6% de NaCl em água destilada e esterilizou-se por filtração.

3.2.7. Solução C (descongelamento)

Juntou-se 0,2% de dextrose a 0,9% de NaCl em água destilada e esterilizou-se por filtração.

3.2.8. Solução de limpeza do citómetro de fluxo

Adicionou-se 100 mL de água Milli-Q autoclavada a 50 g de Azida de Sódio, homogeneizou-se e foi conservada a 4 °C.

Adicionou-se 5 mL da solução previamente preparada a 1 L de água Milli-Q autoclavada.

3.2.9. Solução de SYBR™® Green I

Pipetaram-se 2 µL da solução pura de SYBR™ Green I (Invitrogen™) a 1 mL de PBS. A mistura foi congelada para armazenamento. Foram utilizadas alíquotas stock a 20 X e diluição de 0,5 X.

3.3. DESCRIÇÃO DE TÉCNICAS

3.3.1. Descongelamento de amostras criopreservadas de *P. falciparum*

Retirou-se um criotubo, da coleção de amostras criopreservadas do Laboratório de Malária UEI/ IHMT, do azoto líquido e colocou-se a 37 °C, até completa descongelamento. Mediu-se o volume e transferiu-se o conteúdo da ampola para um tubo de centrifuga de 15 mL. Adicionou-se a solução A, gota a gota, homogeneizando-se constantemente (para cada 1 mL de sangue, adicionou-se 0,2 mL da solução A). Deixou-se repousar durante 3 minutos. De seguida, adicionou-se a solução B, gota a gota, homogeneizando-se constantemente (para cada 1 mL de sangue, adicionou-se 10 mL da solução B). Centrifugou-se a 2000 rpm durante 5 minutos e rejeitou-se o sobrenadante. Posteriormente, adicionou-se a solução C, gota a gota, homogeneizando-se constantemente (para cada 1 mL de sangue, adicionou-se 10 mL da solução C). Centrifugou-se novamente a 2000 rpm durante 5 minutos e rejeitou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o *pellet* de eritrócitos em RPMI completo e os parasitas foram mantidos

nas condições de cultura. No caso de haver hemólise, fez-se primeiro uma lavagem com RPMI incompleto e só depois se prosseguiu para a cultura.

3.3.2. Cultura *in vitro* de *Plasmodium falciparum* e manutenção

As culturas de *P. falciparum* foram mantidas em eritrócitos humanos do tipo O+ em frascos de stock com um hematócrito de 3% (150 µL eritrócitos/ 3 mL meio RPMIc para frascos de cultura pequena, sem exceder os 5% de parasitemia. Os frascos de cultura foram mantidos na estufa a 37 °C, a uma atmosfera de 5% de CO₂ (v/v). O meio de cultura RPMIc foi substituído diariamente e adicionado uRBCs a cada 3-4 dias. A parasitemia foi avaliada diariamente através da coloração de Giemsa em esfregaço.

3.3.3. Coloração de Giemsa em esfregaço

Foram retiradas por capilaridade pequenas amostras dos RBCs depositados no fundo do frasco da cultura e depositados no centro de uma lâmina de vidro de microscópio, realizando de seguida um esfregaço. Posteriormente, foi fixado com metanol a 100% e corado com Giemsa a 20% durante 20 minutos.

3.3.4. Determinação da parasitemia

A análise das lâminas, a verificação do estadió de desenvolvimento do parasita e a contagem de parasitemia foi determinada através de microscopia ótica numa ampliação de 100x, com imersão de óleo. O número de iRBCs (eritrócitos infetados) foi determinado a partir da contagem de 10 campos do microscópio.

A parasitemia é uma medida quantitativa da percentagem de eritrócitos parasitados a dividir pelos eritrócitos não parasitados, sendo:

$$\% \text{ parasitemia} = \frac{n^{\circ} \text{ eritrócitos parasitados}}{n^{\circ} \text{ total de eritrócitos}} \times 100$$

3.4. METODOLOGIA

3.4.1. Ensaio de suscetibilidade *in vitro* de *P. falciparum* (citometria de fluxo)

O princípio do ensaio de suscetibilidade *in vitro* a antimaláricos é avaliar o grau de desenvolvimento dos parasitas *P. falciparum* na presença de diferentes concentrações (diluição seriada) dos compostos.

Neste ensaio, foram utilizadas culturas 3D7, IPC5202 (1240) e Dd2 de *P. falciparum* para avaliar a atividade antimalárica *in vitro* dos 5 compostos organometálicos com rutênio derivados da CQ.

Inicialmente, acertou-se o hematócrito (HTC) de 3% com eritrócitos parasitados para 0,3% e a parasitemia para 0,8% com meio de cultura e eritrócitos não parasitados. Adicionou-se 225 µL da mistura de eritrócitos parasitados (HTC 0,3% e parasitemia 0,8%) nos poços de fundo plano A1 e A2 e pipetou-se 200 µL desta mistura de eritrócitos parasitados nos restantes poços da placa, conforme ilustrado na Figura 5. Adicionou-se 25 µL do composto a testar nos poços A1 e A2. Ressuspendeu-se o conteúdo dos poços A1, A2 e transferiu-se 50 µL dessa mistura para os poços B1 e B2 e assim sucessivamente até aos poços G1 e G2, originando uma diluição de 1:4, num intervalo de concentrações testadas (10000 nM – 0,64 nM). Não se adicionou composto nos poços H1 e H2, constituindo o controlo sem composto (K). Incubou-se durante 72 horas a 37 °C, com 5% de CO₂. Foram realizados no mínimo três ensaios em duplicado.

Após esse período, adicionou-se 50 µL de solução de SYBR™ Green I (Machado et al., 2016) em PBS não estéril (0,5 X) a cada poço. Posteriormente, incubou-se durante 60 minutos a 37 °C, com 5% de CO₂, de modo a permitir a ligação do SYBR™ Green I ao ADN do parasita.

Neste ensaio, foram utilizados três controlos positivos, a cloroquina (CQ) e a dihidroartemisinina (DHA) num intervalo de concentrações testadas (1000 nM – 0,24 nM) e a primaquina (PQ) num intervalo de concentrações testadas (10000 nM – 0,64 nM), um controlo negativo (K) sem composto (poços H da placa). Estes controlos foram usados para avaliar a qualidade do ensaio.

Os poços na coluna 12 (uRBCs) foram utilizados como controlo interno, de forma a contruir as “gates” apresentadas na Figura 5.

