



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Avaliação *in vitro* e *in vivo* da atividade antimalárica dos trioxolanos NAC89, LDC67 e LC50 em estirpes sensíveis e resistentes à artemisinina e ao artesunato

Lis Tavares Coelho Lobo

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM PARASITOLOGIA MÉDICA**

NOVEMBRO, 2012



Avaliação *in vitro* e *in vivo* da atividade antimalárica dos trioxolanos NAC89, LDC67 e LC50 em estirpes sensíveis e resistentes à artemisinina e ao artesunato

Lis Tavares Coelho Lobo

Bacharel em Biomedicina e especialista em Análises Clínicas, Hematologia e Hemoterapia pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte/ Brasil

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Parasitologia Médica, realizada sob a orientação científica da Investigadora Doutora Fátima Nogueira

Orientadora: Investigadora Doutora Fátima Nogueira

Centro de Malária e outras Doenças Tropicais (CMDT)

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Co-orientador: Professor Doutor Virgílio do Rosário

Centro de Malária e outras Doenças Tropicais (CMDT)

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

NOVEMBRO, 2012

Aos meus pais, aos meus irmãos e à minha avó.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar os meus caminhos e ser fonte de paz em minha vida.

À minha orientadora Fátima Nogueira pelos ensinamentos, disponibilidade, atenção e paciência. Espero que esta orientação também aconteça no doutoramento.

Ao meu co-orientador Virgílio do Rosário pelos ensinamentos, disponibilidade, atenção, por ter me recebido no IHMT e pelo auxílio na minha chegada em Portugal.

Ao professor Valter de Andrade que me ensinou os primeiros passos na iniciação científica, me orientou na graduação, me apresentou a equipa do CMDT, continuou me orientando no mestrado e se Deus permitir me orientará no doutoramento também.

Á Lourdes Cristiano por produzir, ceder os compostos e aceitar o convite de fazer parte da minha banca.

Á Helena Ribeiro pela produção da pomada de um dos compostos.

Ao Bruno de Sousa pelos ensinamentos em bioestatística, disponibilidade e bom humor.

Á equipa do biotério formada pela Dinora Lopes, Victor Santos, João Antunes e Rosário Tito pela disponibilidade e gentileza.

Aos professores do IHMT e da UFRN que me ensinaram tanto ao longo desses anos e acrescentaram muito na minha formação profissional e pessoal.

Aos meus pais Autran e Matilde pelo incentivo, por acreditarem sempre em mim e serem o meu alicerce.

À Tamara por ser uma grande amiga, companheira e conselheira em todos os momentos.

Aos meus irmãos Lara, Júlio e Cecília por tornarem a minha vida muito mais leve e feliz.

À minha vovó Vila, por seus ensinamentos e amor incondicionais.

Ao meu vovô Luiz que de onde está me protege e me inumina todos os dias.

Aos meus tios Luisa, Lopinho, Tereza e Hudy e aos meus primos Brenda, Carlos Eduardo, Camila, Tadeu e Aline pelo apoio e carinho.

Ao tio Reinaldo pelas palavras de incentivo, amor e fé.

À Roberta, ao Fernando e ao Davi por me acolherem como parte da sua família em Portugal.

À Rita por cuidar e acreditar sempre em mim.

À minha amiga Isa Pires pela companhia nas exaustivas horas de trabalho no IHMT, pela amizade, por me fazer rir nas horas mais difíceis e por ter me acolhido como parte de sua família.

Aos amigos do mestrado Ana Filipa Teixeira, Mónica Guerra, Arlete Troco, Idalécia Moiane, Mário da Costa, Vasco Gordicho e Miguel Landum pela grande amizade que se construiu ao longo destes dois anos e que espero que continue por mais muitos anos. Agradeço por tornarem os meus dias muito mais divertidos e serem a minha família em Portugal.

Ao meu querido amigo brasileiro Renato Fernandes pela amizade e por sempre me ouvir.

Aos colegas Ana Custódio, Lara Borges, Luisa Simões, Cristina Mendes, Patrícia Machado, Catarina Alves, Marta Machado, Zoraima Neto, Eliane Arez, Leonor Pinho, Gonçalo Seixas e Bruno Gomes pela amizade e companheirismo.

Aos amigos Lorena Herbster, Pedro Domingos, Thales Lira, Claudio Bruno Oliveira, Monique Gabriela, Mônica Cortez, Alessandra Marinho, Vanessa Menezes, Felipe Gomes, Andréa Medeiros e Magaly Mota que apesar da distância continuam tão presentes na minha vida.

RESUMO

Avaliação *in vitro* e *in vivo* da atividade antimalárica dos trioxolanos NAC89, LDC67 e LC50 em estirpes sensíveis e resistentes à artemisinina e ao artesunato

Lis Tavares Coelho Lobo

Palavras-chave: Malária, trioxolanos, atividade *in vitro* e *in vivo*, modelo murino *Plasmodium chabaudi*.

A malária mantém-se como uma das doenças mais importantes do mundo, causando a morte de mais de 1 milhão de pessoas anualmente e elevada morbidade. Face à propagação da resistência do *Plasmodium falciparum* à maioria dos medicamentos antimaláricos disponíveis, a Organização Mundial de Saúde (OMS), desde 2006, recomenda a utilização de terapias combinadas com artemisinina (ACTs) como tratamento de primeira linha para a malária não complicada. Em 2008, relatórios clínicos revelaram a falha terapêutica dos ACTs na fronteira Tailândia-Camboja e uma vez que não existem alternativas para o tratamento da malária é fundamental manter linhas de investigação sobre novos e eficazes fármacos. A partir da artemisinina (ART) surgiram novos peróxidos designados trioxolanos que apresentam como farmacóforo a função 1,2,4-trioxano. A acessibilidade, a preparação relativamente económica e a estabilidade da função 1,2,4-trioxano permite a síntese de derivados com estruturas diversas, alargando a possibilidade de desenvolvimento de novos fármacos. Foram realizados testes *in vitro* de triagem com o MARK III (OMS micro-ensaio), com controlos positivos (artemisinina e dihidroartemisinina) e controlo negativo (sem fármaco). Foram efetuados ensaios diversos com 3 compostos, aqui denominados NAC89, LCD67 e LC50 em culturas da estirpe de *P. falciparum* (Dd2) para avaliação da atividade antimalárica dos compostos, bem como ensaios utilizando o modelo de malária de murino, *Plasmodium chabaudi*, com 4 estirpes, denominadas AS-3CQ, AS-ATN, respectivamente sensível e resistente ao artesunato (ATN) e AS-30CQ e AS-ART respectivamente sensível e resistente à (ART). Também foi avaliada a citotoxicidade dos compostos, utilizando células HepG2 de hepatoma humano pelo ensaio com método colorimétrico metil-tiazol-tetrazólico (MTT). No modelo murino compararam-se também duas vias de administração dos novos compostos, sendo uma por via subcutânea nos 3 compostos e outra por via tópica apenas para LC50. A verificação de cura foi efetuada por observação microscópica de esfregaços sanguíneos corados pelo método de Giemsa e determinação da parasitemia. Os resultados observados foram: a) baixa citotoxicidade dos três compostos; b) o composto LC50 eliminou a parasitemia nos ensaios *in vitro* em cultivos de *P. falciparum* bem como eliminou *P. chabaudi* nos tratamentos por via subcutânea e tópica na dose de 50 mg/kg e na dose de 10 mg/Kg na via subcutânea; c) o NAC89 mostrou boa atividade no mesmo ensaio *in vivo*, na dose de 10 mg/Kg e 50 mg/Kg por via subcutânea; d) fraca atividade para LCD67 na dose de 50 mg/Kg. O LC50 e o NAC89 foram muito eficazes contra parasitas resistentes ao ATN e à ART sugerindo novos mecanismos de ação. Assim, este trabalho de investigação trouxe resultados promissores na área de potenciais novos antimaláricos.

ABSTRACT

In vitro and *in vivo* antimalarial activity of trioxolanes NAC89, LDC67 and LC50 in sensitive and resistant strains to artemisinin and artesunate

Lis Tavares Coelho Lobo

Keywords: Malaria, trioxolanes, activity *in vitro* and *in vivo*, murine model *Plasmodium chabaudi*.

Malaria remains one of the most important diseases in the world, causing the deaths of 1 million people annually and high morbidity. Given the spread of *Plasmodium falciparum* resistance to most antimalarial drugs available, the World Health Organization (WHO) recommended the use of artemisinin based combination therapies (ACTs) as first-line treatment since 2006 for uncomplicated malaria. In 2008, clinical reports have revealed the therapeutic failure of ACTs in Thailand-Cambodia border and since there is no alternative for the treatment of malaria it is essential to keep lines of research into new and effective drugs. From the discovery of artemisinin (ART) new peroxides emerged designated trioxolanes presenting the function 1,2,4-trioxane as pharmacophore. The accessibility, relatively inexpensive preparation and stability of the function 1,2,4-trioxane allow the synthesis of derivatives with different structures, extending the possibility of developing new drugs. Tests were performed *in vitro* screening with the MARK III (WHO micro-test) with the positive controls (artemisinin and dihydroartemisinin) and negative control (no drug). Assays were performed with three different compounds, here called NAC89, LCD67 and LC50 in cultures of *P. falciparum* (strain Dd2) as well as assays using the murine model of malaria, *Plasmodium chabaudi*, with 4 strains, denoted AS-3CQ, AS-ATN, respectively sensitive and resistant to artesunate (ATN) and AS-30CQ and AS-ART respectively sensitive and resistant to artemisinin. We also evaluated the cytotoxicity of the compounds using HepG2 human hepatoma cells, by using the colorimetric method metil-tiazol-tetrazolic (MTT) assay. In the murine model a comparison of two routes of administration of the new compounds was carried out for the 3 compounds NAC89, LCD67 and LC50 - subcutaneous inoculation while for LC50 we also assayed a topic administration. Cure was assessed by determining parasitaemia by microscopic observation of Giemsa stained blood smears. Results were: a) low cytotoxicity of the three compounds, b) compound LC50 eliminated parasites in *in vitro* assays in cultured *P. falciparum* and in the *P. chabaudi* model subcutaneously and topically at a dose of 50 mg/Kg and a 10 mg/Kg in subcutaneously, c) the NAC89 showed good activity *in vivo* in the same assay at a dose of 10 mg/Kg and 50 mg/Kg subcutaneously route; d) LCD67 showed weak activity at a dose of 50 mg/Kg. Those two compounds were very effective against parasites resistant to (ATN) and (ART) suggesting novel mechanisms of action. Thus, this research work gave new information of interest in the area potential new antimalarials.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	IV
Lista de figuras.....	VI
Lista de tabelas.....	VIII
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. A malária.....	2
1.1. Epidemiologia da malária.....	2
1.2. Ciclo biológico <i>Plasmodium</i> spp.....	4
1.3. Antimaláricos e resistência.....	7
1.3.1. Combinações terapêuticas baseadas em derivados da artemisinina.....	10
1.3.2. Resistência a derivados da artemisinina.....	11
1.3.3. Mecanismos de ação da artemisinina e derivados.....	11
1.3.4. Mecanismos de resistência da artemisinina e seus derivados.....	12
1.4. Trioxolanos.....	14
1.4.1. Estrutura química dos trioxolanos.....	15
1.5. Ensaio <i>in vitro</i>	15
1.6. Ensaio <i>in vivo</i>	16
1.6.1. Modelo murino- <i>P. chabaudi</i>	16
1.6.2. Linhagens de <i>P. chabaudi</i>	16
II. OBJETIVOS.....	18
1. Objetivo geral.....	19
2. Objetivos específicos.....	19
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
1. Compostos teste e controles.....	21
2. Ensaio <i>in vitro</i>	21

2.1. Teste de citotoxicidade.....	21
2.1.1 Cultura de HepG2.....	21
2.1.2. Diluição dos compostos.....	21
2.1.3. Citotoxicidade.....	21
2.1.4. Determinação da DL ₅₀	22
2.2. Teste de susceptibilidade de <i>P. falciparum</i> aos compostos.....	22
2.2.1. Eritrócitos não parasitados.....	22
2.2.2. Diluição dos compostos.....	22
2.2.3. Cultura <i>in vitro</i> de <i>P. falciparum</i>	23
2.2.4. Sincronização de culturas <i>in vitro</i> de <i>P. falciparum</i> com sorbitol.....	23
2.2.5. Teste morfológico <i>in vitro</i>	24
2.2.6. Leitura dos resultados dos ensaios de susceptibilidade <i>in vitro</i>	24
2.2.7. Determinação do IC ₅₀	24
2.3. Índice de seletividade.....	24
3. Ensaio <i>in vivo</i>	25
3.1. Ensaio <i>in vivo</i> – administração por via subcutânea.....	25
3.1.1. Animais.....	25
3.1.2. Estirpes de <i>P. chabaudi</i>	25
3.1.3. Diluição dos compostos.....	25
3.1.4. Via de administração subcutânea.....	26
3.2. Ensaio <i>in vivo</i> com aplicação tópica do composto LC50.....	26
3.2.1. Animais.....	26
3.2.2. Estirpes.....	27
3.2.3. Doses.....	27
3.2.4. Aplicação por via tópica do composto LC50.....	28

3.3. Avaliação da atividade dos compostos.....	28
3.3.1. Cálculo da parasitemia.....	28
3.3.2. Cálculo da área abaixo da curva (<i>area under curve</i> – AUC).....	29
3.4. Análise estatística.....	29
IV. RESULTADOS.....	31
1. Testes <i>in vitro</i>	32
1.1. Atividade antimalárica <i>in vitro</i>	32
1.2. Citotoxicidade dos compostos em culturas de hepatócitos.....	32
1.3. Determinação do índice de seletividade dos compostos.....	33
2. Testes <i>in vivo</i>	34
2.1. Avaliação da atividade antimalárica por via subcutânea.....	34
2.1.1. Caracterização do perfil de resposta das estirpes de <i>P. chabaudi</i> , AS-3CQ, AS-ATN, AS-30CQ e AS-ART à artemisinina e ao artesunato.....	34
2.1.2. Atividade antimalárica dos compostos NAC89, LCD67 e LC50 por via subcutânea.....	36
2.1.3. Comparação da eficácia dos compostos NAC89, LCD67 e LC50 com os fármacos artemisinina e artesunato.....	40
3. Avaliação da atividade antimalárica por via tópica.....	43
V. DISCUSSÃO.....	45
VI. CONCLUSÕES.....	52
VII. REFERÊNCIAS.....	54
ANEXO I.....	66
ANEXO II.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

AUC – *Area under curve*

ACT – *Artemisinin-based combination therapy*

ATM – Artemeter

ATN – Artesunato

ATP – Adenosina trifosfato

ART – Artemisinina

CQ – Cloroquina

CS – Proteína circum-esporozóitica

DL₅₀ – Dose letal para 50% das células

DHA - Dihidroartemisinina

DMSO – Dimetilsulfóxido

HepG2 – Célula de hepatoma humano

HEPES – Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfónico

IC₅₀ – Concentração inibitória 50%

K1 – Estirpe de *P. falciparum* resistente à cloroquina

LMF – Lumefantrina

MEF – Mefloquina

MTT – Método colorimétrico metil-tiazol-tetrazólico

MWc – Meio de Williams completo

NF54 – Estirpe de *P. falciparum* sensível à cloroquina

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Tampão de fosfato e salina

pfmdr1 – Gene MDR1 de *P. falciparum*

pfATPase6 – Gene ATPase6 de *P. falciparum*

pfcr1 – gene CRT de *P. falciparum*

PQP – Piperaquina

_pRBC – Eritrócitos parasitados

RBC – Eritrócitos sãos

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

SERCA – Retículo sarco-endoplasmático Ca⁺⁺ATPase

SP – Sulfadoxina-pirimetamina

TCTP – *Translationally controlled tumour protein*

TRAP - Proteína adesiva relacionada a trombospondina

OMS - World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura I-1: Países e territórios afetados pela malária em 2010.....	3
Figura I-2: Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> sp.....	6
Figura I-3: Distribuição global da malária, com as áreas onde <i>P. falciparum</i> é resistente aos antimaláricos cloroquina e sulfadoxina-pirimetamina.....	8
Figura I-4: Estrutura química dos trioxolanos NAC89, LCD67 e LC50.....	15
Figura III-1: Tratamento por via subcutânea.....	26
Figura III-2: Tosqueamento do pêlo para tratamento por via tópica.....	27
Figura III-3: Animais anestesiados e tratados com LC50 por via tópica.....	28
Figura IV-1: Curvas de dose-resposta relativas aos compostos NAC89, LCD67, LC50, ART e DHA em função do logaritmo das diferentes doses de cada composto e seus respectivos IC ₅₀ em estirpe Dd2 de <i>P. falciparum</i>	32
Figura IV-2: Curvas de dose-resposta relativas a sobrevivência dos hepatócitos tratados com os compostos NAC89, LCD67 e LC50.....	33
Figura IV-3: Perfil de resposta à artemisinina e ao artesunato por via subcutânea das estirpes de <i>P. chabaudi</i> AS-3CQ, AS-ATN, AS-30CQ e AS-ART.....	35
Figura IV-4: Animal com queda de pêlo no local da injeção do composto NAC89 na dose de 50 mg/Kg por via subcutânea.....	36
Figura IV-5: AUCs dos grupos infetados com a estirpe AS-3CQ de <i>P. chabaudi</i> e tratados com os compostos NAC89, LCD67 e LC50.....	37
Figura IV-6: AUCs dos grupos infetados com a estirpe AS-ATN de <i>P. chabaudi</i> e tratados com os compostos NAC89, LCD67 e LC50.....	38
Figura IV-7: AUCs dos grupos infetados com a estirpe AS-30CQ de <i>P. chabaudi</i> e tratados com os compostos NAC89, LCD67 e LC50.....	39
Figura IV-8: AUCs dos grupos infetados com a estirpe AS-ART de <i>P. chabaudi</i> e tratados com os compostos NAC89, LCD67 e LC50.....	40

Figura IV-9: AUCs dos grupos infetados com estirpe AS-ART de <i>P. chabaudi</i> e tratados com LC50 por via topica.....	41
Figura IV-10: AUCs dos grupos infetados com estirpe AS-ART de <i>P. chabaudi</i> e tratados com LC50 nas vias subcutânea e via tópica.....	42
Figura IV-11: AUCs dos grupos infetados com a estirpe AS-30CQ e AS-ART de <i>P. chabaudi</i> e tratados com os compostos NAC89, LCD67, LC50 e ART.....	43
Figura IV-12: AUCs dos grupos infetados com a estirpe AS-3CQ e AS-ATN de <i>P. chabaudi</i> e tratados com os compostos NAC89, LCD67, LC50 e ATN.....	44
Figura V-1: Seleção de resistência em <i>P. chabaudi</i> a partir da linhagem AS sensível.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela I-1: Antimaláricos e resistência de <i>P. falciparum</i>	10
Tabela IV-1: Atividade antimalárica, citotoxicidade e índice de seletividade....	34

I – INTRODUÇÃO

1. A malária

A malária é uma das doenças parasitárias mais importantes no mundo, causando um grande impacto no desenvolvimento sócio-económico dos países afectados. Esta doença continua a afectar sobretudo a África subsaariana mas continua a estar presente em mais de 106 países nas regiões tropicais e subtropicais, na América Latina e Sudeste Asiático, existindo ainda a possibilidade do seu ressurgimento em regiões onde fora controlada ou eliminada por motivo associado ao aquecimento global.

Existem organizações e instituições diversas associadas a programas de controlo, que tomam em conta os diversos parâmetros associados ao ciclo Homem-parasita-inseto vetor devendo-se tomar em conta, hoje, de problemas sociais e urbanos que dificultam a implementação e manutenção daqueles programas.

1.1. Epidemiologia da Malária

Aproximadamente 3.3 bilhões de pessoas estão sob risco de serem infetadas e mais de 216 milhões de casos acontecem anualmente causando mais de 1 milhão de mortes. Os indivíduos mais susceptíveis são as crianças com menos de 5 anos de idade e mulheres grávidas por motivo de menor imunidade. Os viajantes provenientes de países não endémicos, bem como os militares que viajem ou permaneçam em países endémicos são pelo mesmo motivo susceptíveis (figura I-1) (WHO, 2011).

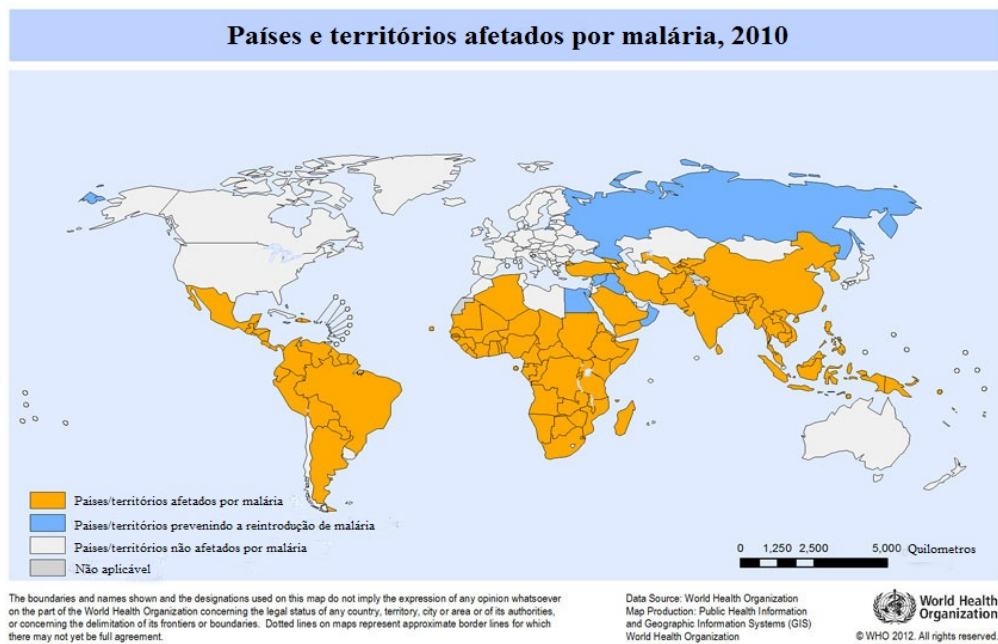


Figura I-1: Países e territórios afetados pela malária em 2010. (Adaptada de WHO, 2011).