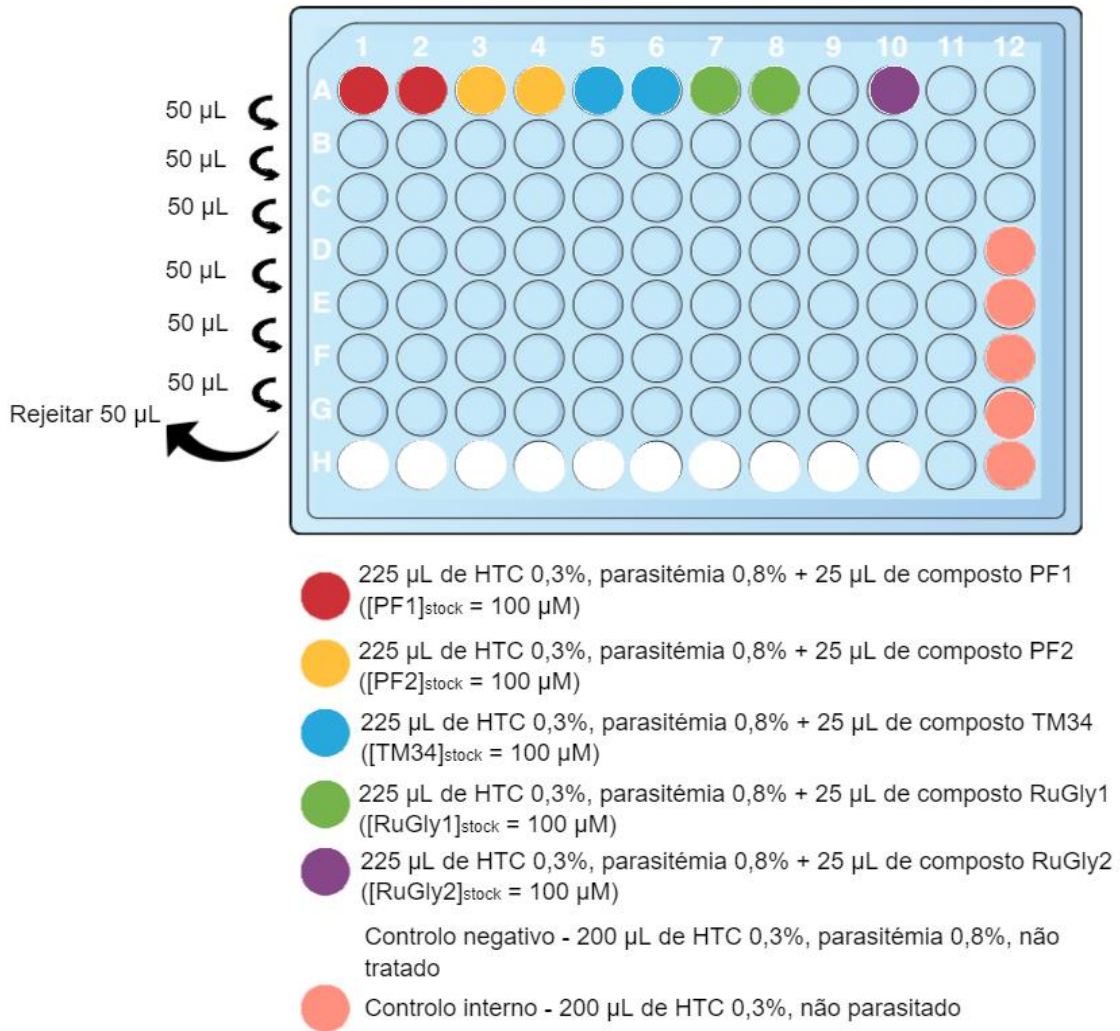


Figura 4 - Esquema da placa de 96 poços de fundo plano do ensaio de susceptibilidade in vitro de *P. falciparum* usando SyBR Green I.

As amostras foram analisadas através de citometria de fluxo (Beckman Coulter CytoFlex, modelo: A00-1-1102) obtendo dados com o *software* CytExpert. Foram gravados 10 000 eventos por amostra.

Foi necessário configurar o laser do equipamento CytExpert para obter os dados necessários e leituras de FITC, de acordo com a Figura 6.

| Gain | Threshold | Width | |
|----------|-----------|-------|----------|
| FSC | | 90 | (1~3000) |
| SSC | | 10 | (1~3000) |
| FITC | | 75 | (1~3000) |
| PE | | 130 | (1~3000) |
| PC5.5 | | 120 | (1~3000) |
| PC7 | | 270 | (1~3000) |
| APC | | 436 | (1~3000) |
| APC-A750 | | 407 | (1~3000) |

Figura 5 - Configurações do laser para obtenção de dados, através de citometria de fluxo.

3.4.2. Determinação do valor de IC₅₀

O IC₅₀ é definido como a concentração de composto que inibe o crescimento de 50% dos parasitas presentes e foi calculado a partir de uma regressão não-linear de curvas de dose-resposta resultantes da representação gráfica do logaritmo da concentração individual de cada dose de composto comparadas com o controlo não tratado. Foram calculados através do *software* Graphpad Prism v. 8.0.1.

3.4.3. Determinação do Índice de Resistência

O índice de resistência (IR) de um composto ou fármaco é definido como a razão entre o IC₅₀ de uma estirpe resistente e o IC₅₀ de uma estirpe sensível. Um IR superior a 100 corresponde a um nível alto de resistência. Um IR inferior a 10 indica um nível intermédio de resistência, enquanto que um IR perto de 1 sugere a ausência de resistência (Hastings et al., 2002; Nzila and Mwai, 2010; White and Pongtavornpinyo, 2003; Wilson et al., 1989).

IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização das condições do teste de suscetibilidade na estirpe 3D7

Ao longo do trabalho prático, a parasitemia foi controlada de duas formas: por contagem por microscopia ótica, com coloração de Giemsa, ou por citometria de fluxo.

Assim, de forma a confirmar a otimização das condições do teste de suscetibilidade com SYBR™ Green I, usando citometria de fluxo, foram realizadas contagens de parasitemia da estirpe pelos dois métodos e comparadas.

Este método baseia-se no facto de os RBCs não possuírem ADN, visto que não apresentam núcleo nem mitocôndrias. As moléculas de SYBR™ Green I formam uma ligação específica às moléculas de ADN, emitindo assim fluorescência, permitindo a sua deteção. Visto que os parasitas possuem ADN e os RBCs não, as moléculas de SYBR™ Green I ligam-se exclusivamente ao ADN dos parasitas, detetando-os.

Sabendo que a parasitemia duplica (aproximadamente) a cada 24 horas, após um ensaio com incubação de 72 horas, esta terá de ser cerca de 8x maior que no primeiro dia.

Os dados obtidos através da citometria de fluxo foram analisados com o *software* FlowJo v. 10, permitindo obter o valor de parasitemia, medindo a percentagem de eventos SYBER™ Green I positivos. Para os poços com uRBCs, hematócrito de 0,3%, a população total de RBC foi definida pela ferramenta *Auto Gate* num gráfico SSC-H vs. FSC-H (Figura 7 – A e B). Com a população RBC total definida, foi utilizada uma estratégia de *gating* (Kulkeaw et al., 2020) para separar a população iRBCs (eritrócitos infetados – detetados pelo sensor FITC), num gráfico PE-H vs. FITC-H (Figura 7 – C). Estas duas configurações foram então aplicadas a todas as amostras e a percentagem de eventos SYBER™ Green I + foi registada (Figura 7 – D). Na Figura 7B, o eixo FITC-H representa a cor verde, detetando os parasitas marcados com SYBR™ GREEN I. O eixo PE-H representa a cor amarela. Esta cor foi escolhida, uma vez que o parasita não emite a cor amarela e assim é possível existir uma distinção clara (Schuck et al., 2011).

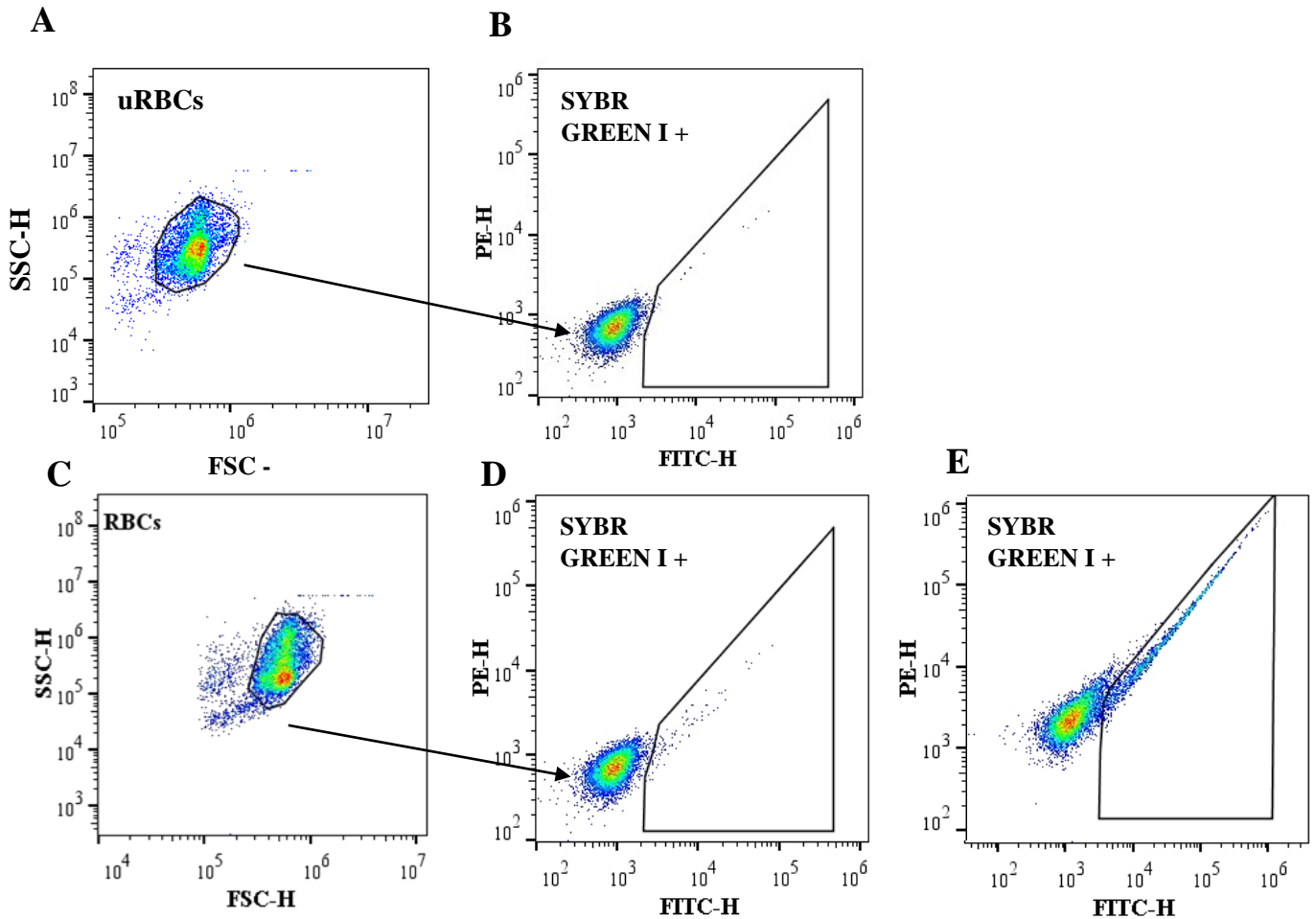


Figura 6 - Estratégia de gating usada para detetar e registar a parasitemia das amostras testadas através da definição de populações de eventos que detetam o SYBR Green I. A – Eritrócitos não infetados, uRBCs; B - Definição da população uRBCs; C – Definição da população de RBCs para uma das amostras contendo cultura de *P. falciparum* em meio RPMI e RBCs, após 72h de incubação. D – Representação de eventos positivos, após as 72h de incubação. E – Eritócitos infetados não tratados.

Durante o processo de otimização da estratégia de *gating*, foram escolhidos os eixos. Na Figura 7 - A, o eixo SSC-H representa complexidade, a granulosidade. Valores mais elevados indicam a presença de formas do parasita mais complexas, como o esquizonte, enquanto valores mais baixos, indicam formas do parasita menos complexas (forma em anel). O eixo FSC-H representa tamanho. Valores mais elevados indicam formas do parasita de maiores dimensões, como o esquizonte, e valores menores, indicam formas do parasita de menores dimensões, como a forma em anel (Grimberg, 2011).

Além das contagens diárias de parasitemia, foram feitas 3 contagens em ensaios distintos para avaliar a otimização. Cada contagem foi realizada numa cultura de *P.falciparum* 3D7, para os valores de microscopia ótica e num controlo sem fármaco para os valores

da citometria de fluxo. Estas contagens estão presentes na Tabela 2, sendo que cada linha da tabela corresponde a um ensaio independente.

Tabela 2 - Parasitemia (%) de *P. falciparum* 3D7, calculada por citometria de fluxo (controle não tratado) e microscopia ótica, após incubação de 72 horas.

| CITOMETRIA DE FLUXO (%) | MICROSCOPIA ÓTICA (%) |
|-------------------------|-----------------------|
| 9,31 | 9,6 |
| 5,29 | 6,4 |
| 4,61 | 5,6 |

Os valores de parasitemia calculados por citometria de fluxo foram obtidos através do software GraphPad. Os valores de parasitemia calculados por microscopia ótica, foram obtidos após coloração de Giemsa e calculados a partir da equação em 3.2.5.

Na Tabela 2 constam os valores observados por microscopia ótica e os obtidos por citometria de fluxo que são próximos, confirmando assim a otimização do teste de suscetibilidade com SYBR™ Green I.

Ao combinar a citometria de fluxo com o SYBR™ Green I, obteve-se uma boa resolução na separação de eritrócitos infectados e não infectados, tal como descrito por outros autores (Grimberg, 2011).

4.2. Atividade antimalárica *in vitro*

De forma a testar a atividade antimalárica *in vitro* de 5 compostos (PF1, PF2, TM34, RuGly1, RuGly2), foram realizados ensaios com SYBR™ Green I. Neste ensaio, de forma a testar a atividade antimalárica dos compostos em estudo, foram usadas três estirpes diferentes de *P. falciparum*: Dd2 e 1240 e a 3D7.

Como controlos positivos, foram utilizados três fármacos conhecidos: a CQ, a PQ e a DHA.

Inicialmente, realizou-se um ensaio nas mesmas condições apenas com uRBCs, obtendo-se um valor de parasitemia de aproximadamente zero (tal como observado na Figura 7 – B). Na Figura 7, representa-se a estratégia de *gating* para a estirpe 3D7, que

foi aplicada às restantes estirpes e para todos os ensaios, como se pode observar na Figura 9.

4.2.1. Ensaio de suscetibilidade

Foram testados os três controlos (CQ, PQ, DHA) nas três estirpes (3D7, Dd2 e 1240), obtendo as curvas de dose-resposta apresentadas na Figura 8. Os resultados apresentados foram realizados em comparação com o controlo não tratado (Figura 7 – E). Os testes foram realizados em duplicado e repetidos três vezes. Foram testados três fármacos controlo, pois apresentam perfis de resistência diferentes. Ao comparar com a literatura as curvas e respetivos IC_{50} , podemos também aferir a validade do trabalho realizado.