Além das altas taxas de mortalidade, a malária também é responsável por altos níveis de morbidade entre as populações afetadas, e está intimamente associada à diminuição do desenvolvimento económico dos países onde é endémica (Sachs & Malaney, 2002). Os principais fatores que contribuem para a dificuldade do controlo da malária no mundo estão ligados à resistência dos plasmódios aos fármacos disponíveis, à limitações ao uso de inseticidas, a dificuldades operacionais, e sobretudo a fatores económicos e sociais das populações afetadas. O controlo da malária depende basicamente do tratamento curativo dos casos agudos e da proteção individual contra a picada dos vetores, uma vez que não há ainda vacinas disponíveis (Tetteh & Polley, 2007; WHO, 2011).

A malária é causada por parasitas do género *Plasmodium* existindo cinco espécies que afetam o Homem, sendo estas o *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malarie* e *P. knowlesi*. A malária causada por *P. falciparum* é a mais grave e predominante sobretudo em África e no Sudeste Asiático. Sendo o *P. vivax* menos grave mas com a maior distribuição mundial (Price *et al.*, 2007). A

malária é transmitida ao homem pela picada de fêmeas de mosquitos do género *Anopheles*, infetadas.

Os sintomas da doença incluem febre alta, dor de cabeça, calafrios, sudorese, mal estar geral e vômitos, sintomas que geralmente aparecem entre 7 e 15 dias após a picada infetante do mosquito. *P. falciparum*, é responsável pelas formas mais graves da doença que inclui anemia severa, coma e morte (Idro *et al.*, 2005). As espécies *P. vivax* e *P. ovale* podem manter formas latentes no fígado – hipnozoítos, com possibilidade de surgirem recidivas da doença posteriormente, pelo que exigem tratamento específico com esquizotomicidas tecidulares (Maneeboonyang *et al.*, 2011; Orjuela-Sánchez *et al.*, 2009).

1.2. Ciclo biológico *Plasmodium* sp

O ciclo pode ser dividido em três fases ou estádios de desenvolvimento, após a invasão do parasita pela picada infetante: 1. esquizogonia hepática, 2. esquizogonia eritrocitária e 3. esporogonia. O desenvolvimento das três fases acontecem em dois hospedeiros diferentes: as duas primeiras no hospedeiro vertebrado e a terceira na fêmea de mosquito anofelino.

O ciclo de vida do *Plasmodium* (figura I-2) é iniciado quando a fêmea infetada de mosquito *Anopheles* se alimenta de sangue num hospedeiro vertebrado, inoculando os esporozoítos. Estes se movimentam até o fígado, através da reorientação de proteínas de superfície do parasita, nomeadamente as proteínas circum-esporozoíticas (CS) e a proteína adesiva relacionada com a trombospondina (TRAP), essenciais para a invasão das células hospedeiras (Neves *et al.*, 2005). Após atingirem o fígado são capturados pelas células de Kupffer e de seguida invadem os hepatócitos, onde sofrem diferenciação, esquizogonia hepática, originando dezenas de milhares de merozoítos. Os hepatócitos liberam vesículas cheias de merozoítos (merossomas) para a circulação sanguínea. Assim, os merossomas derivados dos hepatócitos garantem a liberação de parasitas na microcirculação dos pulmões, onde estão protegidos da fagocitose por células de Kupffer (Silvie *et al.*, 2008; Sturm *et al.*, 2006). Os esporozoítos de *P. vivax* e *P. ovale* podem desenvolver-se em

hipnozoítos e permanecer em estado de latência nos hepatócitos, causando recidivas da infecção, características nestas espécies.

Na corrente sanguínea, os merozoítos invadem os eritrócitos do hospedeiro, onde se desenvolvem até esquizonte (resultado de várias divisões mitóticas originando merozoítos). Este estágio corresponde a utilização da hemoglobina e destruição posterior da hemácia, que, após ruptura, libera os merozoítos na corrente sanguínea, onde poderão invadir novos eritrócitos e desenvolver novos esquizontes, sendo a ruptura dos eritrócitos responsável pelos episódios febris característicos da malária. (Farrow *et al.*, 2011). O ciclo, acontece em intervalos regulares e a duração depende da espécie que causa a infecção. No caso do *P. knowlesi* acontece em 24 horas, do *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* em 48 horas e do *P. malarie* em 72 horas.

Alguns merozoítos após invasão dos eritrócitos podem diferenciar-se em gametócitos, responsáveis pela fase sexuada do ciclo. Durante a refeição sanguínea, a fêmea de mosquito *Anopheles* ingere as formas sanguíneas do parasita, mas somente os gametócitos são capazes de evoluir no inseto, iniciando o ciclo esporogônico. É no intestino médio do mosquito que o parasita encontra as condições necessárias à gametogênese, onde o gametócito feminino origina um macrogâmeta e o gametócito masculino, por exflagelação, dá origem a oito microgâmetas, em que cada um deles pode eventualmente fertilizar um macrogâmeta, formando o ovo ou zigoto (forma diplóide). A fusão dos gâmetas origina uma célula diplóide móvel conhecida como oocineto (única forma diplóide em todo o ciclo). O oocineto aloja-se no epitélio do intestino médio, denomina-se agora oocisto onde é iniciada uma divisão meiótica e mitoses sucessivas e são gerados números variados e até elevados de esporozoítos (multiplicação esporogônica). Cerca de 7 dias depois, os esporozoítos libertam-se para a hemolinfa e migram para as glândulas salivares do mosquito (Cirimotich *et al.*, 2010) (figura I-2). Desta forma, quando a fêmea do mosquito efetua uma nova refeição sanguínea, juntamente com a saliva serão injetados, no novo hospedeiro, esporozoítos infetantes, iniciando um novo ciclo

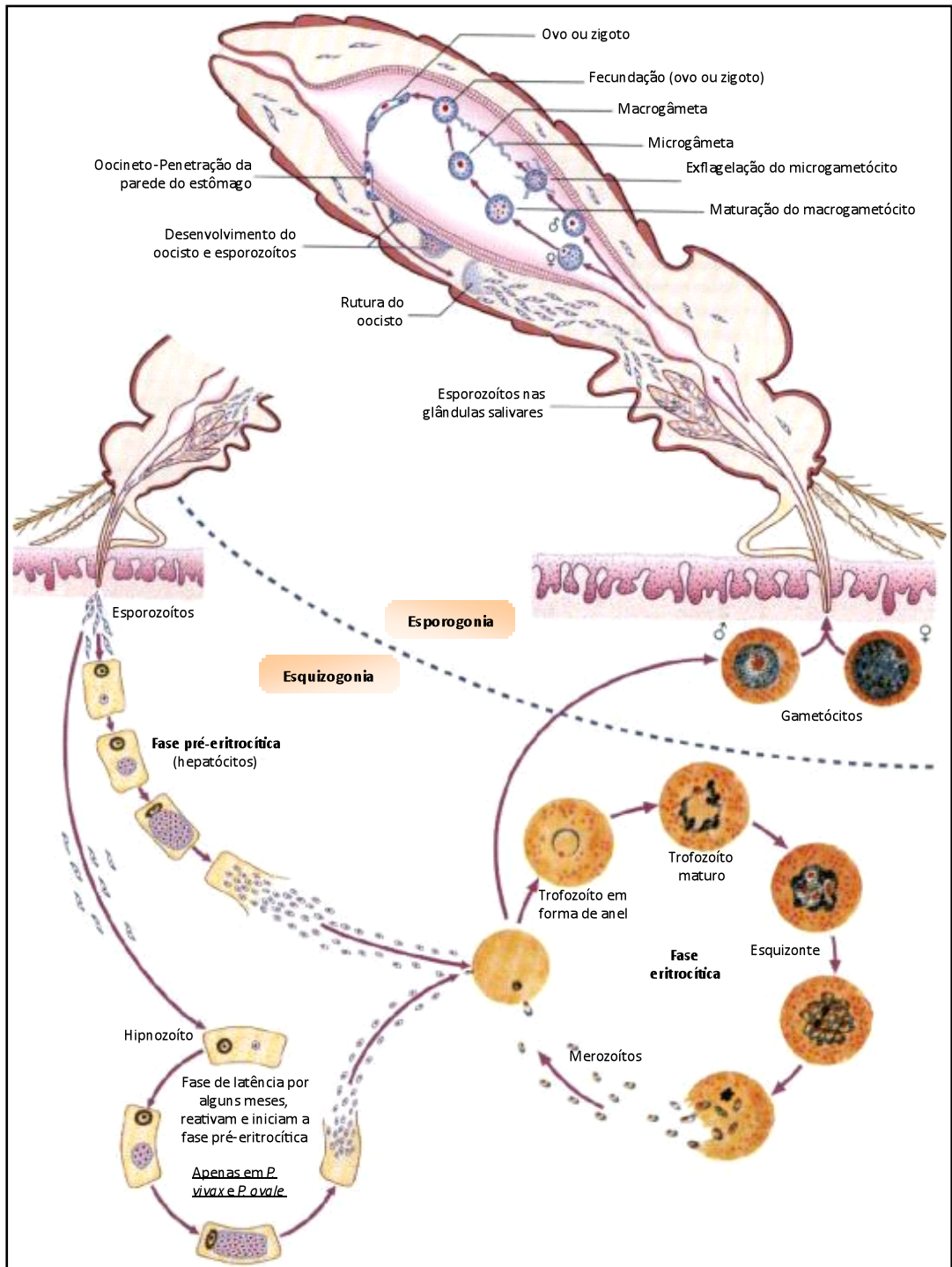


Figura I-2: Ciclo de vida de *Plasmodium* sp (Adaptada de Chiodini *et al.*, 2010).

1.3. Antimaláricos e resistência

A resistência sobretudo de *P. falciparum* à maioria dos antimaláricos, é o grande causador da mortalidade por esta infecção, e afetou fortemente os programas de controlo, de nível regional ou nacional, e os tratamentos individuais. A resistência dos mosquitos vetores aos insecticidas também causou problemas maiores aos programas de controlo mas não será aqui abordado. Enquanto uma vacina eficaz contra a malária não estiver desenvolvida e disponível, a quimioterapia continua a ser a alternativa mais viável para o controlo da infecção e doença (Tetteh & Polley, 2007).

O surgimento da resistência aos antimaláricos está bem revisto nas publicações de Fidock e colaboradores (2008), Greenwood e Mutabingwa (2002), Plowe (2003) e Trape (2001) e, na investigação, tornou-se relevante para se entender não só os mecanismos de resistência dos parasitas ao fármaco utilizado, bem como, no sentido epidemiológico, entender a dispersão da resistência fora do seu foco inicial.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define resistência aos antimaláricos como: “a capacidade de uma estirpe de parasita sobreviver e/ ou se multiplicar, após a administração e absorção de um determinado fármaco numa dose igual ou superior aquela habitualmente recomendada, dentro dos limites de tolerância do hospedeiro” (WHO, 2010).

Durante várias décadas, o fármaco usado para o tratamento da malária foi a cloroquina (CQ), uma 4-aminoquinolina, caracterizada pela sua eficácia, baixa toxicidade e baixo custo. No início de 1940, a CQ foi utilizada em larga escala e uma década mais tarde surgiram os primeiros relatos de estirpes de *P. falciparum* resistentes a CQ. Os relatos iniciais de resistência à cloroquina foram no Brasil e no Sudeste Asiático, devendo-se realçar que no Brasil a utilização do método Pinotti (Pinotti & Soares, 1956) para controlo da malária com utilização de sal cloroquinado pode bem ter tido um efeito maior na selecção de parasitas resistentes.

Hoje, a resistência a CQ está presente na grande maioria das áreas endémicas de malária, tornando o fármaco desaconselhado para o tratamento de

malária por *P. falciparum*. No entanto, apesar da elevada prevalência da resistência a CQ, este fármaco permaneceu em utilização até recentemente (Fidock *et al.*, 2004).

A CQ, foi substituída em algumas áreas pela combinação de dois fármacos antifolatos: sulfadoxina + pirimetamina (Fansidar®). Porém, rapidamente surgem os primeiros casos de falha terapêutica na Ásia, América do Sul e África (figura I-3).

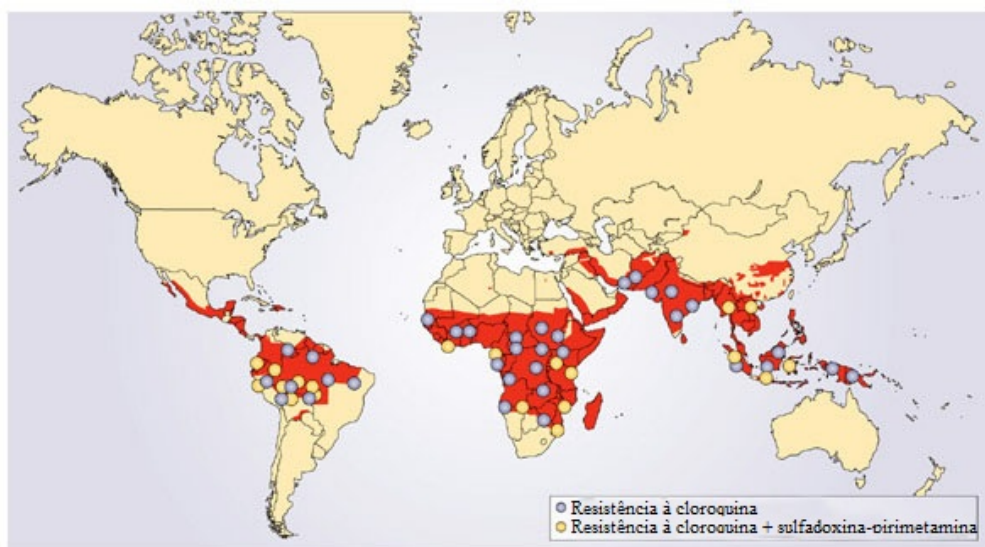


Figura I-3: Distribuição global da malária, com as áreas onde *P. falciparum* é resistente aos antimaláricos: cloroquina e sulfadoxina-pirimetamina (Adaptada de Fidock *et al.*, 2004).

Em 1985, a Tailândia e o Brasil introduziram a mefloquina (MEF) como primeira linha de tratamento para malária causada por *P. falciparum* posteriormente adotada em outras áreas endêmicas. Em 1992 foram observados 40% de falhas terapêuticas, uma vez mais na fronteira entre Tailândia e Camboja, indicando a emergência de resistência do parasita a MEF nessa população (Nosten *et al.*, 1991; Wongsrichanalai *et al.*, 2001).

A artemisinina (ART), extraída da planta *Artemisia annua*, tem sido utilizada por mais de 2000 anos pela medicina tradicional chinesa no tratamento

da febre. A ART foi “redescoberta” pela medicina ocidental na década de 1970 e é uma lactona sesquiterpênica contendo uma função endoperóxido e tem excelente atividade contra malária humana e animal (Opsenica & Solaja, 2009). A sua utilização foi disseminada no final da década de 1990 e até ao presente é recomendada pela OMS em combinação com outros fármacos, como tratamento de primeira linha contra a malária por *P. falciparum*.

A actuação da ART é muito rápida contra todas as fases sanguíneas do parasita, incluindo os gametócitos, o que contribui para a diminuição da transmissão. Após a administração, a ART permanece na corrente sanguínea onde é rapidamente convertida na sua forma activa, dihidroartemisinina (DHA) (Balint, 2001). A ART é rapidamente metabolizada, apresentando uma semi-vida entre 2 a 5 horas, o que pode favorecer o reaparecimento de parasitas após o tratamento (Meschnick, Taylor & Kamchonwongpaisan, 1996), conhecida como recrudescência. Além disso, a ART apresenta baixa biodisponibilidade (Opsenica & Solaja, 2009).

A fim de melhorar as propriedades químicas da ART, análogos sintéticos foram produzidos e chamados de derivados da artemisinina. Os derivados mais importantes são: artesunato (ATN), artemeter (ATM), artemisona, ácido artelínico e (DHA) (metabólito ativo em todos os derivados da artemisinina) (Meshnick, Taylor & Kamchonwongpaisan, 1996). De uma maneira geral estes derivados apresentam uma semi-vida mais prolongada. Atualmente a OMS recomenda a utilização de combinações terapêuticas baseadas em derivados da ART (ACTs), que combinam um derivado, de semi-vida curta, com outro antimalárico de semi-vida mais longa (Menard *et al.*, 2005; Olliaro & Taylor, 2004) em tratamentos de curta duração, usualmente de até 3 dias (tabela I-1).

Tabela I-1 – Antimaláricos e resistência de *P. falciparum* in vivo.

Antimalárico	Primeira utilização	Primeira referência de resistência	Tempo de meia-vida (horas)
Quinino	1632	1910	16
Cloroquina	1945	1957	720 – 1440
Proguanil	1948	1949	12 – 21
Sulfadoxina-pirimetamina (Fansidar®)	1967	1967	72 – 240
Mefloquina	1977	1982	336 – 504
Atovaquona	1996	1996	24 – 72
Artesunato	Década de 1980	2008	< 1
Artemisinina	1980	2008	2 – 5
Piperaquina	1978	1990	336 - 504

(Baseada em Aulas do Mestrado de Parasitologia Médica, 2010)

1.3.1. Combinações terapêuticas baseadas em derivados da artemisinina (ACTs)

Várias combinações terapêuticas estão disponíveis em regiões endêmicas e a administração varia de acordo com a região geográfica. As versões mais utilizadas dos ACTs são:

- a) ATN + MEF, bastante utilizado no sudeste asiático e em alguns países da América do Sul;
- b) ATN + amodiaquina AQ (CoarsucamTM), amplamente utilizado nos países do leste africano;
- c) ATN + SP, usado no Mediterrâneo oriental;
- d) ATM + lumefantrina (LMF) (Coartem[®]), usado nos países da África Central;
- e) DHA + piperquina (PQP), usado na China, Vietnam, Indonésia e Mianmar (Eastman & Fidock, 2009; O'Brien *et al.*, 2011; WHO, 2010).

Porém, em 2008 surgem os primeiros casos de falência terapêutica por diminuição de eficácia dos fármacos derivados da ART (Carrara *et al.*, 2009; Dondorp *et al.*, 2009; Noedl *et al.*, 2008; Noedl, Socheat & Satimai, 2009).

1.3.2. Resistência a derivados da artemisinina

Desde os anos 2000 que se observam indícios de falência terapêutica, dos derivados da artemisinina na fronteira Tailândia-Camboja (Denis *et al.*, 2006; Vijaykadga *et al.*, 2006; WHO, 2010). Recentemente no Camboja foram identificados novos casos de insucesso no tratamento de malária por *P. falciparum* com ATN e ART (Dondorp *et al.*, 2009; Noedl *et al.*, 2008). Nestes pacientes foi verificada recrudescência e aumento do tempo de eliminação (*clearance* da parasitemia) após tratamento, apesar de apresentarem níveis séricos de fármaco adequados.

A fronteira Tailândia-Camboja tem sido historicamente um ponto focal inicial de aparecimento de multiresistência de *P. falciparum* a CQ, SP e MEF (Enserink, 2010). Nesta região existe baixa taxa de transmissão, o que pode resultar em imunidade insuficiente para eliminar os parasitas que possam ter sobrevivido ao tratamento com o fármaco (White & Pongtavornpinyo, 2003). Um estudo realizado por Imwong e colaboradores em 2010 no Oeste do Camboja, demonstrou que embora a resistência à ART pareça ter traços genéticos associados, nenhum dos genes estudados *pfmdr1*, *pfATPase6*, *ubp-1* conferiram resistência a ART.

1.3.3. Mecanismos de ação da artemisinina e derivados

O mecanismo pelo qual a ART e seus derivados exercem a sua ação antimalárica não está completamente esclarecido (Ding, Beck & Raso, 2010; O'Neill, Barton & Ward, 2010). Mas sabe-se que a ART tem um núcleo 1,2,4-trioxano incorporando uma ponte endoperóxido na sua estrutura química, que é essencial para a sua atividade antimalárica (Brossi *et al.*, 1988; Meshnick, 2002). Alguns estudos demonstram que a ligação da ponte endoperóxido ao ferro é essencial para a ativação da ART. A provável fonte do ferro é resultado da degradação proteolítica da hemoglobina do hospedeiro no vacúolo digestivo do parasita (Goldberg, 2005). Uma hipótese alternativa é que a ART exerce a sua atividade por inibir diretamente um alvo único, a ATPase de cálcio (PfATP6), de uma maneira que é heme independente e análoga à inibição do retículo sarcoplasmático Ca^{2+} -ATPase por tapsigargina (Krishna *et al.*, 2010). Vários mecanismos de ação dos derivados da ART têm sido propostos, incluindo o dano oxidativo às membranas do parasita ou inativação de proteínas do parasita (Cui & Su, 2009; Hartwig *et al.*, 2009).