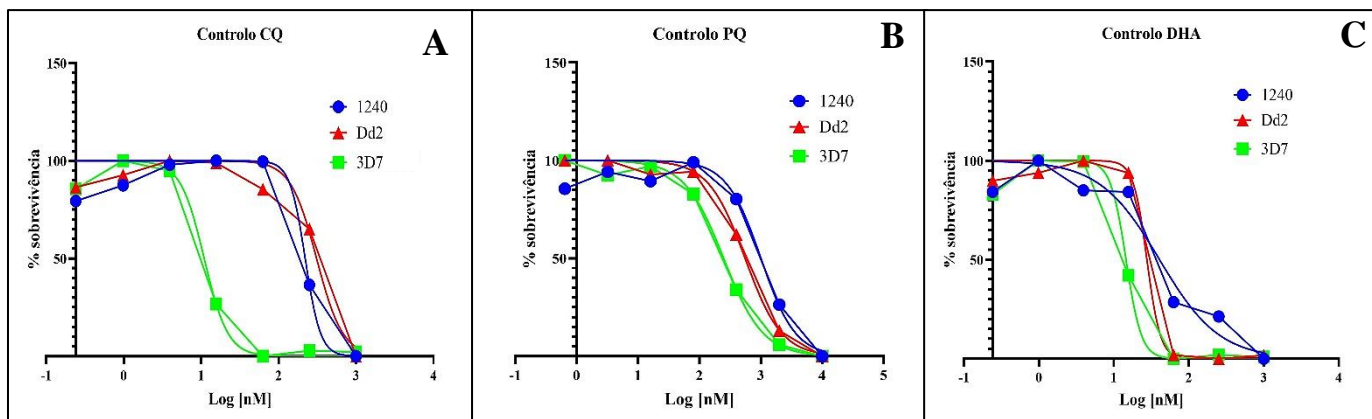


Figura 7 - Curvas de dose-resposta para *P. falciparum*, para os três controlos testados: A – cloroquina, CQ; B – primaquina, PQ e C - DHA. A curva azul representa o comportamento do fármaco na estirpe 1240, a curva vermelha para a estirpe Dd2 e a curva verde, para a estirpe 3D7. As curvas são representativas de três ensaios independentes. A normalização da % de eventos SYBR GREEN I + foi ajustada através de uma regressão não-linear.

Observando os gráficos correspondentes aos controlos, independentemente da estirpe testada, é possível verificar que quer a CQ, a PQ e a DHA apresentam típicas curvas dose-resposta sigmóides (Yang et al., 2016), ou seja, concentrações elevadas do composto correspondem a baixas percentagens de sobrevivência do parasita (Figura 8).

A Figura 9 mostra as curvas dose-resposta de cada composto em estudo (PF1, PF2, TM34, RuGly1 e RuGly2), para as diferentes estirpes 3D7, Dd2 e 1240 a partir das quais foram calculados os respetivos valores de IC_{50} .

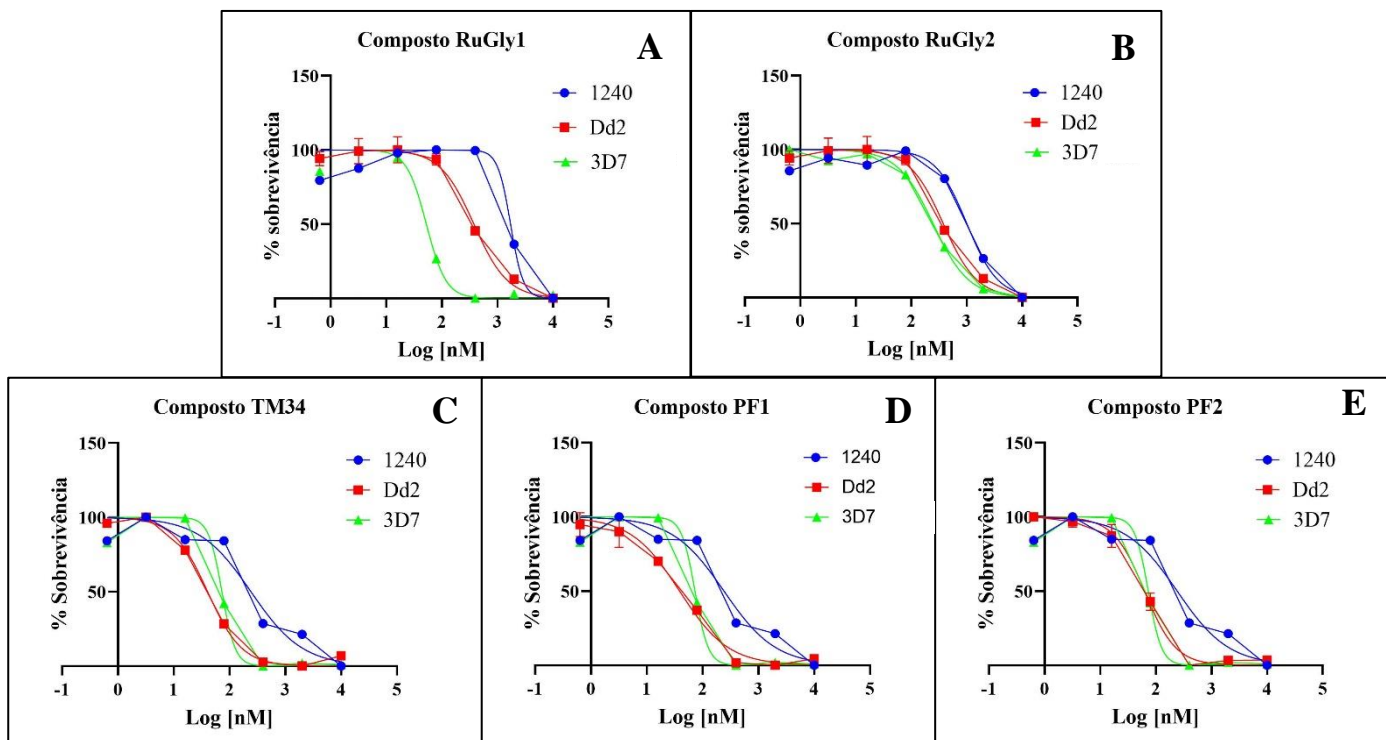


Figura 8 - Curvas de dose-resposta para *P. falciparum*, para os cinco compostos testados: A - RuGly1; B - RuGly2; C - TM34; D - PF1 e E - PF2. A curva azul representa o comportamento do fármaco na estirpe 1240, a curva vermelha para a estirpe Dd2 e a curva verde, para a estirpe 3D7. As curvas são representativas de três ensaios independentes.

No processo de desenvolvimento de antimaláricos, é tomado como referência um valor de IC_{50} inferior a $1 \mu M$ contra estadios sanguíneos, quer para estirpes sensíveis como resistentes de *P. falciparum* (Katsuno et al., 2015).

Os valores de IC_{50} calculados dos controlos e dos compostos estão apresentados na Tabela 3, juntamente com os valores do índice de resistência tanto para os fármacos controlo, como para os compostos em estudo.

Tabela 3 - Valores de IC₅₀ para *P. falciparum*, calculados por citometria de fluxo com SYBR Green I, para os novos compostos testados e controles após 72 horas de incubação.

| Composto | IC ₅₀ ± dp (nM) | | | | |
|---------------|----------------------------|---------------|------|---------------|------|
| | 3D7 | 1240 | IR | Dd2 | IR |
| CQ | 9,7 ± 0,1 | 140,4 ± 79,9 | 14,5 | 272,6 ± 69,4 | 28,1 |
| PQ | 244,5 ± 14,7 | 880,3 ± 116,3 | 3,6 | 584,6 ± 42,1 | 2,4 |
| DHA | 14,4 ± 0,01 | 46,5 ± 12,10 | 3,2 | 28,7 ± 8,5 | 1,9 |
| RUGLY1 | 219,2 ± 61,6 | 939,8 ± 299,4 | 4,3 | 325,8 ± 115,7 | 1,5 |
| RUGLY2 | 139,1 ± 54,5 | 208,9 ± 63,8 | 1,5 | 174,4 ± 34,7 | 1,3 |
| TM34 | 9,6 ± 2,9 | 98,8 ± 27,4 | 10,3 | 53,1 ± 25,2 | 5,5 |
| PF1 | 8,4 ± 0,9 | 74,2 ± 29,7 | 8,8 | 60,5 ± 29,6 | 7,2 |
| PF2 | 11,9 ± 6,5 | 78,5 ± 4,5 | 6,6 | 71,0 ± 15,5 | 5,9 |

CQ, cloroquina; PQ, primaquina; DHA, dihidroartemisinina; dp, desvio padrão. IR, índice de resistência;

Os três ensaios independentes foram realizados em triplicado. O índice de resistência (IR) foi calculado para os três fármacos controle e os cinco compostos testados, para as duas estirpes resistentes (Dd2 e 1240), em relação à estirpe sensível (3D7).

Os valores de IC₅₀ calculados dos compostos testados neste trabalho são concordantes com um estudo anterior em que foram avaliados diversos compostos organometálicos, incluindo os de rutênio (Martínez et al., 2017).

Na Tabela 3, ao analisar a resposta de cada estirpe para os diferentes compostos, observa-se que para a estirpe **3D7**, o valor de IC₅₀ do composto TM34 é semelhante ao da CQ (8,4 ± 0,9 nM). O composto PF2 apresenta um valor de IC₅₀ um pouco superior ao IC₅₀ da CQ (11,9 ± 6,5 nM) e o IC₅₀ do composto PF1 é inferior ao valor da CQ, nomeadamente 8,4 ± 0,9 nM. Estes valores são concordantes com o IC₅₀ da CQ, à qual a estirpe 3D7 é sensível. Para os compostos RuGly1 e RuGly2 observaram-se valores de IC₅₀ superiores a 100 nM, ainda assim estando abaixo do valor de referência para a CQ (1000 nM) (Katsuno et al., 2015).

Para a estirpe **1240**, verifica-se que os valores de IC_{50} dos compostos TM34, PF1 e PF2 estão todos abaixo do valor de IC_{50} observado para a CQ. Os valores de IC_{50} dos compostos RuGly1 e RuGly2 são superiores ao valor de IC_{50} da CQ, sendo que o composto RuGly1 (com um IC_{50} de $939,8 \pm 299,4$ nM), aproxima-se do valor de referência de 1 μ M. Como é possível observar na Tabela 3, o IR é próximo de 1 no composto RuGly2, indicando ausência de resistência cruzada entre compostos. O composto TM34 apresenta um IR próximo de 10, ou seja, a estirpe 1240 é resistente a este composto. Para os restantes compostos, a estirpe 1240 apresenta uma resistência intermédia.

Para a estirpe **Dd2**, verifica-se que os valores de IC_{50} dos compostos RuGly2, TM34, PF1 e PF2 são todos inferiores ao IC_{50} da CQ. O IC_{50} do composto RuGly1 é superior ao IC_{50} da CQ, estando ainda abaixo do valor de referência. De acordo com os IR, a estirpe Dd2 é sensível aos compostos RuGly1 e RuGly2 e apresenta resistência intermédia aos restantes compostos.

Sabe-se que a estirpe 3D7 é sensível a todos os fármacos, principalmente à CQ, a estirpe 1240 é resistente à ART e a estirpe Dd2 é resistente à CQ e à mefloquina. Desta forma, os valores de IC_{50} foram analisados para cada composto.

No composto **RuGly1** observa-se que os valores de IC_{50} são bastante elevados na estirpe 1240 ($939,8 \pm 299,4$ nM) e toma os valores de $219,2 \pm 61,6$ nM na estirpe 3D7 e $325,8 \pm 115,7$ nM na estirpe Dd2. Em relação ao IR, este é cerca de 4x mais elevado na estirpe 1240 do que na Dd2. Sugere-se então que este composto atua mais eficazmente na diminuição da parasitemia na estirpe sensível (3D7) e na resistente à cloroquina (Dd2).

No composto **RuGly2** observa-se que os valores de IC_{50} não apresentam variação significativa entre estirpes, tomando os valores $139,1 \pm 54,5$ nM, $208,9 \pm 63,8$ nM, $174,4 \pm 34,7$ nM para as estirpes 3D7, 1240 e Dd2, respetivamente. Em relação ao IR, este é semelhante em ambas as estirpes resistentes. Desta forma sugere-se que este composto atua de maneira idêntica na diminuição da parasitemia nas 3 estirpes testadas.

No composto **PF2** observa-se que todos os valores de IC_{50} se encontram abaixo do IC_{50} da CQ. O valor mais baixo de IC_{50} surge na estirpe 3D7 ($11,9 \pm 6,5$ nM) e nas restantes o comportamento é semelhante ($78,5 \pm 4,5$ nM para a estirpe 1240 e $71,0 \pm 15,5$ nM para

a estirpe Dd2). O IR em ambas as estirpes resistentes não varia significativamente. Assim, sugere-se que este composto diminuirá a parasitemia quer na estirpe sensível, quer nas resistentes à CQ e à ART.

Nos compostos **TM34** e **PF1** podemos observar que todos os valores de IC_{50} se encontram abaixo do IC_{50} da CQ. Os menores valores de IC_{50} ocorrem para a estirpe 3D7 ($9,6 \pm 2,9$ nM e $8,40 \pm 0,9$ nM, respetivamente) enquanto os mais elevados ocorrem na estirpe 1240 ($98,8 \pm 27,4$ nM e $74,2 \pm 29,7$ nM, respetivamente). Em relação ao IR, no composto PF1 não se observa uma diferença significativa entre as duas estirpes resistentes, enquanto no composto TM34, o valor de IR na estirpe 1240 é 2x o valor na estirpe Dd2. Assim, sugere-se que estes compostos, segundo o seu valor de IC_{50} , diminuem mais eficazmente a parasitemia na estirpe sensível (3D7) e nas estirpes resistentes à CQ (Dd2). Estes compostos poderão também ter efeito na estirpe resistente à ART (1240), ainda que menos notável. Desta forma os compostos TM34 e PF1 mostram os resultados mais promissores entre os compostos testados neste trabalho.

Em suma, dos compostos testados, o composto TM34 e o composto PF1 apresentam uma maior atividade antimalárica (valores de IC_{50} e IR baixos para ambas as estirpes resistentes – 1240 e Dd2). Sabe-se que os compostos organometálicos com ruténio (Ekengard et al., 2015), associados à cloroquina atuam sobre o vacúolo digestivo (Macedo et al., 2016). Deste modo, os compostos TM34 e PF1 selecionados com melhor atividade antimalárica possivelmente impedem a destoxificação do grupo heme no vacúolo digestivo, originando assim espécies reativas de oxigénio (Macedo et al., 2016).

Em última instância, estes resultados enfatizam o uso de compostos organometálicos com ruténio como uma terapêutica antimalárica promissora e impulsiona o investimento em novas estratégias com base em compostos organometálicos. No futuro, é importante estudar onde estes compostos atuam no parasita, o seu mecanismo de ação, a sua citotoxicidade *in vitro* e realizar estudos *in vivo*, em modelos murinos, para observar se apresentam a mesma atividade antimalárica.