Alvos intracelulares alternativos foram também propostos para os derivados da ART. Li e colaboradores (2005) descobriram que a ART ativada interfere com os componentes da cadeia transportadora de elétrons. Além disso, a interação da ART com a proteína TCTP tem sido proposta em modelos diferentes de malária (Walker *et al.*, 2000).

Também foi descoberto que os derivados ART inibem a endocitose de macromoléculas e a digestão de hemoglobina por parasitas da malária (Hoppe *et al.*, 2004). Além disso, tem sido demonstrado a acumulação de ART dentro do vacúolo digestivo, o que interfere na acumulação lipídica do parasita e consequentemente na sua nutrição (Hartwig *et al.*, 2009). Estes estudos indicam que a ART pode estar relacionada e interferir com a ingestão de nutrientes pelo parasita.

1.3.4. Mecanismos de resistência da artemisinina e seus derivados

Os mecanismos subjacentes à falha terapêutica, aumento da tolerância à ART e talvez resistência a ART, ainda não estão esclarecidos. Um estudo recente tem atribuído um alto nível de hereditariedade no aumento do tempo de

eliminação após o tratamento com ART, indicando fatores genéticos humanos como responsáveis pelo aumento da tolerância a ART (Anderson *et al.*, 2010).

O gene MDR1 de *P. falciparum* (*pfmdr1*) codifica o homólogo da glicoproteína P-1 (Pgh1), realiza a translocação de diversos fármacos e outros xenobióticos através da membrana do vacúolo digestivo e da membrana plasmática do parasita (Cowman & Karcz, 1993). Algumas mutações e amplificação deste gene estão descritas como conferindo resistência à MEF (no sudeste asiático), presumivelmente através de uma capacidade aumentada para efluxo do fármaco (Price *et al.*, 2004; Sidhu *et al.*, 2006). Mutações e amplificação do gene também têm sido associadas com diminuição da sensibilidade *in vitro* às ARTs (Duraisingh *et al.*, 2000; Sidhu *et al.*, 2006; Sisowath *et al.*, 2005).

Mutações no gene *pfATPase6* de *P. falciparum* foram também associadas, (em isolados provenientes da Guiana Francesa) com a diminuição da sensibilidade *in vitro* ao ATN (Jambou *et al.*, 2005). No entanto, não é claro se mutações em *pfATPase6* estão associadas com a resistência a ART *in vivo* (Afonso *et al.*, 2006).

A cadeia transportadora de elétrons na membrana mitocondrial interna é a chave para a produção de adenosina trifosfato (ATP) por parte do parasita. A ativação da ponte endoperóxido da ART por um dador de elétrons é fundamental para sua atividade antimalárica (Imwong *et al.*, 2010).

A resistência a ART induzida em laboratório no modelo *P. chabaudi* foi demonstrada em uma estirpe resistente à CQ. Isto sugere que a resistência a CQ neste modelo poderia ser um pré-requisito para o desenvolvimento subsequente de resistência a ART. Por conseguinte, foram também estudadas no genoma do parasita para a presença da mutação K76T no gene CRT de *P. falciparum* (*pfCRT*), que desempenha um papel central na resistência de *P. falciparum* à CQ (Afonso *et al.*, 2006; Hunt *et al.*, 2007).

Em um estudo realizado por Hunt e colaboradores (2007) foram identificadas duas mutações num gene presente no cromossoma 2 de *P. chabaudi*, este gene codifica a enzima deubiquitinizante, UBP-1. A mutação

V739F foi observada no clone resistente ao artesunato (AS-ATN) e a mutação V770F no clone cloroquina-resistente de alta dose (AS-30CQ). Estas duas mutações dentro do mesmo gene ocorreram independentemente em duas linhas diferentes, sob seleção com artesunato e cloroquina, respectivamente. Cada mutação produziu uma substituição idêntica (V/F), e ocorre em apenas uma das duas regiões que são altamente conservadas em relação ao gene ortólogo de *P. falciparum*.

Existem várias explicações ou tentativas de explicação para os mecanismos de resistência da ART e seus derivados mas nenhum mecanismo está ainda definitivamente demonstrado como o responsável. Assim, com o surgimento da resistência do *P. falciparum* a ART e seus derivados, a produção de novos fármacos com possíveis novos mecanismos de ação se faz extremamente necessária.

1.4. Trioxolanos

Os trioxolanos (1,2,4- trioxolanos), são peróxidos como a ART, fazem parte de uma classe química de compostos orgânicos chamada de ozonídeos (Opsenica & Solaja, 2009) e possuem como farmacóforo (à semelhança da ART) uma ponte endoperóxido (Dong *et al.*, 2005; O'Neil *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2007; Vennerstrom *et al.*, 2004). Os trioxolanos têm demonstrado boa atividade antimalárica *in vivo* e *in vitro*, por vezes superior ao ATN e ao ATM (Opsenica & Solaja, 2009). Existe um trioxolano, OZ439 que concluiu com êxito a fase I de ensaios clínicos, onde foi demonstrado ser seguro em doses de até 1.600 mg e atualmente está na fase II de ensaios em pacientes com malária (Charman, *et al.*, 2011).

A acessibilidade sintética, a diversidade estrutural, a preparação relativamente barata do composto e a estabilidade da função 1,2,4-trioxano permitem a síntese de derivados com diversas estruturas, alargando a possibilidade de desenvolver fármacos potencialmente mais eficazes e a tolerância da porção 1,2,4-trioxolano para diversas condições sintéticas permite a síntese de um número significativo de derivados (Tang *et al.*, 2004).

O trioxolano NAC89, já descrito por Tang e colaboradores (2005) como OZ209, foi sintetizado e demonstrou atividade *in vitro* contra as estirpes de *P.falciparum* resistente (K1) e sensível (NF54) à CQ. Também foi demonstrada a sua atividade *in vivo*, em ratinhos infetados por *P. berghei*.

1.4.1. Estrutura química dos trioxolanos

Os três trioxolanos testados no decorrer deste trabalho, foram sintetizados no Departamento de Química da Universidade do Algarve e foram gentilmente cedidos pela Prof.^a Dra. Lourdes Cristiano, para que fossem testadas suas atividades antimaláricas *in vitro* e *in vivo* (figura I-4).

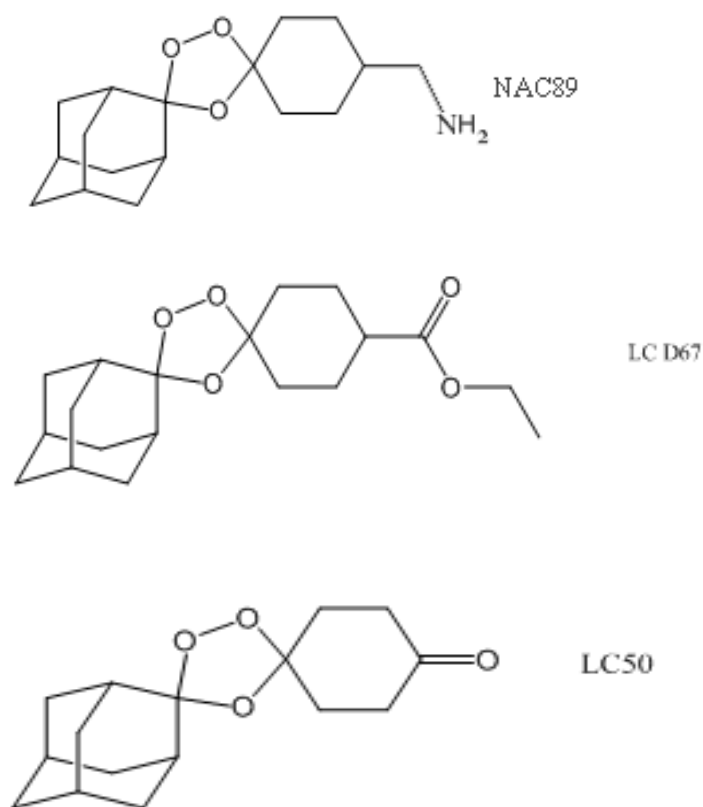


Figura I-4- Estrutura química dos trioxolanos NAC89, LCD67 e LC50.
Imagem gentilmente cedida pela Prof.^a Dra. Lourdes Cristiano.

1.5. Ensaio *in vitro*

Os ensaios *in vitro* foram realizados para a avaliação da atividade antimalárica e da toxicidade dos compostos. Foram realizados testes de

citotoxicidade em hepatócitos, HepG2, e o microteste MARK III (WHO, 2007), contra a estirpe Dd2 de *P. falciparum*, resistente a múltiplos fármacos.

1.6. Ensaio *in vivo*

1.6.1. Modelo murino - *P. chabaudi*

O modelo murino *P. chabaudi* foi escolhido pela boa caracterização das suas linhagens clonais (Carter, 1978). Estas linhagens são todas de crescimento sincronizado (Bagnaresi *et al.*, 2009; Walliker, Carter e Sanderson, 1975) e apresentam um espectro variado de gravidade da doença, diferentes níveis de sequestro e transmissibilidade para mosquitos (Gadsby *et al.*, 2009). O *P. chabaudi*, assim como o *P. falciparum*, invade eritrócitos de todas as idades, inclusive reticulócitos, que aderem as células do endotélio do hospedeiro no estágio de esquizonte (sequestração) e em eritrócitos não parasitados, formando as rosetas (Mackinnon *et al.*, 2002).

A utilização do modelo murino - *P. chabaudi*, como modelo de estudo para a malária permite o acompanhamento do ciclo completo do parasita, incluindo a recombinação genética que ocorre nos mosquitos, estudo impossível de ser realizado com *P. falciparum* devido a problemas éticos e logísticos (Stephens, Culleton & Lamb, 2012).

A estirpe utilizada neste trabalho foi a *P. chabaudi chabaudi* (AS), geralmente não letal, que se assemelha a malária causada pelo *P. vivax* e *P. falciparum* em seres humanos (menos de 0,5% de letalidade) (Achtman *et al.*, 2007), e pode ser de forma relativamente fácil transmitida para *Anopheles stephensi*.

1.6.2. Linhagens de *P. chabaudi*

A estirpe AS de *P. chabaudi* tem sido historicamente utilizada em estudos da evolução da resistência a fármacos, resultando em uma série de parasitas isogênicos, os quais são resistentes a vários fármacos diferentes. Esses parasitas foram obtidos ao longo de gerações sucessivas expostas a antimaláricos diferentes. Como consequência, estes parasitas apresentam o mesmo

“background” genético, mas com mutações em genes envolvidos na resistência ao fármaco utilizado na selecção de cada clone.

Neste trabalho foram utilizadas as estirpes AS- ART, AS- 30CQ, AS- ATN e AS- 3CQ de *P. chabaudi* (Hunt *et al.*, 2010) para a avaliação da actividade antimalárica *in vivo* dos trioxalanos NAC89, LCD67 e LC50.

II - OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

1.1. Avaliar o potencial farmacológico dos trioxolanos NAC89, LCD67 e LC50, como antimaláricos utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*.

2. Objetivos Específicos

2.1. Avaliar a atividade antimalárica *in vitro* dos compostos numa estirpe de *P. falciparum* (Dd2) resistente a múltiplos fármacos;

2.2. Avaliar a citotoxicidade dos compostos em culturas de hepatócitos;

2.3. Determinar o índice de seletividade dos compostos;

2.4. Caracterizar o perfil de resposta à artemisinina e ao artesunato por via subcutânea das estirpes de *P. chabaudi*: AS-3CQ, AS-ATN, AS-30CQ e AS-ART;

2.5. Comparar a eficácia/atividade dos compostos NAC89, LCD67 e LC50 com os fármacos artemisinina e artesunato;

2.6. Avaliar a atividade antimalárica *in vivo*, em modelo murino *P. chabaudi*, dos compostos NAC89, LCD67 e LC50, por via subcutânea;

2.7. Avaliar a eficácia terapêutica da aplicação por via tópica do composto que apresentar melhor atividade antimalárica na via subcutânea;

2.8. Comparar as duas vias de administração no composto testado.

III – MATERIAIS E **MÉTODOS**

1. Compostos teste e controlos

Os trioxalanos NAC89, LCD67 e LC50 foram sintetizados no Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve, pelo grupo da Professora Doutora Maria de Lourdes dos Santos Cristiano e enviados para testes ao IHMT.

Os compostos foram previamente pesados e solubilizados com DMSO (10%) e PBS, sob banho de ultra-som (40°C) para melhor solubilização dos compostos.

Os fármacos utilizados como controlos positivos, artemisinina, artesunato e dihidroartemisinina, também foram fornecidos pela Prof^a Lourdes Cristiano e foram pesados e solubilizados da mesma forma dos compostos em teste.

Para controlo negativo foi preparada uma solução de PBS + DMSO (10%).

2. Ensaios *in vitro*

2.1. Teste de citotoxicidade

2.1.1. Cultura de HepG2

Após a descongelação dos hepatócitos HepG2, eles foram mantidos em frasco de meios de cultura de 20 ml contendo Meio de Williams completo (MWc), com soro fetal bovino (10%), penicilina e streptomina (1%) e NaHCO₃ (0,2%) em estufa de CO₂ (5% CO₂, 2% O₂ e N balanceado) em temperatura de 37°C (ver preparação do MWc em ANEXO I).

2.1.2. Diluição dos compostos

Os compostos NAC89, LCD67 e LC50 foram diluídos em MWc. As doses foram preparadas em triplicados nas concentrações: 0,01; 0,1; 10; 100; 1000; 10.000 e 100.000 ng/ml.

2.1.3. Citotoxicidade

A citotoxicidade dos compostos NAC89, LCD67 e LC50 foi determinada utilizando o método colorimétrico metil-tiazol-tetrazólico

(MTT). Para esse ensaio, as HepG2 foram tratadas com tripsina, lavadas, ressuspensas em MWc, e distribuídas em placa de 96 poços (50 X 10³ células/ poço) e incubados por 18h a 37°C em estufa com ambiente de 5% de CO₂. Como controlo negativo foi utilizado somente o MWc sem adição de composto. Após 24h de incubação nas mesmas condições, retirou-se o sobrenadante e foram adicionados 200 µl das diferentes diluições de cada composto em cada poço (1^a dose). Após mais 24h a 37°C e presença CO₂ foi administrada a 2^a dose de composto e as culturas submetidas às mesmas condições por mais 24h. Finalmente, foram retirados cuidadosamente os sobrenadantes e adicionado o MTT (0,8 mg/ml) em MWc a cada poço sendo de novo submetidos às mesmas condições de cultura por 4h. Após esse tempo, o sobrenadante foi retirado e foi adicionado 200 µl de DMSO por poço para solubilização do corante. A absorvância de cada poço foi medida em espectrofotômetro sob o comprimento de onda 490 nm.

2.1.4. Determinação da DL₅₀

A DL₅₀, designada como a dose de composto necessária para reduzir em 50% a viabilidade das células, foi determinada através de curvas de dose-resposta, em função de regressão não linear. Foi utilizado o software GraphPad Prism 6 (version 6.0).

2.2. Teste de susceptibilidade de *P. falciparum* aos compostos

2.2.1. Eritrócitos não parasitados

O sangue foi colhido por punção venosa em tubos vacutainer® com EDTA, em voluntários do IHMT. Após a coleta o sangue foi centrifugado (676xg / 5 min.) e retirado o plasma. Os eritrócitos foram lavados com PBS e centrifugados várias vezes para retirar os glóbulos brancos. Os eritrócitos obtidos foram mantidos em frigorífico a 4°C, com hematócrito de 50% com meio de cultura RPMI completo, até a sua utilização (ver preparação do meio RPMI em ANEXO I).

2.2.2. Diluição dos compostos

Os compostos NAC89, LCD67, LC50, ART e ATN foram diluídos em meio de cultura RPMI completo. As doses foram preparadas em triplicado nas concentrações: 0,156; 0,313; 0,625; 1,250; 2,500; 5 e 10 ng/ml.

2.2.3. Cultura *in vitro* de *P. falciparum*

A cultura *in vitro* dos clones de *P. falciparum*, foi efetuada de acordo com os métodos descritos por Trager & Jensen (1976) e Thaithong, Seugorn & Beale (1994), com algumas adaptações. Basicamente, este tipo de cultura de plasmódios consiste na manutenção dos eritrócitos, em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) suplementado com HEPES 25 mM (Sigma), Hipoxantina 6,8M (Sigma), Bicarbonato de Sódio 0,2% (Sigma) e AlbumaxII 0,5% (Invitrogen™), com um hematócrito de 5%, 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. O desenvolvimento dos parasitas foi avaliado pela observação por microscopia óptica, de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa (Merck) a 20%, em H₂O.

2.2.4. Sincronização de culturas *in vitro* de *P. falciparum* com sorbitol

Dado que em cultura de *P. falciparum* se observa a presença simultânea de todos os estádios eritrocitários do parasita (anéis, trofozoítos, esquizontes e por vezes, gametócitos), é necessário sincronizar a cultura para execução dos ensaios de susceptibilidade *in vitro* aos fármacos.

Este método baseia-se no facto dos eritrócitos infectados com parasitas com mais de 20 horas de desenvolvimento intra-eritrocitário, apresentarem uma maior fragilidade osmótica (Lambros & Vanderberg, 1979) sendo lisados devido a ação do sorbitol.

Resumidamente, as culturas (\approx 10% de parasitemia), com predominância de parasitas jovens, são centrifugadas (676xg 5 min.) e ao *pellet* são adicionados 10 volumes de sorbitol (Merck) a 5% estéril. Após 10 min. a 37°C, a cultura é centrifugada e lavada 2X com RPMI sem plasma, os eritrócitos recuperados após a última centrifugação são colocados nas condições de cultura. Se necessário este protocolo pode ser repetido 6 a 8 horas depois.

2.2.5. Teste morfológico *in vitro*

Foram preparadas culturas de *P. falciparum*, da estirpe Dd2 (Oduola *et al.*, 1988; Rosário, 1981) sendo o ensaio iniciado com uma parasitemia de 0,6% e hematócrito de 5%.

Em cada poço das placas de poliestireno (Nunclon), foram colocados 90µl de cada solução dos compostos a testar. Foram depois adicionados em cada poço 10 µl de sangue infectado da estirpe Dd2. Mantêm-se estas culturas em estufa de 5% de CO₂ a 37°C. Decorridos 24-30h, despreza-se o sobrenadante de cada poço, e com o *pellet* de cada micro cultura é efectuado um esfregaço em lâmina, que depois de seca durante 24h, é fixada com metanol e coradas com Giemsa 20%, durante 20 minutos.

2.2.6. Leitura dos resultados dos ensaios de susceptibilidade *in vitro*

A leitura do teste é efectuada pela contagem do número de esquizontes, com 3 ou mais núcleos (viáveis), num total de (pelo menos) 1000 eritrócitos no total em cada dose. Assegura-se de que a cultura controlo apresente um número visível de esquizontes (superior a 10%), confirmando o crescimento do parasita nas condições de cultura em que decorreram os ensaios. Todos os testes com contaminação bacteriana ou por fungos, ou sem crescimento visível dos parasitas nos controlos (sem fármaco), deverão ser eliminados do estudo.

2.2.7. Determinação do IC₅₀

A inibição do crescimento de 50% dos parasitas (IC₅₀) foi determinada através de curvas de dose-resposta, em função de regressão não linear. O cálculo é feito através da percentagem de sobrevivência dos parasitas nos grupos tratados com compostos em relação ao grupo controlo não tratado, onde 100% de sobrevivência dos parasitas é observada. Foi utilizado o programa Graphpad Prism 6, para determinação do IC₅₀ onde foi utilizada a fórmula $\%P = (pRBC / RBC) \times 100$ para determinação da parasitemia.

2.3. Índice de Seletividade

O índice de seletividade (IS) dos compostos testados foi obtido calculando a razão entre o valor de DL₅₀ e o valor de IC₅₀. Valores maiores que 10 foram considerados indicativos de ausência de toxicidade, enquanto compostos com valores abaixo de 10 foram considerados tóxicos (Bézivin *et al.*, 2003).

3. Ensaio *in vivo*

3.1. Ensaio *in vivo* – administração por via subcutânea

3.1.1. Animais

No biotério, todos os animais foram alojados em condições de temperatura, luminosidade e humidade controladas e receberam água e ração *ad libitum*. Para cada teste de susceptibilidade *in vivo*, ou seja para cada estirpe parasitária, 45 fêmeas de *Mus musculus* BalbC com 20g ± 2g de peso e 6 a 8 semanas de vida, provenientes do biotério do IHMT, foram inoculadas por via intraperitoneal com 1 X 10⁷ eritrócitos parasitados por *P. chabaudi* provenientes de ratinho dador da estirpe CD1. Em cada experiência foi incluído um grupo controlo negativo, tratado com PBS + DMSO (10%). Cada ensaio e dose foi realizado num grupo de 5 ratinhos.

3.1.2. Estirpes de *P. chabaudi*

Os animais foram infectados com as estirpes de *P. chabaudi*, AS-3CQ (Hunt *et al.*, 2010), AS-30CQ (Hunt *et al.*, 2010), AS-ART (Hunt, *et al.*, 2010) e AS-ATN (Hunt, *et al.*, 2010).

As estirpes mantidas em ampolas criopreservadas foram descongeladas e imediatamente inoculadas, intraperitonealmente, (inoculo cego) em fêmeas de CD1. Depois de três a quatro dias a parasitemia foi verificada para preparação do inoculo padrão de 1 X 10⁷ eritrócitos parasitados/ 200µl para infecção de cada ratinho BalbC.

3.1.3. Diluição dos compostos

Os compostos NAC89, LCD67, LC50, ART, e ATN foram administrados nas doses de 10 e 50 mg/kg/dia em 3 dias consecutivos. Com

exceção do composto NAC89 que foi administrado nas doses de 2 e 10 mg/kg/dia em 3 dias consecutivos.

Como controlo negativo os ratinhos receberam por via subcutânea PBS com 10% de DMSO, o mesmo veículo utilizado para diluição dos compostos.

3.1.4. Via de administração subcutânea

Os ratinhos foram infectados com *P. chabaudi* no dia 0 (D0) e começaram a ser tratados por via subcutânea, na região dorsal (figura III-1), 24 horas depois (D1), 48 horas depois (D2) e 72 horas depois (D3) no mesmo horário.



Figura III-1: Tratamento por via subcutânea.

3.2. Ensaio *in vivo* com aplicação tópica do composto LC50

Foram realizados testes com uso tópico da pomada do composto LC50.

3.2.1. Animais

Os animais foram alojados e infectados como descrito na secção anterior. No biotério, todos os animais foram alojados em condições de temperatura, luminosidade e humidade controladas e receberam água e ração *ad libitum*. Fêmeas de *Mus musculus* da estirpe CD1 foram inoculadas com eritrócitos infectados com a estirpe AS- ART de *P. chabaudi* a testar. Para o

teste de susceptibilidade *in vivo*, fêmeas de *Mus musculus* da estirpe BalbC com $20\text{g} \pm 2\text{g}$ de peso e 6 a 8 semanas de vida, provenientes do biotério do IHMT, foram inoculadas por via intraperitoneal com inóculo 1×10^7 eritrócitos parasitados por *P. chabaudi* provenientes da estirpe CD1. Em cada experiência foi incluído um grupo controlo negativo, tratado com pomada a base de vaselina como excipiente e sem composto.

Para esse tipo de tratamento, foi necessário tosquear o pêlo da região dorsal dos animais com tosqueador eléctrico (figura III-2).

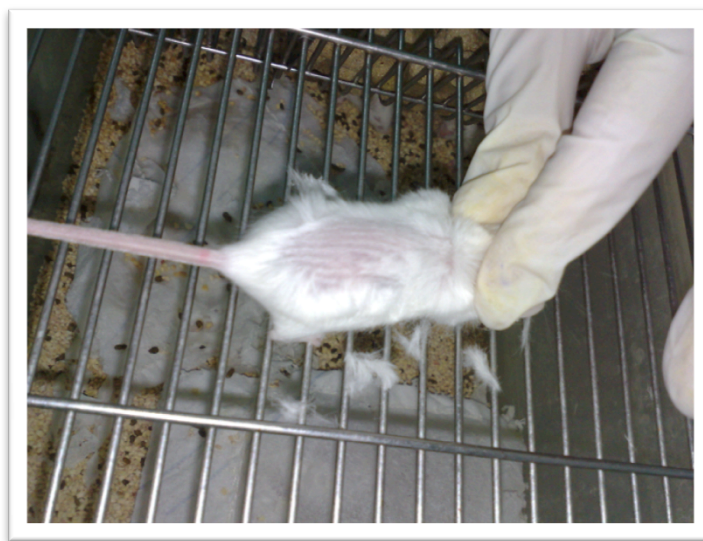


Figura III-2: Tosqueamento do pêlo para tratamento por via tópica.

3.2.2. Estirpes

Os animais foram infectados com a estirpe de *P. chabaudi*, AS-ART (Afonso, *et al.*, 2006).

A estirpe mantida em ampolas criopreservada foi descongelada e imediatamente inoculada, intraperitonealmente, (inóculo cego) em fêmeas de CD1. Depois de três a quatro dias a parasitemia foi verificada para preparação do inóculo padrão de 1×10^7 eritrócitos parasitados/ $200\mu\text{l}$ para infecção de cada BalbC.

3.2.3. Doses

A pomada de LC50 foi testada na dose de 50 mg/Kg do composto (100 μ l). Como controlo negativo foi utilizada vaselina e óleo mineral, o excipiente do produto com antimalárico.

3.2.4. Aplicação por via tópica do composto LC50

A administração da pomada seguiu o mesmo protocolo anterior, com infecção no D0 e tratamentos nos três dias consecutivos, com aplicação da pomada na região dorsal (previamente tosqueada). Aqui os animais foram anestesiados, antes da aplicação da pomada com 100 μ l de anestésio (5% de Rompum®- Xilazina, 20% de Imalgene®- Ketamina e 75% de PBS) por via intraperitoneal e cobertos durante 1 hora com pano, de forma a reduzir ao máximo a agitação dos animais e hipotermia (figura III-3).



Figura III-3: Animais anestesiados e tratados com LC50 por via tópica.

3.3. Avaliação da atividade dos compostos

3.3.1. Cálculo da parasitemia

Nos animais tratados por via subcutânea ou por via tópica com pomada, foram feitos esfregaços sanguíneos destes ratinhos a partir do dia D4 (Peters *et al.*, 1986) e nos dias consecutivos D6, D8, D10, D12, D14, D16, D18 e D20 após a infecção no (D0), ver 2.2.7.

3.3.2. Cálculo da área abaixo da curva (*Area Under Curve* - AUC)

A atividade antimalárica *in vivo* foi determinada pelo cálculo da área abaixo da curva (AUC) do dia 0 ao dia 20. A (AUC) é um resumo de cálculo utilizado quando as medições seriadas de cada indivíduo em estudo são realizadas. Resultados alternativos incluem média de todas as medições, a altura de pico, o tempo para atingir o pico e o tempo para voltar à linha de base (Matthews, *et al.*, 1990). As estirpes de *P. chabaudi* AS-3CQ, AS-ATN, AS-30CQ e AS-ART não são letais (ratinhos resolvem a infecção em ~ 16 dias, sem tratamento), acreditamos que os parâmetros habituais para expressar a eficácia de um fármaco como: o tempo de supressão da parasitemia ou aumento do tempo de vida dos animais, não são as melhores variáveis para estimar a eficácia do fármaco, neste caso. Assim, propõe-se a utilização da AUC para expressar a evolução da parasitemia após o tratamento, uma vez que incorpora tanto a magnitude como a duração da parasitemia patente.

A atividade dos compostos foi determinada como a percentagem da AUC relativamente ao grupo controlo não tratado pela fórmula:

$$\frac{(100 - \text{AUC da média do grupo controlo não tratado})}{\text{AUC média do grupo teste}} \times 100$$

3.4. Análise estatística

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software GraphPad Prism version 6.0a (Trial) 2012 (GraphPad Inc. All rights reserved) para realização dos testes estatísticos Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. O primeiro teste é utilizado para a comparação de mais de duas amostras, independentes ou não relacionadas. A hipótese nula é de que as populações de onde as amostras se originam têm a mesma mediana. Quando o teste de Kruskal-Wallis conduz a resultados significativos ($P < 0,05$), então pelo menos uma das amostras é diferente das outras amostras. O teste não identifica onde as diferenças ocorrem ou como muitas diferenças realmente ocorrem. Uma vez

que é um método não paramétrico, o teste não assume uma distribuição normal. Já o teste de Mann-Whitney é um teste utilizado para comparar apenas duas amostras, independentes e não relacionadas. É um teste não paramétrico e deve ser usado quando os dados das amostra não assumem uma distribuição normal. Se o valor de P resultante é reduzido ($P < 0,05$), em seguida, uma diferença estatisticamente significativa entre as duas amostras pode ser aceita.

IV - RESULTADOS

1. Testes *in vitro*

1.1. Atividade antimalárica *in vitro*

Os valores de IC_{50} foram obtidos a partir de curvas de dose-resposta resultantes dos testes de susceptibilidade com a estirpe Dd2 de *P. falciparum* para cada um dos compostos. A percentagem de sobrevivência dos parasitas em função do logaritmo das diferentes doses de cada composto estão representadas (figura IV-1). As linhas a preto correspondem às curvas de regressão não linear a partir das quais foram estimados os valores de IC_{50} para o NAC89 de 1,703 ng/ml, LCD67 de 1,971 ng/ml, LC50 de 0,738 ng/ml, ART de 0,714 ng/ml e DHA de 1,135 ng/ml.

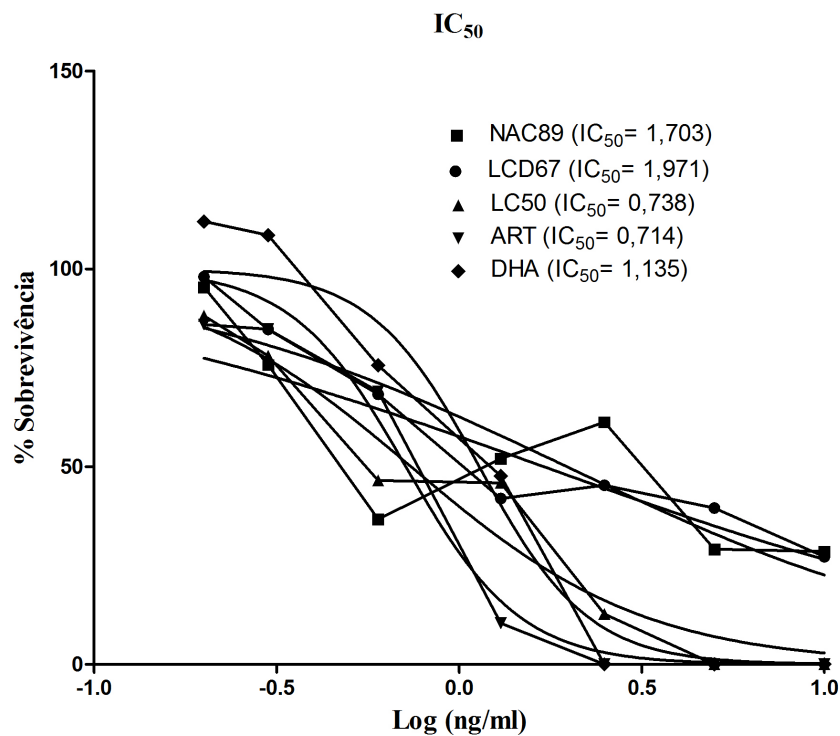


Figura IV-1: Curvas de dose-resposta relativas aos compostos NAC89, LCD67, LC50, ART e DHA em função do logaritmo das diferentes doses de cada composto e seus respectivos IC_{50} em estirpe Dd2 de *P. falciparum*.

1.2. Citotoxicidade dos compostos em culturas de hepatócitos

Na dose de 100.000 ng/ml, o composto LCD67 em comparação com os outros dois compostos apresentou a maior percentagem de sobrevivência de hepatócitos e conseqüentemente menor citotoxicidade, DL₅₀ de 23.576 ng/ml. O composto LC50 apresentou uma percentagem de sobrevivência intermédia na mesma dose e DL₅₀ de 31.841 ng/ml. Enquanto o composto NAC89 na dose de 100.000 ng/ml apresentou a menor percentagem de sobrevivência de hepatócitos, indicando a maior citotoxicidade, DL₅₀ de 53.812 ng/ml em comparação com os compostos LCD67 e o LC50 (figura IV-2).

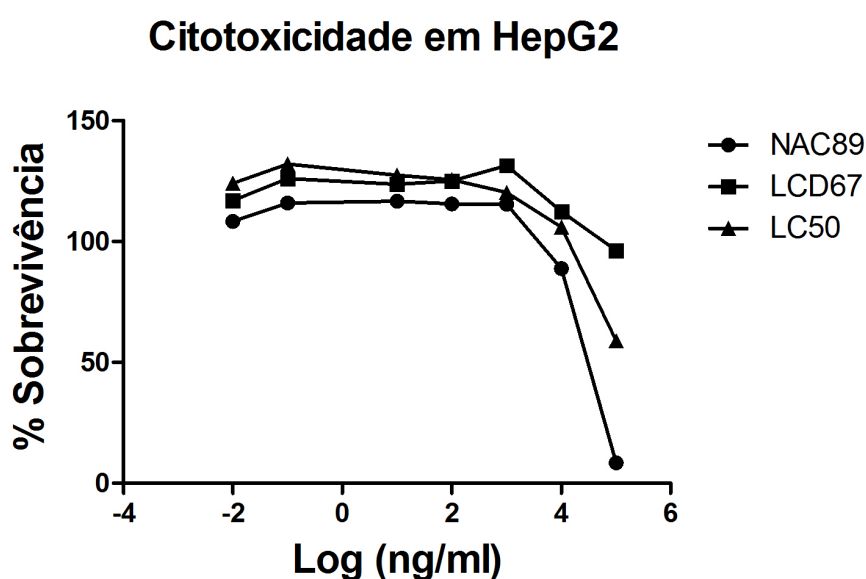


Figura IV-2: Curvas de dose-resposta relativas a sobrevivência dos hepatócitos HepG2 tratados com os compostos NAC89, LCD67 e LC50 em função do logaritmo das diferentes doses de cada composto sob o comprimento de onda de 490 nm ($p \leq 0,05$).

1.3. Determinação do índice de seletividade dos compostos

Tal como descrito no capítulo relativo aos materiais e métodos, para avaliar o potencial farmacológico dos trioxolanos NAC89, LCD67 e LC50, como antimaláricos foi determinada a sua atividade *in vitro* contra a estirpe Dd2 de *P. falciparum* (resistente a múltiplos fármacos) e uma linha celular de

hepatócitos HepG2. Com estes dois parâmetros foi seguidamente determinado o índice de seletividade (IS)

O cálculo do índice de selectividade (IS) de cada composto foi feito a partir da razão entre a dose tóxica (letal) para 50% das células (DL₅₀) e sua actividade anti- *P. falciparum* (IC₅₀). Essa análise demonstrou que todos os compostos são seguros, uma vez que a relação entre dose tóxica e dose efetiva, avaliada pelo IS (> 10), apresenta uma ampla janela terapêutica (tabela IV-1).

Tabela IV-1: Atividade antimalárica, citotoxicidade e índice de seletividade.

Compostos	Dd2	HepG2	IS
	IC ₅₀ (ng/ml)	DL ₅₀ (ng/ml)	
NAC89	1,703	53.812	31.598
LCD67	1,971	23.576	11.961
LC50	0,738	31.841	43.145
ART	0,71	ND*	ND*
DHA	1,14	ND*	ND*

* ND: Não determinado

2. Testes *in vivo*

2.1. Avaliação da atividade antimalárica por via subcutânea

2.1.1. Caracterização do perfil de resposta das estirpes de *P. chabaudi*, AS-3CQ, AS-ATN, AS-30CQ e AS-ART à artemisinina e ao artesunato

As atividades antimaláricas da ART e do ATN foram avaliadas *in vivo* em ratinhos BalbC infetados com as estirpes de *P. chabaudi*, AS-3CQ, AS-ATN, AS-30CQ e AS-ART para verificação do desenvolvimento da infecção em animais tratados e não tratados ao longo de 20 dias. A partir das parasitemias medidas em dias alternados ao longo de 20 dias foram determinadas as AUCs para cada grupo (5 animais).

A evolução das parasitemias nas 4 estirpes apresentou-se bastante semelhante na ausência de tratamento, sendo que a média de parasitemia se situou entre 20 e 32%. Quando tratados com 50/mg/Kg/dia as parasitemias apresentaram-se mais baixas (cerca de 4 a 8 vezes mais baixas do que os grupos não tratados). O grupo que apresentou maior variação das parasitemias foi aquele tratado com 10 mg/Kg/dia, entre 3 e 24% (figura IV-3).

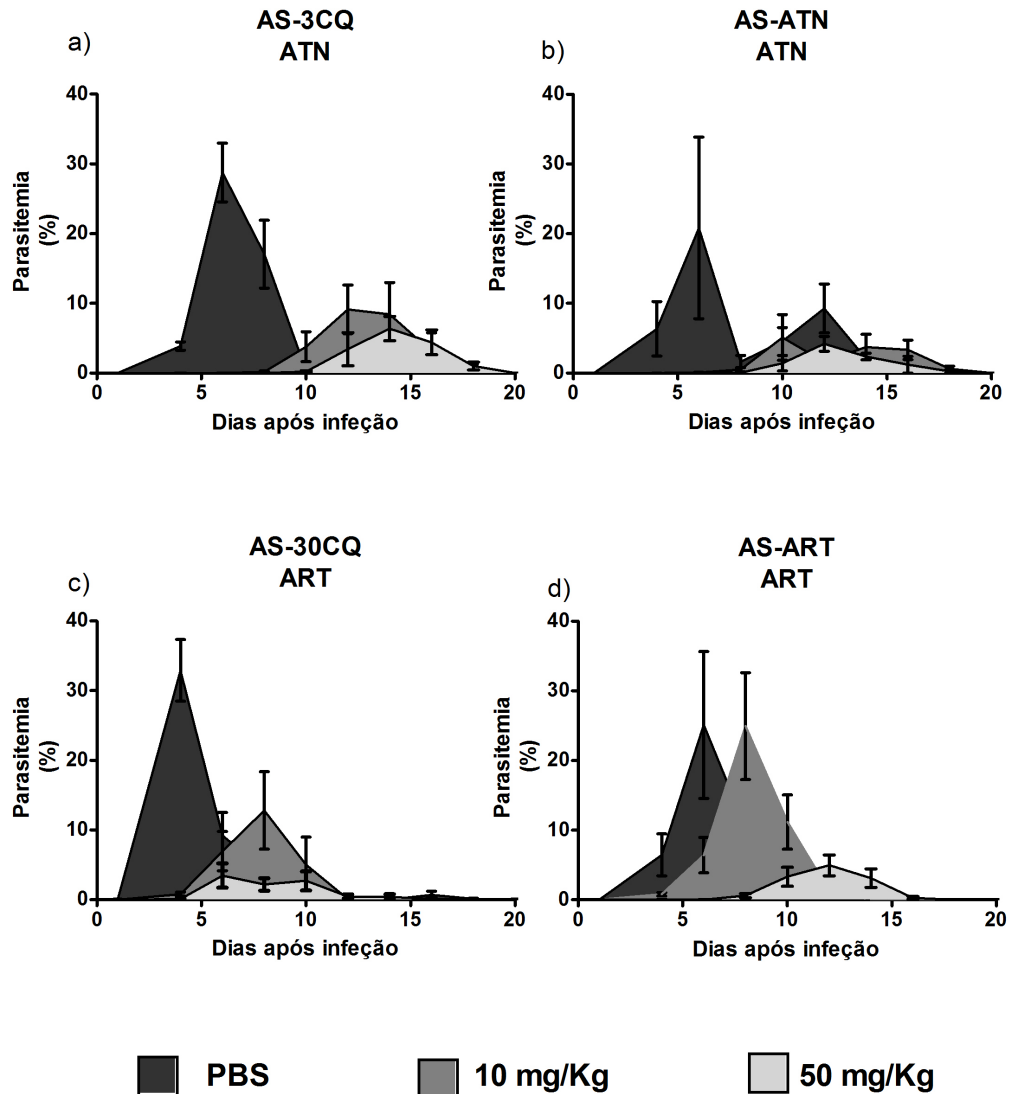


Figura IV-3: Perfil de resposta à artemisinina e ao artesunato por via subcutânea das estirpes de *P. chabaudi* AS-3CQ, AS-ATN, AS-30CQ e AS-ART. Onde o grupo a cinzento escuro foi tratado com PBS, o grupo a cinzento médio foi tratado com dose de 10 mg/Kg e o grupo a cinzento claro foi tratado com dose de 50 mg/Kg (n = 5; p ≤ 0,05).

2.1.2 Atividade antimalárica dos compostos NAC89, LCD67 e LC50 por via subcutânea

A atividade antimalárica *in vivo* dos compostos foi determinada pelo cálculo da área abaixo da curva (AUC) correspondente às parasitemias do dia 0 ao dia 20.

Dado que na dose de 50mg/Kg/dia o composto NAC89 induziu sinais de stress, necrose e queda de pêlo no local da injeção as doses do mesmo foram diminuídas para 2 e 10 mg/Kg/dia (figura IV-4).



Figura IV-4: Animal com queda de pêlo no local da injeção do composto NAC89 na dose de 50 mg/Kg por via subcutânea.

Nos gráficos das figuras IV-4, VI-5, IV-6 e IV-7, as barras representam as médias da AUC de 5 animais; o valor de p corresponde ao valor do teste de Kruskal-Wallis efetuado para testar a igualdade das medianas das AUCs.

Na estirpe AS-3CQ, todos os compostos foram significativamente diferentes dos controlos tratados com PBS e reduziram significativamente a parasitemia na dose máxima, sendo que os compostos NAC89 e LC50 também reduziram significativamente a parasitemia na dose de 10 mg/Kg (figura IV-5).