V - CONCLUSÕES

1. As condições do teste de suscetibilidade com SYBR™ Green I usando citometria de fluxo foram otimizadas, tendo essa otimização sido comprovada através da comparação dos valores de parasitemia obtidos por citometria de fluxo, com os valores de parasitemia observados por microscopia ótica, com coloração de Giemsa.
2. Após análise dos cinco compostos testados, os compostos com maior atividade antimalárica foram o TM34 e o PF1, que apresentaram valores de IC₅₀ mais baixos do que os valores de IC₅₀ da CQ.
3. Em relação ao IR, o composto com IR mais próximo de 1, apresentando assim uma ausência de resistência, foi o RuGly2. Os compostos TM34 e PF1 apresentam IR inferiores a 10, demonstrando um nível intermédio de resistência.

VI - REFERÊNCIAS

- Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Lane, C.E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., le Gall, L., Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A.D., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C.L., Smirnov, A., Spiegel, F.W., 2012. The Revised Classification of Eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59, 429–514. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x>
- Almeida, L.C., Santos, E., Santana, C.S., Araújo, J.S.C., Taranto, A.G., Leite, F.H.A., 2016. REVISÃO DE LITERATURA SOBRE O MECANISMO DE AÇÃO DA ARTEMISININA E DOS ENDOPERÓXIDOS ANTIMALÁRICOS – PARTE II. *Textura* 9, 16–25.
- Ariey, F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Beghain, J., Langlois, A.-C., Khim, N., Kim, S., Duru, V., Bouchier, C., Ma, L., Lim, P., Leang, R., Duong, S., Sreng, S., Suon, S., Chhor, C.M., Bout, D.M., Ménard, S., Rogers, W.O., Genton, B., Fandeur, T., Miotto, O., Ringwald, P., Le Bras, J., Berry, A., Barale, J.-C., Fairhurst, R.M., Benoit-Vical, F., Mercereau-Puijalon, O., Ménard, D., 2014. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 505, 50–55. <https://doi.org/10.1038/nature12876>
- Bakar, N.A., Klonis, N., Hanssen, E., Chan, C., Tilley, L., 2010. Digestive-vacuole genesis and endocytic processes in the early intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J. Cell Sci.* 123, 441–450. <https://doi.org/10.1242/jcs.061499>
- Benelli, G., Jeffries, C.L., Walker, T., 2016. Biological Control of Mosquito Vectors: Past, Present, and Future. *Insects* 7. <https://doi.org/10.3390/insects7040052>
- Biot, C., Dive, D., 2010. Bioorganometallic Chemistry and Malaria, in: Jaouen, G., Metzler-Nolte, N. (Eds.), *Medicinal Organometallic Chemistry, Topics in Organometallic Chemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 155–193. https://doi.org/10.1007/978-3-642-13185-1_7
- Brasil, P., Zalis, M.G., Pina-Costa, A. de, Siqueira, A.M., Júnior, C.B., Silva, S., Areas, A.L.L., Pelajo-Machado, M., Alvarenga, D.A.M. de, Santelli, A.C.F. da S., Albuquerque, H.G., Cravo, P., Abreu, F.V.S. de, Peterka, C.L., Zanini, G.M., Mutis, M.C.S., Pissinatti, A., Lourenço-de-Oliveira, R., Brito, C.F.A. de, Ferreira-da-Cruz, M. de F., Culleton, R., Daniel-Ribeiro, C.T., 2017. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *Lancet Glob. Health* 5, e1038–e1046. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30333-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30333-9)
- Chavain, N., Biot, C., 2010. Organometallic complexes: new tools for chemotherapy. *Curr. Med. Chem.* 17, 2729–2745. <https://doi.org/10.2174/092986710791859306>
- Cowman, A.F., Crabb, B.S., 2006. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Cell* 124, 755–766. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.006>
- Cox, F.E.G., 2002. History of Human Parasitology. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 595–612. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.595-612.2002>
- Cui, L., Mharakurwa, S., Ndiaye, D., Rathod, P.K., Rosenthal, P.J., 2015. Antimalarial Drug Resistance: Literature Review and Activities and Findings of the ICEMR Network. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 93, 57–68. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0007>
- Dahl, E.L., Rosenthal, P.J., 2007. Multiple Antibiotics Exert Delayed Effects against the *Plasmodium falciparum* Apicoplast. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3485–3490. <https://doi.org/10.1128/AAC.00527-07>
- de Souza, N.B., Aguiar, A.C.C., de Oliveira, A.C., Top, S., Pigeon, P., Jaouen, G., Goulart, M.O.F., Krettli, A.U., 2015. Antiplasmodial activity of iron(II) and ruthenium(II) organometallic complexes against *Plasmodium falciparum* blood parasites. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 981–988. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150163>
- Despommier, D.D., Gwadz, R.W., Hotez, P.J., 1995. *Parasitic Diseases*, 3rd ed. Springer-Verlag, New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2476-1>

- Dharia, N.V., Plouffe, D., Bopp, S.E.R., Gonzalez-Paez, G.E., Lucas, C., Salas, C., Soberon, V., Bursulaya, B., Kochel, T.J., Bacon, D.J., Winzeler, E.A., 2010. Genome scanning of Amazonian *Plasmodium falciparum* shows subtelomeric instability and clindamycin-resistant parasites. *Genome Res.* 20, 1534–1544. <https://doi.org/10.1101/gr.105163.110>
- Dive, D., Biot, C., 2008. Ferrocene conjugates of chloroquine and other antimalarials: the development of ferroquine, a new antimalarial. *ChemMedChem* 3, 383–391. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200700127>
- Draper, S.J., Sack, B.K., King, C.R., Nielsen, C.M., Rayner, J.C., Higgins, M.K., Long, C.A., Seder, R.A., 2018. Malaria Vaccines: Recent Advances and New Horizons. *Cell Host Microbe* 24, 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.06.008>
- Ekengard, E., Glans, L., Cassells, I., Fogeron, T., Govender, P., Stringer, T., Chellan, P., Lisensky, G.C., Hersh, W.H., Doverbratt, I., Lidin, S., de Kock, C., Smith, P.J., Smith, G.S., Nordlander, E., 2015. Antimalarial activity of ruthenium(II) and osmium(II) arene complexes with mono- and bidentate chloroquine analogue ligands. *Dalton Trans.* 44, 19314–19329. <https://doi.org/10.1039/C5DT02410B>
- Fernandes, N.E.P., Cravo, P., Rosário, V.E. do, 2007. Resistência à sulfadoxina-pirimetamina em Maputo, Moçambique: presença de mutações nos genes dhfr e dhps do *Plasmodium falciparum*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 40, 447–450. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000400015>
- Ferreira, D., 2004. Resistência a antimaláricos em *Plasmodium falciparum*: envolvimento dos genes pfcr1 e pfmdr1.
- Gaur, D., Chitnis, C.E., Chauhan, V.S. (Eds.), 2016. *Advances in Malaria Research*, 1 edition. ed. Wiley-Blackwell.
- Gomes, A.P., Vitorino, R.R., Costa, A. de P., Mendonça, E.G. de, Oliveira, M.G. de A., Siqueira-Batista, R., 2011. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. *Rev. Bras. Ter. Intensiva* 23, 358–369. <https://doi.org/10.1590/S0103-507X2011000300015>
- Gosling, R., Seidlein, L. von, 2016. The Future of the RTS,S/AS01 Malaria Vaccine: An Alternative Development Plan. *PLOS Med.* 13, e1001994. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001994>
- Greenwood, B., 2010. Anti-malarial drugs and the prevention of malaria in the population of malaria endemic areas. *Malar. J.* 9 Suppl 3, S2. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-S3-S2>
- Gregson, A., Plowe, C.V., 2005. Mechanisms of Resistance of Malaria Parasites to Antifolates. *Pharmacol. Rev.* 57, 117–145. <https://doi.org/10.1124/pr.57.1.4>
- Grimberg, B.T., 2011. Methodology and application of flow cytometry for investigation of human malaria parasites. *J. Immunol. Methods* 367, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.01.015>
- Guerrant, R., 2006. *Tropical Infectious Diseases - 2nd Edition*.
- Haldar, K., Bhattacharjee, S., Safeukui, I., 2018. Drug resistance in *Plasmodium*. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 156–170. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.161>
- Hastings, I.M., Watkins, W.M., White, N.J., 2002. The evolution of drug-resistant malaria: the role of drug elimination half-life. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 357, 505–519. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.1036>
- Hooft van Huijsduijnen, R., Wells, T.N., 2018. The antimalarial pipeline. *Curr. Opin. Pharmacol.* 42, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.05.006>
- Hopkins, J., Fowler, R., Krishna, S., Wilson, I., Mitchell, G., Bannister, L., 1999. The Plastid in *Plasmodium falciparum* Asexual Blood Stages: a Three-Dimensional Ultrastructural Analysis. *Protist* 150, 283–295. [https://doi.org/10.1016/S1434-4610\(99\)70030-1](https://doi.org/10.1016/S1434-4610(99)70030-1)