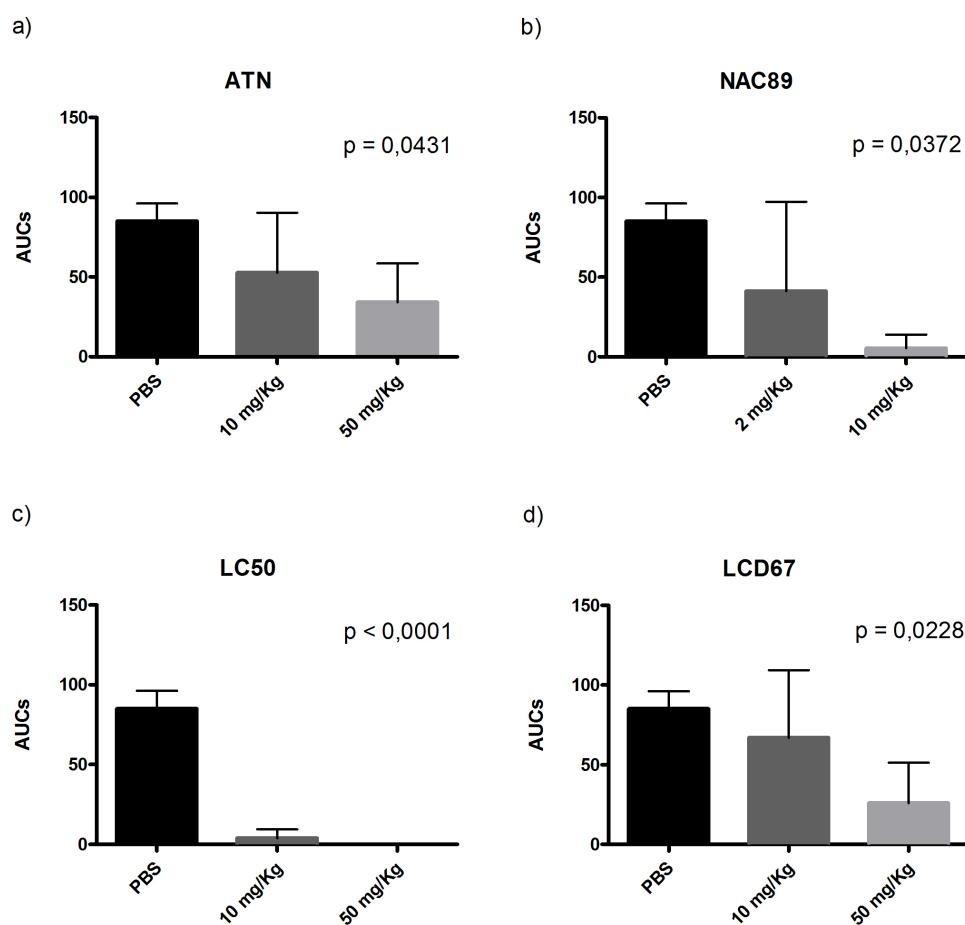


Figura IV-5: AUCs dos grupos infetados com a estirpe AS-3CQ de *P. chabaudi* e tratados com os compostos NAC89, LCD67 e LC50. Barra a preto, grupo tratado com PBS, barra a cinzento escuro, grupo tratado com 2 mg/Kg (NAC89) e 10 mg/Kg (ATN, LCD67 e LC50) e barra a cinzento claro, grupo tratado com 50 mg/Kg (ATN, LCD67 e LC50).

Na estirpe AS-ATN, todos os compostos foram significativamente diferentes dos controlos tratados com PBS e reduziram significativamente a parasitemia nas doses máximas e mínimas, com exceção do composto LCD67 que na dose mínima não reduziu a parasitemia (figura IV-6).

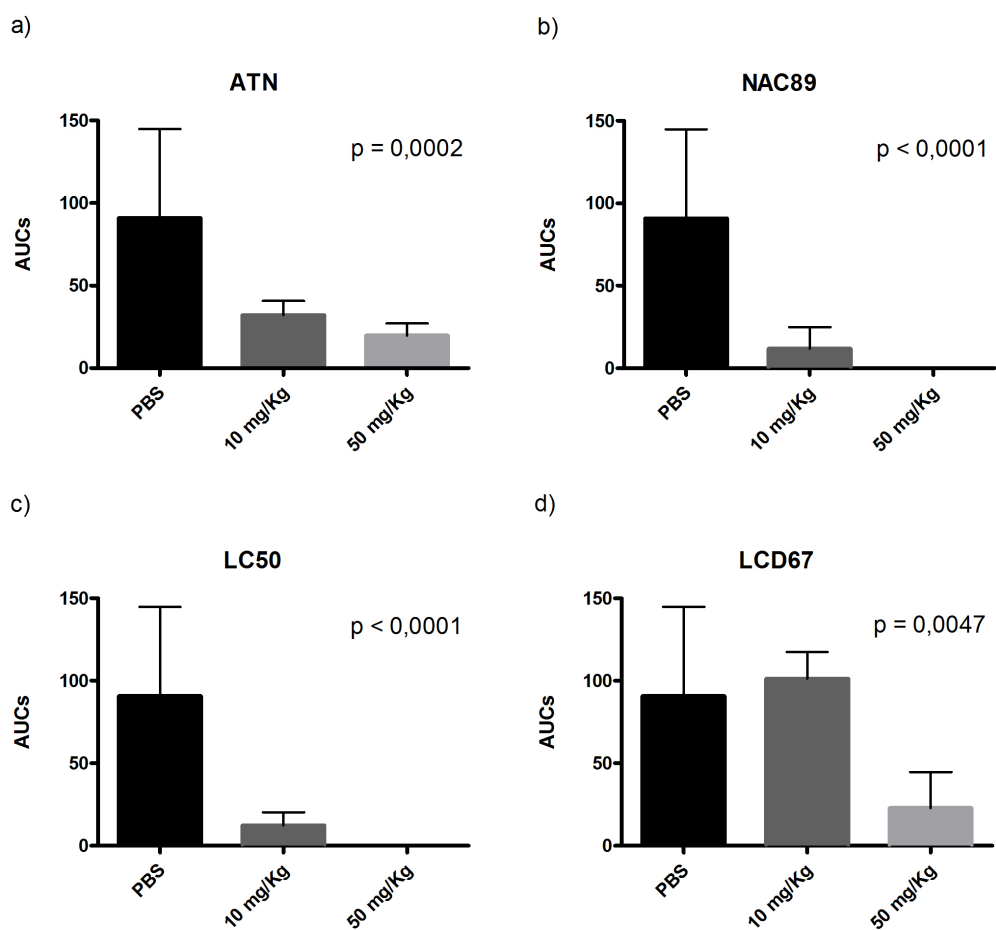


Figura IV-6: AUCs dos grupos infetados com a estirpe AS-ATN de *P. chabaudi* e tratados com os compostos NAC89, LCD67 e LC50. Barra a preto, grupo tratado com PBS, barra a cinzento escuro, grupo tratado com 10 mg/Kg e barra a cinzento claro, grupo tratado com 50 mg/Kg de composto.

Na estirpe AS-30CQ, todos os compostos foram significativamente diferentes dos controlos tratados com PBS e reduziram significativamente a parasitemia nas doses máximas e mínimas, com exceção do LCD67 que na dose mínima não reduziu a parasitemia (figura IV-7)

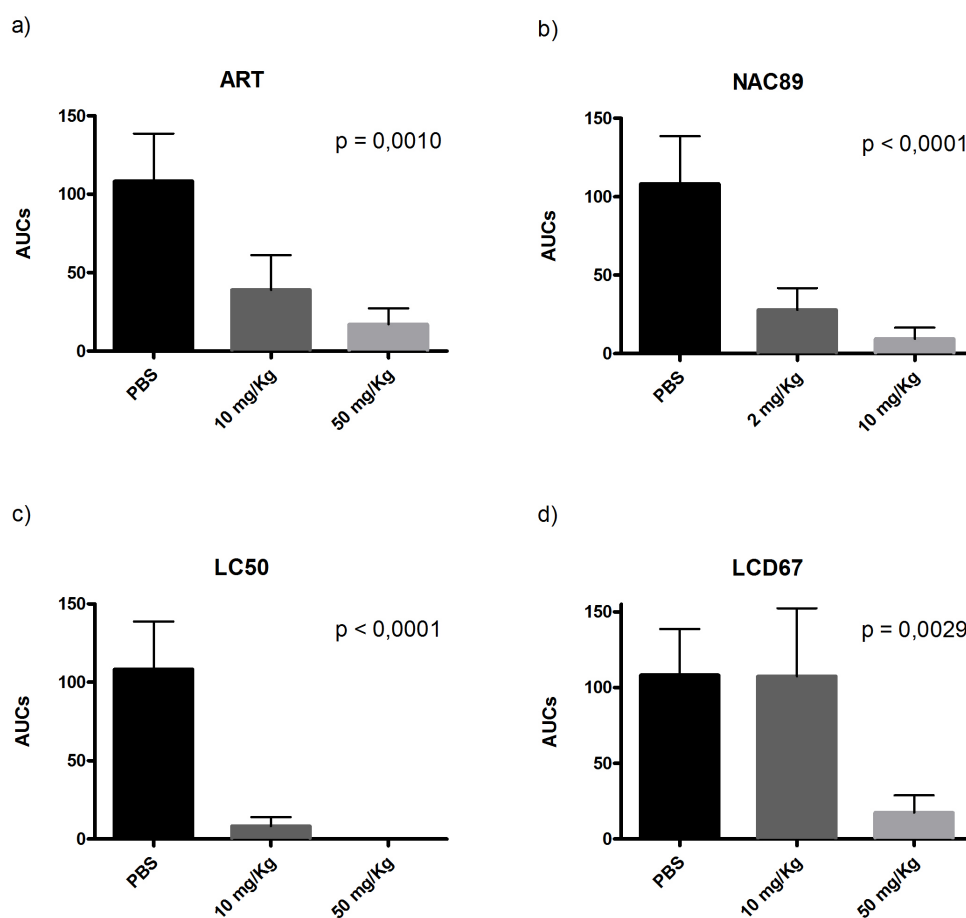


Figura IV-7: AUCs dos grupos infetados com a estirpe AS-30CQ de *P. chabaudi* e tratados com os compostos NAC89, LCD67 e LC50. Barra a preto, grupo tratado com PBS, barra a cinzento escuro, grupo tratado com 2 mg/Kg (NAC89) e 10 mg/Kg e barra a cinzento claro, grupo tratado com 50 mg/Kg de composto.

Na estirpe AS-ART, os compostos NAC89 e LC50 foram significativamente diferentes dos controlos tratados com PBS e reduziram significativamente a parasitemia nas doses máximas e mínimas. Já o composto LCD67 não foi significativamente diferente do controlo tratado com PBS (figura IV-8).

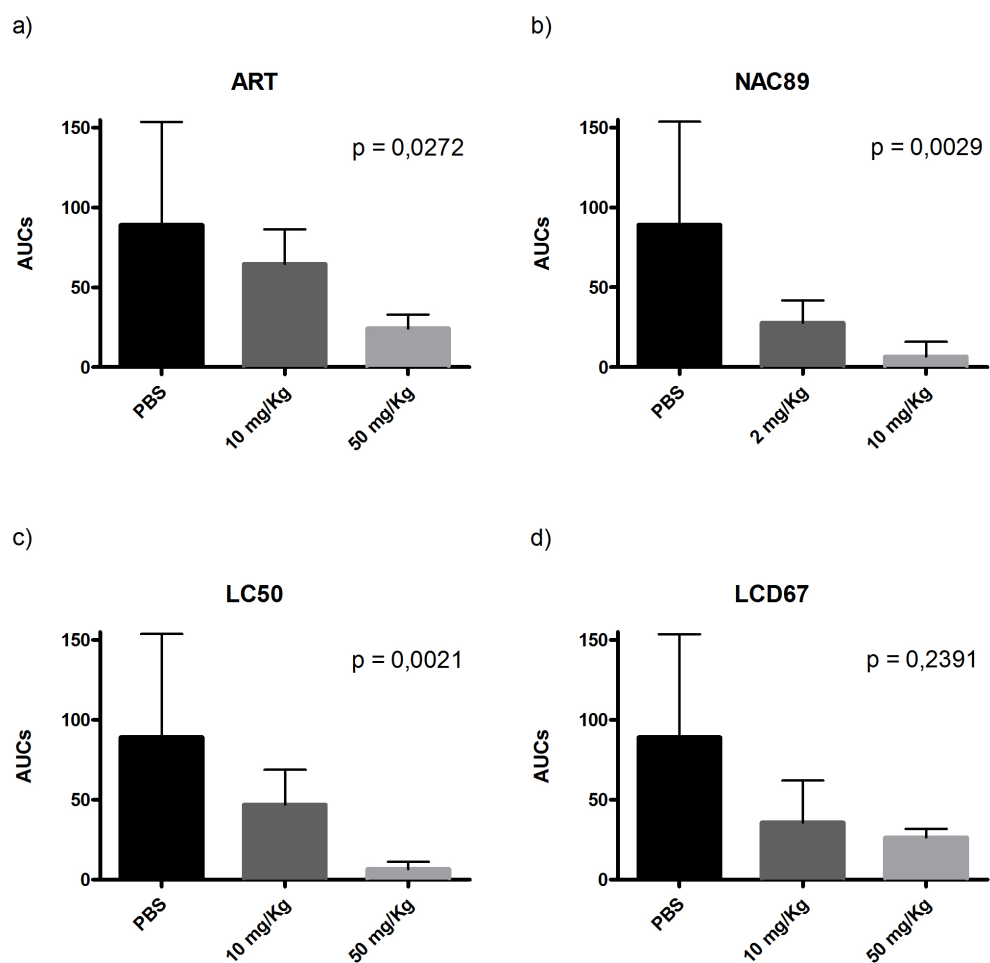


Figura IV-8: AUCs dos grupos infectados com a estirpe AS-ART de *P. chabaudi* e tratados com os compostos NAC89, LCD67 e LC50. Barra a preto, grupo tratado com PBS, barra a cinzento escuro, grupo tratado com 2 mg/Kg (NAC89) e 10 mg/Kg e barra a cinzento claro, grupo tratado com 50 mg/Kg de composto.

2.1.3. Comparação da eficácia dos compostos NAC89, LCD67 e LC50 com os fármacos artemisinina e artesunato

A eficácia dos compostos NAC89, LCD67 e LC50 foi comparada com a eficácia dos compostos ART ou ATN. O composto LC50 foi mais eficaz que a ART e ATN nas doses máximas e mínimas nas 4 estirpes testadas. O NAC89 foi mais eficaz que ART e ATN nas doses de 10 mg/Kg e 50 mg/Kg nas 4 estirpes mas não foi eficaz na dose mínima de 2 mg/Kg. O composto LCD67 em relação

a ART e ATN não foi mais eficaz em nenhuma dose e nenhuma estirpe testada (figura IV-9 e figura IV-10)

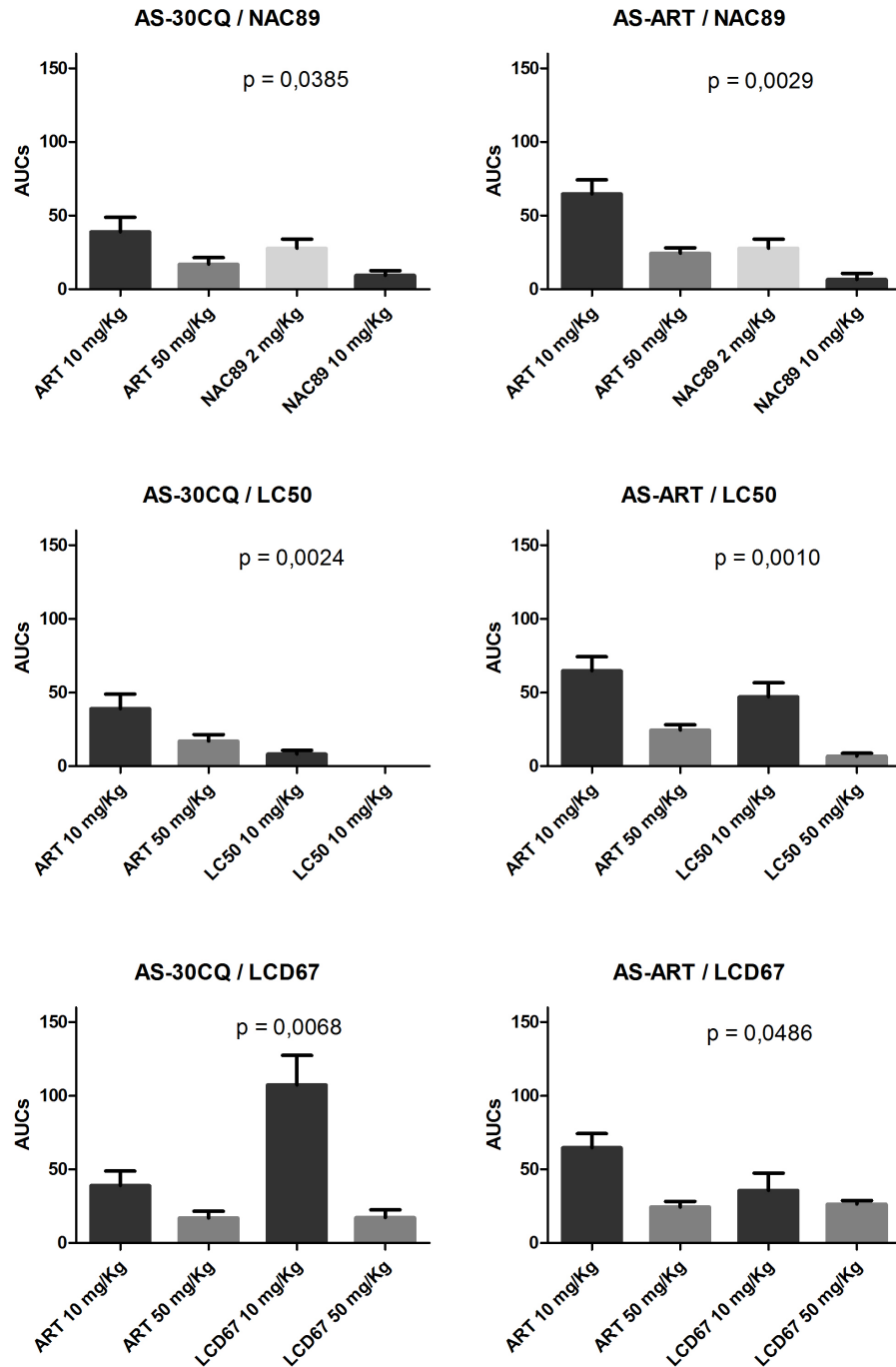


Figura IV-9: AUCs dos grupos infetados com a estirpe AS-30CQ e AS-ART de *P. chabaudi* e tratados com os compostos NAC89, LCD67, LC50 e ART. Barra a cinzento escuro, grupo tratado com 10 mg/Kg, barra a cinzento médio, grupo tratado com 50 mg/Kg e barra a cinzento claro, grupo tratado com 2 mg/Kg.

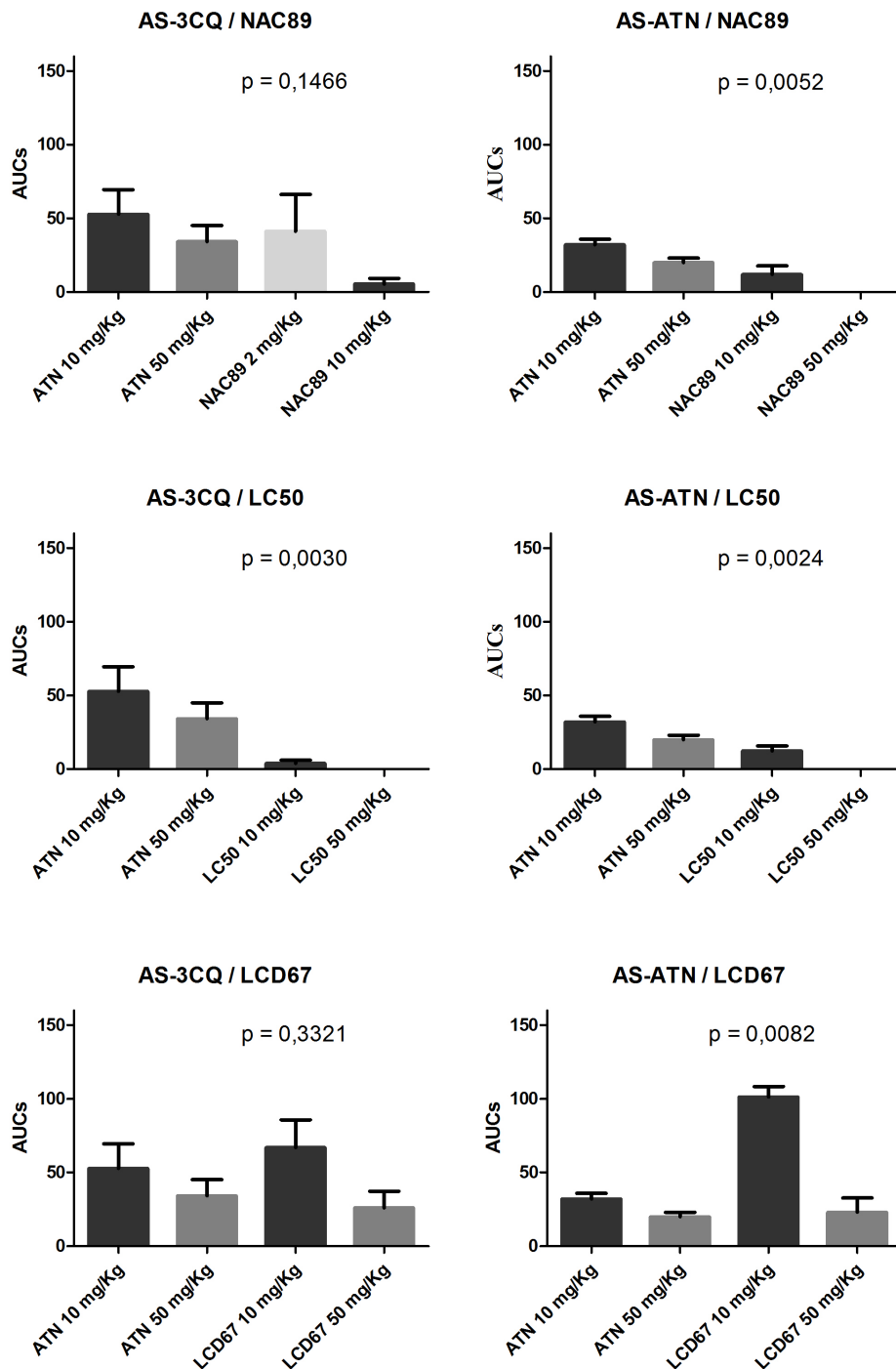


Figura IV-10: AUCs dos grupos infetados com a estirpe AS-3CQ e AS-ATN de *P. chabaudi* e tratados com os compostos NAC89, LCD67, LC50 e ATN. Barra a cinzento escuro, grupo tratado com 10 mg/Kg, barra a cinzento médio, grupo tratado com 50 mg/Kg e barra a cinzento claro, grupo tratado com 2 mg/Kg.

3. Avaliação da atividade antimalárica por via tópica

A atividade antimalárica *in vivo* do composto LC50 foi determinada pelo cálculo da área abaixo da curva (AUC) correspondente às parasitemias do dia 0 ao dia 20, da mesma forma que na via subcutânea.

No gráfico da figura IV-11, as barras representam as médias da AUC de 10 animais no grupo tratado e 6 animais no grupo não tratado; o valor de *p* corresponde ao valor do teste de Mann-Whitney efetuado para testar a igualdade das medianas das AUCs.

Os ratinhos infectados com a estirpe AS-ART e tratados com o composto LC50 em forma de pomada apresentaram redução significativa de parasitemia ($p = 0,0095$) em relação ao grupo não tratado (figura IV-11) Demonstrando a excelente atividade antimalárica do LC50 por via tópica.

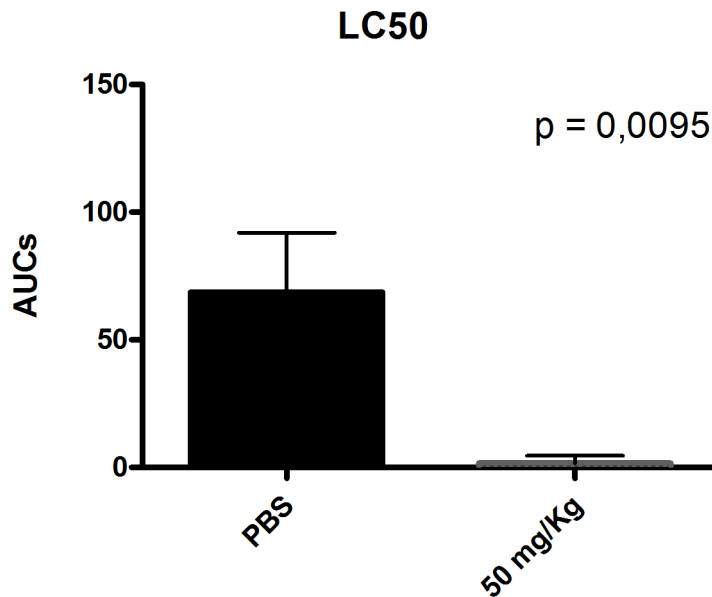


Figura IV-11: AUCs dos grupos infectados com estirpe AS-ART de *P. chabaudi* e tratados com LC50 por via tópica. Barra a preto, grupo tratado com PBS e barra a cinzento escuro, grupo tratado com pomada na dose de 50 mg/Kg.

As duas vias de administração (subcutânea e tópica) do composto LC50, apresentaram ótima atividade antimalárica na dose de 50 mg/Kg. Quando as duas vias de administração foram comparadas, as diferenças entre as duas vias

não foram significativas ($p = 0,1775$), demonstrando boa atividade antimalárica nas duas vias (figura IV-12).

No gráfico da figura IV-12, as barras representam as médias da AUC de 5 animais no grupo tratado por via subcutânea e 6 animais no grupo tratado por via tópica; o valor de p corresponde ao valor do teste de Mann-Whitney efetuado para testar a igualdade das medianas das AUCs

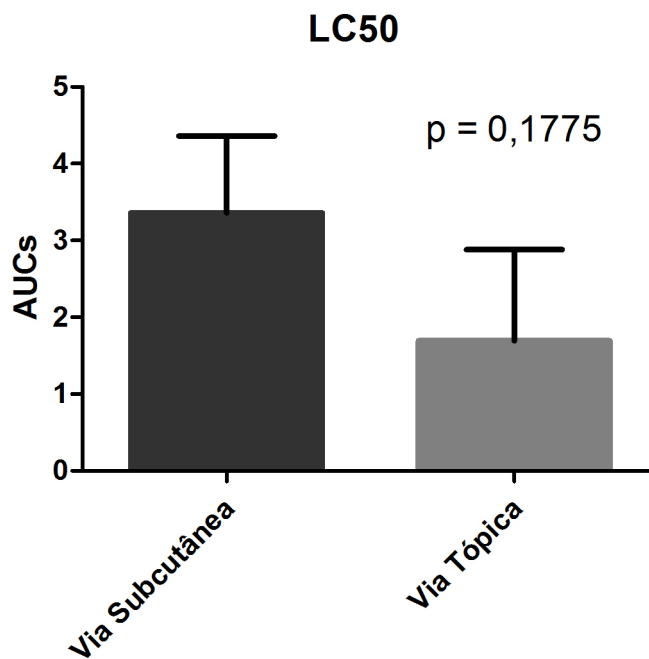


Figura IV-12: AUCs dos grupos infetados com estirpe AS-ART de *P. chabaudi* e tratados com LC50 na dose de 50 mg/Kg nas vias subcutânea e tópica.

V - DISCUSSÃO

A resistência sobretudo de *P. falciparum* à maioria dos antimaláricos, é o grande causador da mortalidade por esta infecção, e afeta fortemente os programas de controlo, de nível regional ou nacional, e os tratamentos individuais. Enquanto uma vacina eficaz contra a malária não estiver desenvolvida e disponível, a quimioterapia continua a ser a alternativa mais viável para o controlo da infecção e doença (Tetteh & Polley, 2007).

O surgimento da resistência aos antimaláricos está bem revisto nas publicações de Fidock e colaboradores, (2008), Greenwood e Mutabingwa (2002), Plowe (2003) e Trape (2001) e, na investigação, torna-se relevante para se entender não só os mecanismos de resistência dos parasitas ao fármaco utilizado, bem como, no sentido epidemiológico, entender a dispersão da resistência fora do seu foco inicial.

Os trioxolanos (1,2,4- trioxolanos), são peróxidos como a ART, e fazem parte de uma classe química de compostos orgânicos chamada de ozonídeos (Opsenica & Solaja, 2009) e possuem como farmacóforo (à semelhança da ART) uma ponte endoperóxido (Dong *et al.*, 2005; O'Neil *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2007; Vennerstrom *et al.*, 2004). Os trioxolanos têm demonstrado boa atividade antimalárica *in vivo* e *in vitro*, por vezes superior ao ATN e ao ATM (Opsenica & Solaja, 2009). Existe um trioxolano, OZ439 que concluiu com êxito a fase I de ensaios clínicos, onde foi demonstrado ser seguro e atualmente está em fase de ensaios II em pacientes com malária (Charman, *et al.*, 2011).

A acessibilidade, a preparação relativamente barata destes compostos e a estabilidade da função 1,2,4-trioxano e 1,2,4,5-tetraoxano permite a síntese de derivados com diversas estruturas, alargando a possibilidade de desenvolver fármacos potencialmente mais eficazes. Ainda, a tolerância da porção 1,2,4-trioxolano para diversas condições sintéticas permite a síntese de um número significativo de derivados (Tang *et al.*, 2004).

O trioxolano NAC89, já descrito por Tang e colaboradores (2005) como OZ209, foi sintetizado e demonstrou atividade *in vitro* contra as estirpes de *P.falciparum* resistente (K1) e sensível (NF54) à CQ. Também foi demonstrada a sua atividade *in vivo*, em ratinhos infectados por *P. berghei* e tratados por via

oral, em dose única, na qual foi observada redução de 99,9% na parasitemia no terceiro dia após a infecção (Tang *et al.*, 2010).

Os resultados de trabalhos anteriores motivaram a investigação da atividade antimalárica dos trioxolanos NAC89, LCD67 e LC50 *in vitro* em *P. falciparum* (Dd2 - resistente à CQ, MEF e quinino-QN) e *in vivo* em estirpes de *P. chabaudi* resistentes à pirimetamina, CQ e aos endoperóxidos em uso clínico atualmente, ART e ATN.

A atividade antimalárica *in vitro* dos compostos NAC89 e LC50 sobre a estirpe multiresistente Dd2 apresentou-se idêntica à da ART ou da DHA, como refletem os respectivos valores de IC₅₀ (tabela IV-1). Já o composto LCD67 um apresentou-se um pouco menos ativo. Os valores de IC₅₀ calculados neste trabalho são concordantes com um estudo anterior em que foram avaliados diversos trioxolanos (Vennerstrom *et al.*, 2004) em que os mesmos compostos apresentaram valores de IC₅₀ entre 0,39 e 1,97 ng/ml contra estirpes de *P. falciparum* K1 (resistente à CQ) e NF54 (sensível a CQ). Os compostos demonstram atividade apreciável contra estirpes resistentes a quinolinas, o que é indicativo de inexistência de resistência cruzada com as quinolinas CQ, MEF e QN. Este fato é também indicativo de que deverão ter mecanismo de ação diferente. Dado que a resistência às quinolinas está disseminada pelas regiões endêmicas (Fidock *et al.*, 2004), é fundamental para os programas de controle da malária o desenvolvimento de novos antimaláricos capazes de eliminar os parasitas resistentes.

A análise do índice de seletividade dos três compostos demonstrou que os compostos são seguros, uma vez que a relação entre dose tóxica e dose efetiva, avaliada pelo IS (> 10), apresenta uma ampla janela terapêutica. Os compostos NAC89 e LC50 apresentaram os maiores IS.

A estirpe AS de *P. chabaudi* tem sido historicamente utilizada em estudos da evolução da resistência a fármacos, resultando em uma série de parasitas isogênicos, os quais são resistentes a vários fármacos diferentes.

Neste trabalho foram utilizadas as estirpes AS-3CQ, AS-ATN, AS-30CQ e AS-ART de *P. chabaudi* (Hunt *et al.*, 2010) para a avaliação da atividade antimalárica *in vivo* dos trioxalanos NAC89, LCD67 e LC50 (figura V-1).

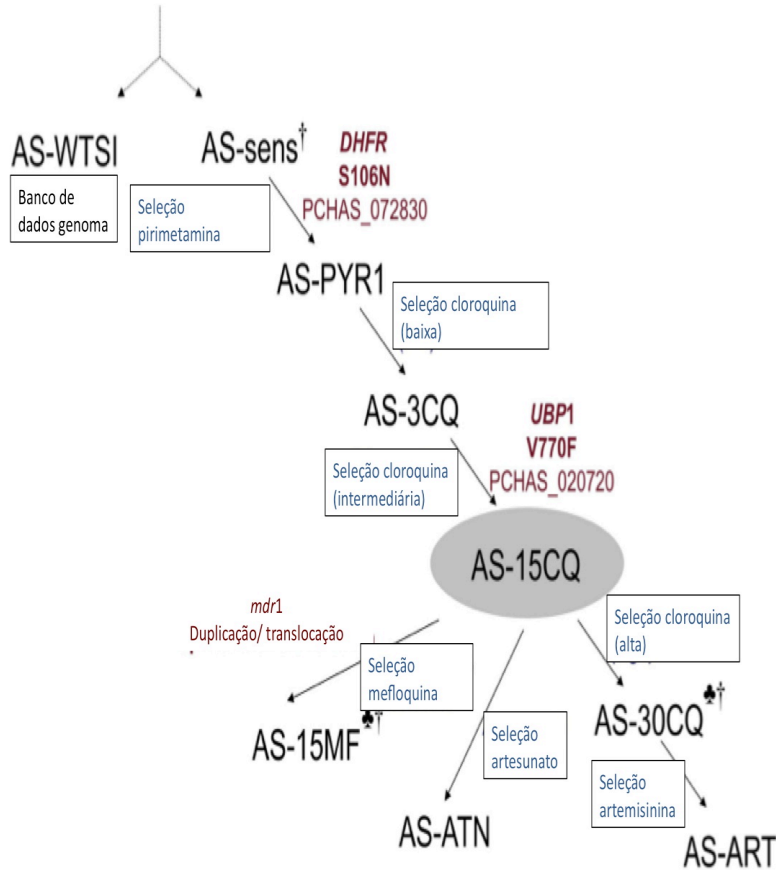


Figura V-1: Seleção de resistência em *P. chabaudi* a partir da linhagem AS sensível. (Adaptada de Hunt *et al.*, 2010).

As estirpes AS de *P. chabaudi* não são letais, os ratinhos resolvem a infecção em aproximadamente 16 dias, por isso acreditamos que os parâmetros usuais para expressar a eficácia de um composto como: tempo de supressão da parasitemia ou aumento no tempo de vida dos animais, não são as melhores variáveis para estimar a eficácia do fármaco. Assim propomos a utilização da AUC para expressar a evolução da parasitemia após o tratamento, uma vez que incorpora tanto a magnitude como a duração da parasitemia patente. Além disso, diminui a variação de resposta entre cada ratinho nas mesmas condições de tratamento inerentes a fatores intrínsecos ao hospedeiro.

O perfil de resposta à ART e ATN das estirpes de *P. chabaudi*: AS-3CQ, AS-ATN, AS-30CQ e AS-ART após administração oral dos compostos está descrito (Hunt *et al*, 2010). No presente trabalho foi determinado o perfil de resposta dos mesmos clones e fármacos administrados por via subcutânea. Os perfis de resposta apresentaram-se semelhantes na ausência de tratamento para todos os clones (figura IV-3), sendo que a média dos picos de parasitemia se situou entre 20 e 32%. Quando tratados com 50/mg/Kg/dia as parasitemias apresentaram-se cerca de 4 a 8 vezes mais baixas do que os grupos não tratados. O grupo que apresentou maior variação das parasitemias foi aquele tratado com 10 mg/Kg/dia, entre 3 e 24%.

O composto LC50 apresentou uma atividade de supressão de parasitemia de cerca de 90 a 100%, em ambas as doses 10 e 50 mg/Kg nas 4 estirpes de *P. chabaudi* independentemente do seu perfil de resistência à ART, ATN e CQ (Figura IV-9, figura IV-10 e anexo II, com os valores de p dos testes estatísticos). O composto LCD67 apresentou um efeito dose dependente (figura IV-9, figura IV-10 e anexo II, com os valores de p dos testes estatísticos), tendo sido esta mais visível na estirpe AS-ART na qual apresenta atividade antimalárica na dose mais baixa (figura IV-9).

Quando administrado na estirpe AS-ATN na dose máxima (50mg/Kg), NAC89 induziu uma reação adversa no local de administração, com reação inflamatória, ligeira solução de continuidade e perda de pêlo localizada. Assim, apesar de ter demonstrado atividade de cerca de 100% na supressão de parasitemia, a dosagem foi reduzida e este composto passou a ser administrado às outras 3 estirpes nas doses de 2 e 10 mg/Kg. Assim mesmo foi significativamente ativo na dose de 10 mg/Kg nas 4 estirpes testadas (figura IV-9, figura IV-10 e anexo II, com os valores de p dos testes estatísticos).

As eficácias dos compostos NAC89, LCD67 e LC50 quando comparadas com a eficácia dos compostos utilizados como referência ART e ATN, demonstraram diferenças significativas.

No que respeita ao LC50 este demonstrou ser mais eficaz do que ART e ATN em ambas as doses nas 4 estirpes, com exceção da dose 10 mg/Kg na

estirpe resistente à cloroquina (AS-30CQ) em que apresentou menor eficácia do que a ART.

Quando comparado com o efeito da ART e ATN o composto NAC89, demonstrou maior eficácia na dose de 10 mg/Kg e apenas nas estirpes AS-30CQ e AS-ART. Na dose de 50 mg/Kg demonstrou ser superior na eficácia do tratamento da infecção por AS-ATN, no entanto foi também nesta dose em que apresentou reação adversa.

O composto LCD67, embora eficaz no tratamento de malária pelas 4 estirpes de *P. chabaudi*, foi inferior à ART e ao ATN.

O LC50 já tinha demonstrado atividade *in vivo* contra *P. berguei* ANKA (estirpe susceptível à CQ, administrado por via subcutânea na dose de 10 mg/Kg de peso, apresentaram sobrevivência maior que 30 dias e por via oral na dose de 100 mg/Kg de peso, apresentaram sobrevivência maior que 10 dias (Vennerstrom *et al.*, 2004).

O composto LC50 por apresentar melhor perfil de atividade como antimalárico nos testes *in vitro*, e *in vivo* por via subcutânea, motivou a investigação deste composto como um antimalárico tópico. A via de administração tópica mostrou-se igualmente eficaz (figura 12) na redução da parasitemia de uma estirpe resistente a múltiplos fármacos. Embora a pele de ratinho (*Mus musculus*) e a pele humana apresentem diferenças significativas na arquitetura celular e fisiologia (Li, *et al.*, 2011), o que pode complicar a extrapolação direta dos estudos em ratinhos para humanos. O estudo demonstrou a excelente potencialidade deste trioxolano como um antimalárico tópico. O que sugere a potencialidade da via tópica para a administração de trioxolanos.

A exploração da via tópica de aplicação do LC50 teve como objetivo propor uma formulação e uma via de administração que evite algumas das limitações conhecidas dos derivados da ART disponíveis e desta forma: (i) simplificar a aplicação de um fármaco anti-malária, (ii) compensar a baixa adesão à terapêutica oral por parte das crianças, (iii) evitar a absorção deficiente devido a vômitos e síndromes diarreicas, (iv) apresentar, em alternativa aos supositórios de ATN, uma formulação que possa ser mantido à temperatura

ambiente, nas áreas rurais, onde as instalações médicas são inexistentes ou mal equipadas, possibilite o tratamento precoce da doença malária e, por conseguinte, salvar vidas.

VI - CONCLUSÕES

Os trioxolanos NAC89, LCD67 e LC50 demonstraram atividade antimalárica contra uma estirpe de *P. falciparum* resistente a múltiplos fármacos, idêntica à demonstrada pela artemisinina e dihidroartemisinina (fármacos atualmente recomendados para o tratamento da malária não complicada por *P. falciparum*).

O índice de seletividade calculado (*in vitro*) para os três compostos em estudo, indica baixa toxicidade dos três compostos NAC89 LCD67 e LC50, no entanto a reação adversa local no estudo *in vivo* registrada para o NAC89 assinala a necessidade de detalhar estudos de toxicidade antes de prosseguir com o desenvolvimento desta molécula como antimalárico.

Os resultados de eficácia *in vivo* permitem concluir que os trioxolanos em estudo possuem atividade antimalárica. Dado que as estirpes de malária murina são resistentes à ART, ATN, CQ e pirimetamina, estes resultados reforçam o elevado potencial destes compostos como novos antimaláricos.

No seu conjunto os resultados permitem indicar o composto LC50 como o que terá maior potencial antimalárico. Apresenta eficácia no tratamento de malária resistente a múltiplos fármacos *in vitro* e *in vivo*, possui maior eficácia do que os fármacos atualmente recomendados para o tratamento da malária não complicada por *P. falciparum* e mantém a eficácia quando administrado por pelo menos duas vias: subcutânea e tópica.

Trabalhos futuros poderão ser realizados para melhor elucidação dos mecanismos de ação e biodisponibilidade dos compostos, como também estudos *in vivo* em primatas.

|

VII – REFERÊNCIAS

Afonso, A., Hunt, P., Cheesman, S., Alves, A.C., Cunha, C.V., do Rosário, V. e Cravo, P. (2006) Malária parasites can develop stable resistance to artemisinin but lack mutations in candidate genes *atp6* (encoding the sarcoplasmic and endoplasmatic reticulum Ca²⁺ ATPase), *tctp*, *mdr1*, and *cg10*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 480-489.

Achtman, A.H., Stephens, R., Cadman, E.T., Harrison, V. e Langhorne, J. (2007) Malaria-specific antibody responses and parasite persistence after infectio of mice with *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Parasite Immunol.* 29: 435-444.

Anderson, T.J., Nair, S., Nkhoma, S., Williams, J.T., Imwong, M., Yi, P., Socheat, D., Das, D., Chotivanich, K., Day, N.P., White, N.J. e Dondorp, A.M. (2010) High heritability of malária parasite clearance rate indicates a genetic basis for artemisinin resistance in western Cambodia. *J. Infect. Dis.* 201: 1326-1330.

Bagnaresi, O., Alves, E., da Silva, H.B., Epiphanio, S., Mota, M.M. e Garcia, C.R. (2009) Unlike the synchronous *Plasmodiu falciparum* and *P. chabaudi* infection, the *P. berghei* and *P. yoelii* asynchronous infections are not affected by melatonin. *Int. J. Gen. Med.* 2: 47-55.

Balint, G.A. (2001) Artemisinin and derivatives: an important new class of antimalarial agents. *Pharmacol. Ther.* 90: 261-265.

Bézivin, C., Tomasi, S, lohézic-Le Dévéhat, F. e Boustie, J. (2003) Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine.* 10: 499-503.