- Katsuno, K., Burrows, J.N., Duncan, K., Hooft van Huijsduijnen, R., Kaneko, T., Kita, K., Mowbray, C.E., Schmatz, D., Warner, P., Slingsby, B.T., 2015. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 751–758. <https://doi.org/10.1038/nrd4683>
- Kennedy, D.A., Read, A.F., 2018. Why the evolution of vaccine resistance is less of a concern than the evolution of drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 12878–12886. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717159115>
- Kulkeaw, K., Ketprasit, N., Tungtrongchitr, A., Palasuwan, D., 2020. A simple monochromatic flow cytometric assay for assessment of intraerythrocytic development of *Plasmodium falciparum*. *Malar. J.* 19, 74. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03156-1>
- Liehl, P., Meireles, P., Albuquerque, I.S., Pinkevych, M., Baptista, F., Mota, M.M., Davenport, M.P., Prudêncio, M., 2015. Innate Immunity Induced by *Plasmodium* Liver Infection Inhibits Malaria Reinfections. *Infect. Immun.* 83, 1172–1180. <https://doi.org/10.1128/IAI.02796-14>
- Lim, L., McFadden, G.I., 2010. The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 749–763. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0273>
- Macedo, T.S., Colina-Vegas, L., Da Paixão, M., Navarro, M., Barreto, B.C., Oliveira, P.C.M., Macambira, S.G., Machado, M., Prudêncio, M., D’Alessandro, S., Basílico, N., Moreira, D.R.M., Batista, A.A., Soares, M.B.P., 2016. Chloroquine-containing organoruthenium complexes are fast-acting multistage antimalarial agents. *Parasitology* 143, 1543–1556. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001153>
- Machado, M., Murtinheira, F., Lobo, E., Nogueira, F., 2016. Whole-cell SYBR Green I assay for antimalarial activity assessment. *Ann. Clin. Med. Microbiol.* 2.
- Marchiafava, E., 1885. *Nuove Ricerche sulla Infezione Malarica del Prof. Ettore Marchiafava e del Dr. Angelo Celli*. Tipografia Eredi Botta.
- Martínez, A., Deregnacourt, C., Sinou, V., Latour, C., Roy, D., Schrével, J., Sánchez-Delgado, R.A., 2017. Synthesis of an organo-ruthenium aminoquinoline-trioxane hybrid and evaluation of its activity against *Plasmodium falciparum* and its toxicity toward normal mammalian cells. *Med. Chem. Res.* 26, 473–483. <https://doi.org/10.1007/s00044-016-1769-6>
- Mbaba, M., Golding, T.M., Smith, G.S., 2020. Recent Advances in the Biological Investigation of Organometallic Platinum-Group Metal (Ir, Ru, Rh, Os, Pd, Pt) Complexes as Antimalarial Agents. *Molecules* 25, 5276. <https://doi.org/10.3390/molecules25225276>
- Meibalan, E., Marti, M., 2017. Biology of Malaria Transmission. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 7. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025452>
- Milani, K.J., Schneider, T.G., Taraschi, T.F., 2015. Defining the Morphology and Mechanism of the Hemoglobin Transport Pathway in *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes. *Eukaryot. Cell* 14, 415–426. <https://doi.org/10.1128/EC.00267-14>
- Moore, L.R., Fujioka, H., Williams, P.S., Chalmers, J.J., Grimberg, B., Zimmerman, P., Zborowski, M., 2006. Hemoglobin degradation in malaria-infected erythrocytes determined from live cell magnetophoresis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 747–749. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5122fje>
- Mota, M.M., 2001. Migration of *Plasmodium* Sporozoites Through Cells Before Infection. *Science* 291, 141–144. <https://doi.org/10.1126/science.291.5501.141>
- Mota, M.M., Rodriguez, A., 2002. Invasion of mammalian host cells by *Plasmodium* sporozoites. *BioEssays* 24, 149–156. <https://doi.org/10.1002/bies.10050>
- Nixon, G.L., Moss, D.M., Shone, A.E., Laloo, D.G., Fisher, N., O’Neill, P.M., Ward, S.A., Biagini, G.A., 2013. Antimalarial pharmacology and therapeutics of atovaquone. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 977–985. <https://doi.org/10.1093/jac/dks504>