Brossi, A., Venugopalan, B., Dominguez Gerpe, L., Yeh, H.J., Flippen-Anderson, J.L., Buchs, P., Luo, X.D., Milhous, W. e Peters, W. (1988) Arteether, a new antimalarial drugs: synthesis and antimalarial properties. *J. Med. Chem.* 31: 645-50.

Carrara, V.I., Zwang, J., Ashley, E.A., Price, R.N., Stepniewska, K., Barends, M., Brockman, A., Anderson, T., McGrady, R., Phaipun, L., Proux, S., van,

V.M., Hutagalung, R., Lwin, K.M., Phyo, A.P., Preechapornkul, P., Imwong, M., Pukrittayakamee, S., Singhasivanon, P., White, N.J. e Nosten, F. (2009) Changes in the treatment responses to artesunate-mefloquine on the northwestern border of Thailand during 13 years of continuous deployment. *PLoS one*. 4: e4551.

Carter, R. (1978) Studies on enzyme variation in the murine malaria parasites *Plasmodium berghei*, *P. yoelii*, *P. vinckey* and *P. chabaudi* by starch gel electrophoresis. *Parasitology*. 76: 241-247.

Charman, S.A., Arbe-Barnes, S., Bathurst, J.C., Brun, R., Campbell, M., Charman, W.N., Chiu, F.C.K., Chollet, J., Craft, C., Creek, D.J., Dong, Y., Matile, H., Maurer, M., Morizzi, J., Nguyen, T., Papastogiannidis, P., Scheurer, C., Schackelford, D.M., Sriraghavan, K., Stingelin, L., Tang, Y., Urwyler, H., Wang, X., White, K.L., Wittlin, S., Zhou, L. e Vennerstrom, J.L. (2011) Synthetic ozonide drug candidate OZ439 offers new hope for a single-dose cure of uncomplicated malaria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108: 4400-4405.

Cirimotich, C.M., Dong, Y., Garver, L.S., Sim, S. e Dimopoulos, G. (2010) Mosquito immune defenses against *Plasmodium* infection. *Dev. Comp. Immunol*. 34: 387-395.

Chiodini, P., Moody, A. e Manser, D. (2010) Malaria parasites. In: *Atlas of Medical Helminthology and Protozoology*. 4th Edition, Churchill Livingstone, London, 61-70.

Cowman, A.F. e Karcz, S. (1993) Drug resistance and the P-glycoprotein homologues of *Plasmodium falciparum*. *Semin. Cell Biol.* 4: 29-35.

Cui, L. e Su, X.Z. (2009) Discovery mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. *Expert Rev. Anti Infect.* 7: 999-1013.

Denis, M.B., Tsuyuoka, R., Lim, P., Lindegardh, N., Yi, P., Top, S.N., Socheat, D., Fandeur, T., Annerberg, A., Christophel, E.M. e Ringwald, P. (2006) Efficacy of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated

falciparum malaria in northwest Cambodia. *Trop. Med. Int. Health.* 11: 1800-1807.

Ding, X.C., Beck, H.P. e Raso, G. (2011) Plasmodium sensitivity to artemisinins: magic bullets hit elusive targets. *Trends Parasitol.* 27: 73-81.

Dondorp, A.M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyo, A.P., Tarning, J., Lwin, K.M., Arie, F., Hanpithakpong, W., Lee, S.J., Ringwald, P., Silamut, K., Imwong, M., Chotivanich, K., Lim, P., Herdman, T., An, S.S., Yeung, S., Singhasivanon, P., Day, N.P., Lindegardh, N., Socheat, D. e White, N.J. (2009) Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. *N. Engl. J. Med.* 361: 455-467.

Dondorp, A.M., Yeung, S., White, L., Nguon, C., Day, N.P., Socheat, D. e von Seidlein, L. (2010) Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 272-280.

Dong, Y., Chollet, J., Matile, H., Charman, S.A., Chiu, F.C., Charman, W.N., Scoreaux, B., Urwyler, H., Santo Tomas, J., Scheurer, C., Snyder, C., Dorn, A., Wang, X., Karle, J.M., Tang, Y., Wittlin, S., Brun, R. e Vennerstrom, J.L. (2005) Spiro and dispiro-1,2,4-trioxolanes as antimalarial peroxides: charting a workable structure-activity relationship using simple prototypes. *J. Med. Chem.* 48: 4953-4961.

Dong, Y., Wittlin, S., Sriraghavan, K., Chollet, J., Charman, S.A., Charman, W.N., Scheurer, C., Urwyler, H., Tomas, J.S., Snyder, C., Creek, D.J., Morizzi, J., Koltun, M., Matile, H., Wang, X., Padmanilayam, M., Tang, Y., Dorn, A., Brun, R. e Vennerstrom, J.L. (2010) The Structure-Activity Relationship of the Antimalarial Ozonide Arterolane (OZ277). *J. Med. Chem.* 53: 481-491.

Duraisingh, M.T., Jones, P., Sambou, I., von Seidlein, L., Pinder, M. e Warhurst, D.C. (2000) The tyrosine-86 allele of the pfmdr1 gene of Plasmodium falciparum is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 108: 13-23.

Eastman, R.T. e Fidock, D.A. (2009) Artemisinin-based combination therapies: a vital toll in efforts to eliminate malaria. *Nat. Rev. Microbiol.* 7:864-874.

- Eckstein-Ludwig, U., Webb, R.J., Van Goethem, I.D., East, J.M., Lee, A.G., Kimura, M., O'Neil, P.M., Bray, P.G., Ward, S.A. e Krishna, S. (2003) Artemisinin target the SERCA of Plasmodium falciparum. *Nature*. 424: 957-961.
- Erserink, M. (2010) Malaria's drug miracle in danger. *Science*. 328: 844-846.
- Farrow, R.E., Green, J., Katsimitsoulia, Z., Taylor, W.R., Holder, A.A. e Molloy, J.E. (2011) The mechanism of erythrocyte invasion by the malária parasite, Plasmodium falciparum. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22: 953-960.
- Fidock, D.A., Rosenthal, P.J., Croft, S.L., Brun, R. e Nwaka, S. (2004) Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3: 509-520.
- Fidock, D.A., Eastman, R.T., Ward, S.A. e Meshnick, S.R. (2008) Recent highlights in antimalarial drug resistance and chemotherapy research. *Trends Parasitol.* 24: 537-544.
- Gadsby, N., Lawrence, R. e Carter, R. (2009) A study on pathogenicity and mosquito transmission success in the rodent malaria parasite Plasmodium chabaudi adami. *Int. J. Parasitol.* 39: 347-354.
- Goldberg, D.E. (2005) Hemoglobin degradation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 295: 275-291.
- Greenwood, B. e Mutabingwa, T. (2002) Malaria in 2002. *Nature*. 415: 670-672.
- Hartwig, C.L., Rosenthal, A.S., D'Angelo, J., Griffin, C.E., Posner, G.H. e Cooper, R.A. (2009) Accumulation of artemisinin trioxane derivatives within neutral lipids of Plasmodium falciparum malaria parasites is endoperoxide-dependent. *Biochem. Pharmacol.* 77: 322-336.
- Hoppe, H.C., van Schalkwyk, D.A., Wiehart, U.I., Meredith, S.A., Egan, J. e Weber, B.W. (2004) Antimalarial quinolines and artemisinin inhibit endocytosis in Plasmodium falciparum. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 2370-2378.

- Hou, J., Wang, D., Zhang, R. e Wang, H. (2008) Experimental therapy of hepatoma with artemisinina and its derivatives: in vitro and in vivo activity. *Clin Cancer Res.* 14: 5519-5530.
- Hunt, P., Afonso, A., Creasey, A., Culleton, R., Sidhu, A.B., Logan, J., Valderramos, S.G., McNae, I., Cheesman, S., do Rosário, V., Cáster, R., Fidock, D.A. e Cravo, P. (2007) Gene encoding a deubiquitinating enzyme is mutated in artesunate- and chloroquine- resistant rodent malaria parasites. *Mol. Microbiol.* 65: 27-40.
- Hunt, P., Martinelli, A., Mordzynska, K., Borges, S., Creasey, A., Rodrigues, L., Beraldi, D., Loewe, L., Fawcett, R, Kumar, S., Thomson, M., Trivedi, U., Otto, T.D., Pain, A., Blaxter, M. e Cravo, P. (2010) Experimental evolution, genetic analysis and genome re-sequencing reveal the mutation conferring artemisinin resistance in an isogenic lineage of malaria parasites. *BMC Genomics.* 11: 499.
- Idro, R., Jenkins, N.E. e Newton, C.R. (2005) Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *Lancet. Neurol.* 4: 827-840.
- Imwong, M., Dondorp, A.M., Nosten, F., Yi, P., Mungthin, M., Hanchana, S., Das, D., Phyto, A.P., Lwin, K.M., Pukrittayakamee, S., Lee, S.J., Saisung, S., Koecharoen, K., Nguon, C., Day, N.P., Socheat, D. e White, N.J. (2010) Exploring the contribution of candidate genes to artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 2886-2892.
- Jambou, R., Legrand, E., Niang, M., Khim, N., Lim, P., Volney, B., Ekala, M.T., Bouchier, C., Esterre, P., Fandeur, T. e Mercereau-Puijalon, O. (2005) Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet.* 366: 1960-1963.
- Lambros, C. e Vanderberg, J.P. (1979) Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J. Parasitol.* 65: 418- 420.
- Li, W., Mo, W., Shen, D., Sun., L., Wang, J., Lu, S., Gitschier, J.M. e Zhou, B. (2005) Yeast model uncovers dual roles of mitochondria in action of artemisinin. *PloS Genet.* 1: 36.

- Li, L., Fukunaga-Kalabis M. e Herlyn, M. (2011) The three-dimensional human skin reconstruct model: a tool to study normal skin and melanoma progression. *J Vis Exp.* 54/2937: 1-5.
- Luxemburger, C., Nosten, F. Raimond, S.D., Chongsuphajaisiddhi, T. e White, N.J. (1995) Oral artesunate in the treatment of uncomplicated hyperparasitemic falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 53: 522-525.
- Mackinnon, M.J., Walker, P.R. e Rowe, J.A. (2002) Plasmodium chabaudi: rosetting in a rodent malaria model. *Exp. Parasitol.* 101: 121-128.
- Maneeboonyang, W., Lawpoolsri, S., Puangsa-Art, S., Yimsamran, S., Thanyavanich, N., Wuthisen, P., Prommongkol, S., Chaimongkul, W., Rukmanee, P., Rukmanee, N., Chavez, I.F., Buchachart, K., Krudsood, S. e Singhasivanon, P. (2011) Directly observed therapy with primaquine to reduce the recurrence rate of plasmodium vivax infection along the Thai-Myanmar border. *Southeast Asian J Trop. Med. Public Health.* 42: 9-18.
- Matthews, J. N., Altman, D. G., Campbell, M. J, Royston, P. (1990) Analysis of serial measurements in medical research. *BMJ.* 300: 230-235.
- Menard, D., Matsika-Claquin, M.D., Djalle, D., Yapou, F., Manirakiza, A., Dolmazon, V., Sarda, J. e Talarmin, A. (2005) Association of failures of seven-day courses of artesunate in a non-immune population in Bangui, Central African, Republic with decreased sensitivity of Plasmodium falciparum. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73: 616:621.
- Meshnick, S.R. e Taylor, T.E., Kamchonwongpaisan, S. (1996) Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. *Microbiol. Rev.* 60: 301-315.
- Meshnick, S.R. (2002) Artemisinins: Mechanisms of action, resistance and toxicity. *Int J Parasitol.* 32: 1655-1660.
- Neves, D., Melo, A., Linardi, P. e Vitor, R. (2005) – *Parasitologia Humana.* 11^a Edição, Atheneu, São Paulo, 143-161.

Newton, P.N., Fernández, F.M., Plançon, A., Mildenhall, D.C., Green, M-D., Ziyong, L., Christophel, E.M., Phanouvong, S., Howells, S., McIntosh, E., Laurin, P., Blum, N., Hampton, C.Y., Faure, K., Nyadong, L., Soong, C.W., Santoso, B., Zhiguang, W., Newton, J. e Palmer, K. (2008) A collaborative epidemiological investigation into the criminal fake artesunate trade in South East Asia. *PloS Med.* 5: e32.

Noedl, H., Se, Y., Schaecher, K., Smith, B.L., Socheat, D. e Fukuda, M.M.; Artemisinin Resistance in Cambodia 1 (ARC1) Study Consortium. (2008) Evidence of artemisinin-resistant malaria in westwrn Cambodia. *N. Engl. J. Med.* 359: 2619-2620.

Noedl, H., Socheat, D. e Satimai, W. (2009) Artemisinin-resistant malaria in Asia. *N. Engl. J. Med.* 361: 540-541.

Nosten, F., ter Kuile, F., Chongsuphajaisiddhi, T., Luxemburger, C., Webster, H.K., Edstein, M., Phaipun, L., Thew, K.I. e White, N.J. (1991) Mefloquine-resistant falciparum malaria on the Thai-Brumese border. *Lancet* 337: 1140-1143.

O'Brien, C., Henrich, P. P., Passia, N. e Fidock, D.A. (2011) Recent clinical and molecular insights into emerging artemisinin resistance in Plasmodium falciparum. *Curr. Opin. Infect Dis.* 24:570-577.

Oduola, A. M., Milhous, W. K., Weatherly, N. F., Bowdre, J.H., Desjardins, R.E. (1988) Plasmodium falciparum: induction of resistance to mefloquine in cloned strains by continuous drug exposure in vitro. *Exp. Parasitol.* 67: 354-360.

O'Neill, P. M., Barton, V.E. e Ward, S.A. (2010) The molecular mechanism of action of artemisinin- the debate continues. *Molecules.* 12: 1705-1721.

Olliaro, P.L. e Taylor, W.R. (2004) Developing artemisinin based drug combinations for the treatment of drug resistant falciparum malaria: A review. *J. Postgrad. Med.* 50: 40-44.

- Opsenica, D.M. e Solaja, B.A. (2009) Antimalarial peroxides. *J. Serb. Chem. Soc.* 74: 1155-1193.
- Orjuela-Sánchez, P., da Silva, N.S., da Silva-Nunes, M. e Ferreira, M. U. (2009) Recurrent parasitemias and population Dynamics of plasmodium vivax polymorphisms in rural Amazonia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81: 961-968.
- Peters, W., Ze-Lin, L., Robinson, B.L. e Warhurst, D.C. (1986) The chemotherapy of rodent malaria. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 80: 483-489.
- Pinotti, M. e Soares, R. (1956) A erradicação da malária com sal cloroquinado. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, Rio de Janeiro. 1: 2-20
- Plowe, C.V. (2003) Monitoring antimalarial drug resistance: making the most of tools at hand. *J Exp Biol.* 206: 3745-3752.
- Price, R. N., Tijitra, E., Guerra, C. A., Yeung, S., White, N.J. e Anstey, N.M. (2007) Vivax malaria: neglected and not benign. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77: 79-87.
- Price, R.N., Uhlemann, A.C., Brockman, A., McGready, R., Ashley, E., Phaipun, L., Patel, R., Laing, K., Looareesuwan, S., White, N.J., Nosten, F. e Krhishna, S. (2004) Mefloquine resistance in Plasmodium falciparum and increased pfmdr1 gene copy number. *Lancet.* 364: 438-447.
- Rosario, V. (1981) Cloning of naturally occurring mixed infections of malaria parasites. *Science.* 212: 1037-1038.
- Rathod, P.K., McErlean, T. e Lee, P.C. (1997) Variations in frequencies of drug resistance in Plasmodium falciparum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 9389-9393.
- Sachs, J. e Malaney, P. (2002) The economic and social burden of malária. *Nature.* 415: 680-685.
- Sidhu, A.B., Uhlemann, A.C., Valderramos, S.G., Valderramos, J.C., Krishna, S. e Fidock, D.A. (2006) Decreasing pfmdr1 copy number in Plasmodium

falciparum malária heightens susceptibility to mefloquine, lemfantrine, halofantrine, quinine and artemisinin. *J. Infect. Dis.* 194: 528-535.

Silvie, O., Mota, M.M., Matuschewski, K. e Prudêncio, M. (2008) Interactions of the malaria parasite and its mammalian host. *Curr. Opin. Microbiol.* 11: 352-359.

Sisowath, C., Stromberg, J., Martensson, A., Msellem, M., Obondo, C., Bjorkman, A. e Gil, J.P. (2005) In vivo selection of Plasmodium falciparum pfm^{dr1} 86n coding alleles by artemether-lumefantrine (Coartem). *J. Infect. Dis.* 191: 1014-1017.

Stephens, R., Culleton, R.L. e Lamb, T.J. (2012) The contribution of Plasmodium chabaudi to our understanding of malaria. *Trends. Parasitol.* 28: 73-82.

Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J.M., Menard, R. e Heussler, V.T. (2006) Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science.* 313: 1287-1290.

Tang, Y., Dong, Y., Karle, J.M., DiTusa, C.A. e Vennerstrom, J.L. (2004) Synthesis of tetrasubstituted ozonides by the Griesbaum coozololysis reaction: diastereoselectivity and functional group transformations by post-ozonolysis reactions. *J. Org. Chem.* 69: 6470-6473.

Tang, Y., Dong, Y., Wittlin, S., Charman, S.A., Chollet, J., Chiu, F.C., Charman, W.N., Matile, H., Urwyler, H., Dorn, A., Bajpai, S., Wang, X., Padmanilayam, M., Karle, K.M., Brun., R. e Vennerstrom, J.L. (2007) Weak base dispiro-1,2,4-trioxalanes: potent antimalarial ozonides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17: 1260-1255.

Tang, Y., Wittlin, S., Charman, S.A., Chollet, J., Chiu, F.C., Morizzi, Johnson, L.M., Tomas, J.S., Scheurer, C., Snyder, C., Zhou, L., Dong, Y., Charman, W.N., Matile, H., Urwyler, H., Dorn, A. e Vennerstrom, J. L. (2010) The

comparative antimalarial properties of weak base and neutral synthetic ozonides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20: 563-566.

Tang, Y.Q., Dong, Y. X., Wang, X. F., Sriraghavan, K. e Wood., J.K. (2005) Dispiro-1,2,4-trioxane analogues of a prototype dispiro-1,2,4-trioxolane: mechanistic comparators for artemisinin in the context of reaction pathways with iron (II). *J. Org. Chem.* 70: 5103-5110.

Tetteh, K.K. e Polley, S.D. (2007) Progress and challenges towards the development of malaria vaccines. *BioDrugs.* 21: 357-373.

Thaithong, S., Seugorn, A. e Beale, G.H. (1994) Culturing Plasmodium falciparum from finger-prick samples of infected blood. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88: 490.

Trager, W. e Jensen, J.B. (1976) Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* 193: 673-675.

Trape, J.F. (2001) The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 64: 12-17.

Uhlemann, A.C., Cameron, A., Eckstein-Ludwig, U., Fischbarg, J., Ierovich, P., Zuniga, F.A., East, M., Lee, A., Brady, L., Haynes, R.K. e Krishna, S. (2005) A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12: 628-629.

Vijaykadga, S., Rojanawatsirivej, C., Cholpol, S., Phoungmanee, D. e Nakavej, A. (2006) In vivo sensitivity monitoring of mefloquine monotherapy and artesunate-mefloquine combinations for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Thailand in 2003. *Trop. Med. Int. Health.* 11: 211-219.

Vennerstrom, J.L., Arbe-Barnes, S., Brun, R., Charman, S.A., Chiu, F.C.K., Chollet, J., Dong, Y., Hunziker, D., Matile, H., McIntosh, K., Padmanilayam, M., Tomas, J.S., Scheurer, C., Scorneaux, B., Tang, Y., Urwyler, H., Wittlin, S. e Charman, W.N. (2004) Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate. *Nature.* 430:900-904.

- Walker, D.J., Pitsch, J.L., Peng, M.M., Robinson, B.L., Peters, W., Bhisutthibhan, J. e Meshnick, S.R. (2000) Mechanisms of artemisinins resistance in the rodent malaria pathogen *Plasmodium yoelii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 344-347.
- Walliker, D., Carter, R. e Sanderson, A. (1975) Genetic studies on *Plasmodium chabaudi*: recombination between enzyme markers. *Parasitology.* 70: 19-24.
- Wellems, T.E. e Plowe, C.V. (2001) Chloroquine-resistant malaria. *J. Infect. Dis.* 184: 770-776.
- White, N. (1999) Antimalarial drug resistance and combination chemotherapy. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 354: 739-749.
- White, N.J. e Pongtavornpinyo, W. (2003) The de novo deletion of drug-resistant malaria parasites. *Proc. Biol. Sci.* 270: 545-554.
- Wongsrichanalai, C. e Meshnick, S.R. (2008) Declining artesunate-mefloquine efficacy against falciparum malaria on the Cambodia-Thailand border. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 716-719.
- Wongsrichanalai, C., Sirichaisinthop, L., Karwacki, J.J., Congpuond, K., Miller, R.S., Pang, L. e Thimasarn, K. (2001) Drug resistant malaria on the Thai-Myanmar and Thai-Cambodian borders. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 32: 41-49.
- World Health Organization (1986) Chemotherapy of malaria. Revised second edition, N° 27. Geneva: WHO.
- World Health Organization (2010) Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. Geneva: WHO.
- World Health Organization (2011) World malaria report. Geneva: WHO.
- World Health Organization/ Basco, L.K. (2007) Field application of in vitro assays for the sensitivity of human malaria parasites to antimalarial drugs. Geneva: WHO.