- Nyboer, B., Heiss, K., Mueller, A.-K., Ingmundson, A., 2018. The Plasmodium liver-stage parasitophorous vacuole: A front-line of communication between parasite and host. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 308, 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.09.008>
- Nzila, A., Mwai, L., 2010. In vitro selection of Plasmodium falciparum drug-resistant parasite lines. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 390–398. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp449>
- Qiguin, L., R. Hickman, M., 2015. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antimalarial Drugs Used in Combination Therapy.
- Salas, P.F., Herrmann, C., Orvig, C., 2013. Metalloantimalarials. *Chem. Rev.* 113, 3450–3492. <https://doi.org/10.1021/cr3001252>
- Sanofi, 2020. A Randomized, Open Label, Parallel-group, Single Dose Regimen, Phase 2a Study, to Investigate the Clinical and Parasitocidal Activity and the Pharmacokinetics of 3 Dose Levels of Artefenomel (OZ439) Given in Combination With Ferroquine (FQ) and FQ Alone, in African Patients With Uncomplicated Plasmodium Falciparum Malaria (Clinical trial registration No. results/NCT03660839). clinicaltrials.gov.
- Schuck, D.C., Ribeiro, R.Y., Nery, A.A., Ulrich, H., Garcia, C.R.S., 2011. Flow cytometry as a tool for analyzing changes in Plasmodium falciparum cell cycle following treatment with indol compounds. *Cytometry A* 79A, 959–964. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.21136>
- Sharma, V., 2005. Therapeutic drugs for targeting chloroquine resistance in malaria. *Mini Rev. Med. Chem.* 5, 337–351. <https://doi.org/10.2174/1389557053544029>
- Sibley, C.H., Hyde, J.E., Sims, P.F., Plowe, C.V., Kublin, J.G., Mberu, E.K., Cowman, A.F., Winstanley, P.A., Watkins, W.M., Nzila, A.M., 2001. Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in Plasmodium falciparum: what next? *Trends Parasitol.* 17, 582–588. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(01\)02085-2](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(01)02085-2)
- Silvie, O., Mota, M.M., Matuschewski, K., Prudêncio, M., 2008. Interactions of the malaria parasite and its mammalian host. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 352–359. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.005>
- Su, X., Lane, K.D., Xia, L., Sá, J.M., Wellems, T.E., 2019. *Plasmodium* Genomics and Genetics: New Insights into Malaria Pathogenesis, Drug Resistance, Epidemiology, and Evolution. *Clin. Microbiol. Rev.* 32, e00019-19, /cmr/32/4/CMR.00019-19.atom. <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-19>
- Tekete, M., Djimde, A.A., Beavogui, A.H., Maiga, H., Sagara, I., Fofana, B., Ouologuem, D., Dama, S., Kone, A., Dembele, D., Wele, M., Dicko, A., Doumbo, O.K., 2009. Efficacy of chloroquine, amodiaquine and sulphadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria: revisiting molecular markers in an area of emerging AQ and SP resistance in Mali. *Malar. J.* 8, 34. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-34>
- Vaidya, A.B., Mather, M.W., 2000. Atovaquone resistance in malaria parasites. *Drug Resist. Updat.* 3, 283–287. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0157>
- White, N.J., Pongtavornpinyo, W., 2003. The de novo selection of drug-resistant malaria parasites. *Proc. Biol. Sci.* 270, 545–554. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2241>
- WHO, 2020. World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges 151.
- WHO, 2019. World malaria report 2019 [WWW Document]. WHO. URL <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2019/en/> (accessed 8.3.20).
- WHO, 2015. Guidelines for the treatment of malaria.
- WHO, 2010. Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wiley, J., 2014. Severe Malaria. *Trop. Med. Int. Health* 19, 7–131. https://doi.org/10.1111/tmi.12313_2

- Wilson, C.M., Serrano, A.E., Wasley, A., Bogenschutz, M.P., Shankar, A.H., Wirth, D.F., 1989. Amplification of a gene related to mammalian *mdr* genes in drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Science* 244, 1184–1186. <https://doi.org/10.1126/science.2658061>
- Wunderlich, J., Rohrbach, P., Dalton, J., 2012. The malaria digestive vacuole. *Front. Biosci.* 1424–1448.
- Xiao, J., Sun, Z., Kong, F., Gao, F., 2020. Current scenario of ferrocene-containing hybrids for antimalarial activity. *Eur. J. Med. Chem.* 185, 111791. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111791>
- Yang, T., Xie, S.C., Cao, P., Giannangelo, C., McCaw, J., Creek, D.J., Charman, S.A., Klonis, N., Tilley, L., 2016. Comparison of the Exposure Time Dependence of the Activities of Synthetic Ozonide Antimalarials and Dihydroartemisinin against K13 Wild-Type and Mutant *Plasmodium falciparum* Strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 4501–4510. <https://doi.org/10.1128/AAC.00574-16>

VII – APÊNDICES

4.3. APÊNDICE I

Private consent for voluntary blood donation to be used as an additive in *Plasmodium falciparum* cell cultures



DOAÇÃO DE ERITROCITOS HUMANOS PARA SEREM USADOS COMO ADITIVO EM MEIO DE CULTURA *IN VITRO* DE *Plasmodium falciparum*

Por favor, leia com atenção a seguinte informação. Se achar que algo está incorreto ou que não está claro, não hesite em solicitar mais informações junto do investigador que lhe entregou este formulário. Se concordar com a proposta que lhe foi feita, queira assinar este documento.

Instituição Promotora | Instituto de Higiene e Medicina Tropical IHMT, Universidade Nova de Lisboa

Investigadores para contacto | Fátima Nogueira, Investigadora Auxiliar (fnogueira@ihmt.unl.pt; telefone +351 213652626; ext 361).

Parte dos trabalhos de investigação em malária que realizamos no nosso laboratório exige cultivar os parasitas (*Plasmodium falciparum*) *in vitro*. Um dos exemplos de aplicação das culturas *in vitro* de parasitas da malária é a pesquisa de novos medicamentos, sendo o primeiro passo testar a atividade das moléculas *in vitro*, em cultura, de forma a selecionar aquelas mais eficazes contra o parasita, para depois prosseguir os estudos em animais e finalmente no homem. A realização de outros estudos mais abrangentes, como conhecer melhor a biologia do parasita também estão baseados em culturas *in vitro* de *Plasmodium falciparum*.

A cultura apenas é possível com a adição de eritrócitos humanos ao meio de cultura, não existindo substituto.

O objetivo desta dadaiva é obter eritrócitos humanos para adicionar à cultura de parasitas.

O sangue que consentir doar para este fim será processado da seguinte forma:

1. o dador acompanhado do Investigador dirige-se ao laboratório do IHMT;

2. após ler e assinar este consentimento, um técnico de diagnóstico e terapêutica do laboratório efetua a colheita de 10 a 15 mL de sangue venoso;
3. o tubo de colheita apenas é rotulado com a data de colheita e o seu nome nunca aparece associado a este tubo;
4. o seu sangue é centrifugado e os glóbulos brancos (leucócitos), plasma e eritrócitos (ou glóbulos vermelhos) são separados por centrifugação;
5. o plasma e os glóbulos brancos são descartados e destruídos. O tubo com os seus glóbulos vermelhos (que se mantém rotulado apenas com a data da colheita e onde não aparece o seu nome), são conservados no frigorífico;
6. os seus glóbulos vermelhos são usados para adicionar às culturas de parasitas nos 15 dias seguintes à colheita.

A partir dos seus glóbulos vermelhos, não será extraído, armazenado ou analisado o seu material ou informação genética (os glóbulos vermelhos não têm núcleo). Também não serão armazenados, analisados ou usados, sucedâneos (derivados ou partes) do seu sangue para além dos glóbulos vermelhos e estes apenas são usados para cultivar parasitas da malária (como referido) e em nenhuma circunstância serão usados com fins comerciais.

A sua participação é voluntária e não envolve qualquer tipo de compensação monetária. Não existem riscos ou desconfortos previsíveis para além daqueles associados à extração de 10 ou 15 mL de sangue venoso por profissional de saúde autorizado e em condições controladas do laboratório do IHMT.

Deste procedimento foi dado conhecimento ao Conselho de Ética do IHMT.

AGRADECEMOS A SUA COLABORAÇÃO

Assinatura do(a) Investigador(a) _____

Declaro ter lido e compreendido este documento, bem como as informações verbais que me foram fornecidas pela pessoa que acima assina. Desta forma, aceito doar sangue e a sua utilização para este fim, confiando nas garantias de confidencialidade e anonimato que me são dadas pelo investigador.

Nome: _____

Assinatura: _____

Data: / /

ESTE DOCUMENTO É COMPOSTO DE 1 PÁGINA E FEITO EM DUPLICADO:

UMA VIA PARA A INVESTIGADOR, OUTRA PARA O DOADOR.