ANEXO I

Meios de cultura para manutenção de parasitas e preparação dos eritrócitos não parasitados

Meio de cultura RPMI completo para *P. falciparum*

RPMI 1640	10,44 (Sigma)
HEPES	5,94g (Sigma)
Hipoxantina	0,05g (Sigma)
Bicarbonato de Sódio	2,1g
AlbuMaxII	5g (Invitrogen™)

Meio de Williams Completo

MWc	10,83g/L
Soro Bovino	10%
Penicilila/ Streptomicina	1%
Bicarbonato de Sódio	3,7g/L

ANEXO II

Teste Kruskal-Wallis para estirpe AS-3CQ

Kruskal-Wallis test

P value	0,0006
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	***
Do the medians vary signif. ($P < 0.05$)	Yes
Number of groups	9
Kruskal-Wallis statistic	27,27

Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant?
PBS vs ATN 10mg/Kg	7,400	No
PBS vs ATN 50mg/Kg	13,60	No
PBS vs NAC89 10 mg/Kg	23,20	No
PBS vs NAC89 2 mg/Kg	12,40	No
PBS vs LC50 10 mg/Kg	25,10	No
PBS vs LC50 50 mg/Kg	34,20	Yes
PBS vs LCD67 10 mg/Kg	4,700	No
PBS vs LCD67 50 mg/Kg	16,20	No
ATN 10mg/Kg vs ATN 50mg/Kg	6,200	No
ATN 10mg/Kg vs NAC89 10 mg/Kg	15,80	No
ATN 10mg/Kg vs NAC89 2 mg/Kg	5,000	No
ATN 10mg/Kg vs LC50 10 mg/Kg	17,70	No
ATN 10mg/Kg vs LC50 50 mg/Kg	26,80	Yes
ATN 10mg/Kg vs LCD67 10 mg/Kg	-2,700	No
ATN 10mg/Kg vs LCD67 50 mg/Kg	8,800	No
ATN 50mg/Kg vs NAC89 10 mg/Kg	9,600	No
ATN 50mg/Kg vs NAC89 2 mg/Kg	-1,200	No
ATN 50mg/Kg vs LC50 10 mg/Kg	11,50	No
ATN 50mg/Kg vs LC50 50 mg/Kg	20,60	No
ATN 50mg/Kg vs LCD67 10 mg/Kg	-8,900	No
ATN 50mg/Kg vs LCD67 50 mg/Kg	2,600	No
NAC89 10 mg/Kg vs NAC89 2 mg/Kg	-10,80	No
NAC89 10 mg/Kg vs LC50 10 mg/Kg	1,900	No
NAC89 10 mg/Kg vs LC50 50 mg/Kg	11,00	No
NAC89 10 mg/Kg vs LCD67 10 mg/Kg	-18,50	No
NAC89 10 mg/Kg vs LCD67 50 mg/Kg	-7,000	No
NAC89 2 mg/Kg vs LC50 10 mg/Kg	12,70	No
NAC89 2 mg/Kg vs LC50 50 mg/Kg	21,80	No
NAC89 2 mg/Kg vs LCD67 10 mg/Kg	-7,700	No
NAC89 2 mg/Kg vs LCD67 50 mg/Kg	3,800	No
LC50 10 mg/Kg vs LC50 50 mg/Kg	9,100	No
LC50 10 mg/Kg vs LCD67 10 mg/Kg	-20,40	No
LC50 10 mg/Kg vs LCD67 50 mg/Kg	-8,900	No
LC50 50 mg/Kg vs LCD67 10 mg/Kg	-29,50	Yes
LC50 50 mg/Kg vs LCD67 50 mg/Kg	-18,00	No
LCD67 10 mg/Kg vs LCD67 50 mg/Kg	11,50	No

Teste Kruskal-Wallis para estirpe AS-ATN

Number of families	1	
Number of comparisons per family	36	
Alpha	0,05	
Kruskal-Wallis	< 0.0001	
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?
AS-ATN PBS vs. AS-ATN ATN 10 mg/Kg	10,60	No
AS-ATN PBS vs. AS-ATN ATN 50mg/Kg	16,00	No
AS-ATN PBS vs. AS-ATN NAC89 10 mg/Kg	21,30	No
AS-ATN PBS vs. AS-ATN NAC89 50 mg/Kg	33,30	Yes
AS-ATN PBS vs. AS-ATN LC50 10 mg/Kg	21,70	No
AS-ATN PBS vs. AS-ATN LC50 50 mg/Kg	33,30	Yes
AS-ATN PBS vs. AS-ATN LCD67 10 mg/Kg	-1,200	No
AS-ATN PBS vs. AS-ATN LCD67 50mg/Kg	16,20	No
AS-ATN ATN 10 mg/Kg vs. AS-ATN ATN 50mg/Kg	5,400	No
AS-ATN ATN 10 mg/Kg vs. AS-ATN NAC89 10 mg/Kg	10,70	No
AS-ATN ATN 10 mg/Kg vs. AS-ATN NAC89 50 mg/Kg	22,70	No
AS-ATN ATN 10 mg/Kg vs. AS-ATN LC50 10 mg/Kg	11,10	No
AS-ATN ATN 10 mg/Kg vs. AS-ATN LC50 50 mg/Kg	22,70	No
AS-ATN ATN 10 mg/Kg vs. AS-ATN LCD67 10 mg/Kg	-11,80	No
AS-ATN ATN 10 mg/Kg vs. AS-ATN LCD67 50mg/Kg	5,600	No
AS-ATN ATN 50mg/Kg vs. AS-ATN NAC89 10 mg/Kg	5,300	No
AS-ATN ATN 50mg/Kg vs. AS-ATN NAC89 50 mg/Kg	17,30	No
AS-ATN ATN 50mg/Kg vs. AS-ATN LC50 10 mg/Kg	5,700	No
AS-ATN ATN 50mg/Kg vs. AS-ATN LC50 50 mg/Kg	17,30	No
AS-ATN ATN 50mg/Kg vs. AS-ATN LCD67 10 mg/Kg	-17,20	No
AS-ATN ATN 50mg/Kg vs. AS-ATN LCD67 50mg/Kg	0,2000	No
AS-ATN NAC89 10 mg/Kg vs. AS-ATN NAC89 50 mg/Kg	12,00	No
AS-ATN NAC89 10 mg/Kg vs. AS-ATN LC50 10 mg/Kg	0,4000	No
AS-ATN NAC89 10 mg/Kg vs. AS-ATN LC50 50 mg/Kg	12,00	No
AS-ATN NAC89 10 mg/Kg vs. AS-ATN LCD67 10 mg/Kg	-22,50	No
AS-ATN NAC89 10 mg/Kg vs. AS-ATN LCD67 50mg/Kg	-5,100	No
AS-ATN NAC89 50 mg/Kg vs. AS-ATN LC50 10 mg/Kg	-11,60	No
AS-ATN NAC89 50 mg/Kg vs. AS-ATN LC50 50 mg/Kg	0,0	No
AS-ATN NAC89 50 mg/Kg vs. AS-ATN LCD67 10 mg/Kg	-34,50	Yes
AS-ATN NAC89 50 mg/Kg vs. AS-ATN LCD67 50mg/Kg	-17,10	No
AS-ATN LC50 10 mg/Kg vs. AS-ATN LC50 50 mg/Kg	11,60	No
AS-ATN LC50 10 mg/Kg vs. AS-ATN LCD67 10 mg/Kg	-22,90	No
AS-ATN LC50 10 mg/Kg vs. AS-ATN LCD67 50mg/Kg	-5,500	No
AS-ATN LC50 50 mg/Kg vs. AS-ATN LCD67 10 mg/Kg	-34,50	Yes
AS-ATN LC50 50 mg/Kg vs. AS-ATN LCD67 50mg/Kg	-17,10	No
AS-ATN LCD67 10 mg/Kg vs. AS-ATN LCD67 50mg/Kg	17,40	No

Teste Kruskal-Wallis para estirpe AS-30CQ

Kruskal-Wallis test		
P value	P<0.0001	
Exact or approximate P value?	Gaussian	
P value summary	Approximation	
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	***	
Number of groups	Yes	
Kruskal-Wallis statistic	9	
	36,28	
	Difference in rank	Significant? P
Dunn's Multiple Comparison Test	sum	< 0.05?
AS-30CQ PBS vs AS-30CQ ART 10 mg/Kg	10,20	No
AS-30CQ PBS vs AS-30CQ ART 50 mg/Kg	19,80	No
AS-30CQ PBS vs AS-30CQ NAC89 2 mg/Kg	13,60	No
AS-30CQ PBS vs AS-30CQ NAC89 10 mg/Kg	26,40	No
AS-30CQ PBS vs AS-30CQ LC50 10 mg/Kg	27,90	Yes
AS-30CQ PBS vs AS-30CQ LC50 50 mg/Kg	36,70	Yes
AS-30CQ PBS vs AS-30CQ LCD67 10 mg/Kg	0,0000	No
AS-30CQ PBS vs AS-A30CQ LCD67 50 mg/Kg	20,20	No
AS-30CQ ART 10 mg/Kg vs AS-30CQ ART 50 mg/Kg	9,600	No
AS-30CQ ART 10 mg/Kg vs AS-30CQ NAC89 2 mg/Kg	3,400	No
AS-30CQ ART 10 mg/Kg vs AS-30CQ NAC89 10 mg/Kg	16,20	No
AS-30CQ ART 10 mg/Kg vs AS-30CQ LC50 10 mg/Kg	17,70	No
AS-30CQ ART 10 mg/Kg vs AS-30CQ LC50 50 mg/Kg	26,50	No
AS-30CQ ART 10 mg/Kg vs AS-30CQ LCD67 10 mg/Kg	-10,20	No
AS-30CQ ART 10 mg/Kg vs AS-A30CQ LCD67 50 mg/Kg	10,00	No
AS-30CQ ART 50 mg/Kg vs AS-30CQ NAC89 2 mg/Kg	-6,200	No
AS-30CQ ART 50 mg/Kg vs AS-30CQ NAC89 10 mg/Kg	6,600	No
AS-30CQ ART 50 mg/Kg vs AS-30CQ LC50 10 mg/Kg	8,100	No
AS-30CQ ART 50 mg/Kg vs AS-30CQ LC50 50 mg/Kg	16,90	No
AS-30CQ ART 50 mg/Kg vs AS-30CQ LCD67 10 mg/Kg	-19,80	No
AS-30CQ ART 50 mg/Kg vs AS-A30CQ LCD67 50 mg/Kg	0,4000	No
AS-30CQ NAC89 2 mg/Kg vs AS-30CQ NAC89 10 mg/Kg	12,80	No
AS-30CQ NAC89 2 mg/Kg vs AS-30CQ LC50 10 mg/Kg	14,30	No
AS-30CQ NAC89 2 mg/Kg vs AS-30CQ LC50 50 mg/Kg	23,10	No
AS-30CQ NAC89 2 mg/Kg vs AS-30CQ LCD67 10 mg/Kg	-13,60	No
AS-30CQ NAC89 2 mg/Kg vs AS-A30CQ LCD67 50 mg/Kg	6,600	No
AS-30CQ NAC89 10 mg/Kg vs AS-30CQ LC50 10 mg/Kg	1,500	No
AS-30CQ NAC89 10 mg/Kg vs AS-30CQ LC50 50 mg/Kg	10,30	No
AS-30CQ NAC89 10 mg/Kg vs AS-30CQ LCD67 10 mg/Kg	-26,40	No
AS-30CQ NAC89 10 mg/Kg vs AS-A30CQ LCD67 50 mg/Kg	-6,200	No
AS-30CQ LC50 10 mg/Kg vs AS-30CQ LC50 50 mg/Kg	8,800	No
AS-30CQ LC50 10 mg/Kg vs AS-30CQ LCD67 10 mg/Kg	-27,90	Yes

AS-30CQ LC50 10 mg/Kg vs AS-A30CQ LCD67 50 mg/Kg	-7,700	No
AS-30CQ LC50 50 mg/Kg vs AS-30CQ LCD67 10 mg/Kg	-36,70	Yes
AS-30CQ LC50 50 mg/Kg vs AS-A30CQ LCD67 50 mg/Kg	-16,50	No
AS-30CQ LCD67 10 mg/Kg vs AS-A30CQ LCD67 50 mg/Kg	20,20	No

Teste Kruskal-Wallis para estirpe AS-ART

Number of families	1	
Number of comparisons per family	36	
Alpha	0,05	
Kruskal	0,0002	
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?
AS-ART PBS vs. AS-ART ART 10 mg/Kg	-2,000	No
AS-ART PBS vs. AS-ART ART 50 mg/Kg	15,00	No
AS-ART PBS vs. AS-ART NAC89 2 mg/Kg	13,40	No
AS-ART PBS vs. AS-ART NAC89 10 mg/Kg	28,60	Yes
AS-ART PBS vs. AS-ART LC50 10 mg/Kg	2,200	No
AS-ART PBS vs. AS-ART LC50 50 mg/Kg	29,40	Yes
AS-ART PBS vs. AS-ART LCD67 10 mg/Kg	11,60	No
AS-ART PBS vs. AS-ART LCD67 50 mg/Kg	11,60	No
AS-ART ART 10 mg/Kg vs. AS-ART ART 50 mg/Kg	17,00	No
AS-ART ART 10 mg/Kg vs. AS-ART NAC89 2 mg/Kg	15,40	No
AS-ART ART 10 mg/Kg vs. AS-ART NAC89 10 mg/Kg	30,60	Yes
AS-ART ART 10 mg/Kg vs. AS-ART LC50 10 mg/Kg	4,200	No
AS-ART ART 10 mg/Kg vs. AS-ART LC50 50 mg/Kg	31,40	Yes
AS-ART ART 10 mg/Kg vs. AS-ART LCD67 10 mg/Kg	13,60	No
AS-ART ART 10 mg/Kg vs. AS-ART LCD67 50 mg/Kg	13,60	No
AS-ART ART 50 mg/Kg vs. AS-ART NAC89 2 mg/Kg	-1,600	No
AS-ART ART 50 mg/Kg vs. AS-ART NAC89 10 mg/Kg	13,60	No
AS-ART ART 50 mg/Kg vs. AS-ART LC50 10 mg/Kg	-12,80	No
AS-ART ART 50 mg/Kg vs. AS-ART LC50 50 mg/Kg	14,40	No
AS-ART ART 50 mg/Kg vs. AS-ART LCD67 10 mg/Kg	-3,400	No
AS-ART ART 50 mg/Kg vs. AS-ART LCD67 50 mg/Kg	-3,400	No
AS-ART NAC89 2 mg/Kg vs. AS-ART NAC89 10 mg/Kg	15,20	No
AS-ART NAC89 2 mg/Kg vs. AS-ART LC50 10 mg/Kg	-11,20	No
AS-ART NAC89 2 mg/Kg vs. AS-ART LC50 50 mg/Kg	16,00	No
AS-ART NAC89 2 mg/Kg vs. AS-ART LCD67 10 mg/Kg	-1,800	No
AS-ART NAC89 2 mg/Kg vs. AS-ART LCD67 50 mg/Kg	-1,800	No
AS-ART NAC89 10 mg/Kg vs. AS-ART LC50 10 mg/Kg	-26,40	No
AS-ART NAC89 10 mg/Kg vs. AS-ART LC50 50 mg/Kg	0,8000	No
AS-ART NAC89 10 mg/Kg vs. AS-ART LCD67 10 mg/Kg	-17,00	No
AS-ART NAC89 10 mg/Kg vs. AS-ART LCD67 50 mg/Kg	-17,00	No
AS-ART LC50 10 mg/Kg vs. AS-ART LC50 50 mg/Kg	27,20	Yes
AS-ART LC50 10 mg/Kg vs. AS-ART LCD67 10 mg/Kg	9,400	No
AS-ART LC50 10 mg/Kg vs. AS-ART LCD67 50 mg/Kg	9,400	No
AS-ART LC50 50 mg/Kg vs. AS-ART LCD67 10 mg/Kg	-17,80	No
AS-ART LC50 50 mg/Kg vs. AS-ART LCD67 50 mg/Kg	-17,80	No
AS-ART LCD67 10 mg/Kg vs. AS-ART LCD67 50 mg/Kg	0,0	No

Composto NAC89 nas 4 estirpes

Table Analyzed	NAC89 AS-3CQ	
Kruskal-Wallis test		
P value	0,1466	
	Gaussian	
Exact or approximate P value?	Approximation	
P value summary	ns	
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No	
Number of groups	4	
Kruskal-Wallis statistic	5,370	
		Significant? P <
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	0.05?
ATN 10 mg/Kg vs ATN 50 mg/Kg	2,400	No
ATN 10 mg/Kg vs NAC89 2 mg/Kg	3,200	No
ATN 10 mg/Kg vs NAC89 10 mg/Kg	8,400	No
ATN 50 mg/Kg vs NAC89 2 mg/Kg	0,8000	No
ATN 50 mg/Kg vs NAC89 10 mg/Kg	6,000	No
NAC89 2 mg/Kg vs NAC89 10 mg/Kg	5,200	No
Table Analyzed	NAC89 AS-ATN	
Kruskal-Wallis test		
P value	0,0052	
	Gaussian	
Exact or approximate P value?	Approximation	
P value summary	**	
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes	
Number of groups	4	
Kruskal-Wallis statistic	12,77	
		Significant? P <
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	0.05?
ATN 10 mg/Kg vs ATN 50 mg/Kg	4,200	No
ATN 10 mg/Kg vs NAC89 10 mg/Kg	6,500	No
ATN 10 mg/Kg vs NAC89 50 mg/Kg	12,90	Yes
ATN 50 mg/Kg vs NAC89 10 mg/Kg	2,300	No
ATN 50 mg/Kg vs NAC89 50 mg/Kg	8,700	No
NAC89 10 mg/Kg vs NAC89 50 mg/Kg	6,400	No
Table Analyzed	NAC89 AS-30CQ	

Kruskal-Wallis test
P value 0,0385
Gaussian
Exact or approximate P value? Approximation
P value summary *
Do the medians vary signif. (P < 0.05) Yes
Number of groups 5
Kruskal-Wallis statistic 10,12

	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?
Dunn's Multiple Comparison Test		
ART 10 mg/Kg vs ART 50 mg/Kg	7,800	No
ART 10 mg/Kg vs NAC89 2 mg/Kg	2,600	No
ART 10 mg/Kg vs NAC89 10 mg/Kg	13,40	Yes
ART 10 mg/Kg vs Column H	8,200	No
ART 50 mg/Kg vs NAC89 2 mg/Kg	-5,200	No
ART 50 mg/Kg vs NAC89 10 mg/Kg	5,600	No
ART 50 mg/Kg vs Column H	0,4000	No
NAC89 2 mg/Kg vs NAC89 10 mg/Kg	10,80	No
NAC89 2 mg/Kg vs Column H	5,600	No
NAC89 10 mg/Kg vs Column H	-5,200	No

Table Analyzed NAC89 AS-ART

Kruskal-Wallis test
P value 0,0029
Gaussian
Exact or approximate P value? Approximation
P value summary **
Do the medians vary signif. (P < 0.05) Yes
Number of groups 5
Kruskal-Wallis statistic 16,05

	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?
Dunn's Multiple Comparison Test		
ART 10 mg/Kg vs ART 50 mg/Kg	9,200	No
ART 10 mg/Kg vs NAC89 2 mg/Kg	8,200	No
ART 10 mg/Kg vs NAC89 10 mg/Kg	18,00	Yes
ART 10 mg/Kg vs Column H	12,60	No
ART 50 mg/Kg vs NAC89 2 mg/Kg	-1,000	No
ART 50 mg/Kg vs NAC89 10 mg/Kg	8,800	No
ART 50 mg/Kg vs Column H	3,400	No
NAC89 2 mg/Kg vs NAC89 10 mg/Kg	9,800	No
NAC89 2 mg/Kg vs Column H	4,400	No
NAC89 10 mg/Kg vs Column H	-5,400	No

Composto LCD67 nas 4 estirpes

Table Analyzed	LCD67 AS-3CQ		
Kruskal-Wallis test			
P value	0,3321		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	ns		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No		
Number of groups	4		
Kruskal-Wallis statistic	3,414		
		Significant?	P <
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	0.05?	
ATN 10 mg/Kg vs ATN 50 mg/Kg	3,000	No	
ATN 10 mg/Kg vs LCD67 10 mg/Kg	-2,000	No	
ATN 10 mg/Kg vs LCD67 50 mg/Kg	4,200	No	
ATN 50 mg/Kg vs LCD67 10 mg/Kg	-5,000	No	
ATN 50 mg/Kg vs LCD67 50 mg/Kg	1,200	No	
LCD67 10 mg/Kg vs LCD67 50 mg/Kg	6,200	No	

Table Analyzed	LCD67 AS-ATN		
Kruskal-Wallis test			
P value	0,0082		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	**		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	4		
Kruskal-Wallis statistic	11,78		
		Significant?	P <
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	0.05?	
ATN 10 mg/Kg vs ATN 50 mg/Kg	3,600	No	
ATN 10 mg/Kg vs LCD67 10 mg/Kg	-7,800	No	
ATN 10 mg/Kg vs LCD67 50 mg/Kg	3,000	No	
ATN 50 mg/Kg vs LCD67 10 mg/Kg	-11,40	Yes	
ATN 50 mg/Kg vs LCD67 50 mg/Kg	-0,6000	No	
LCD67 10 mg/Kg vs LCD67 50 mg/Kg	10,80	Yes	

Table Analyzed	LCD67 AS-30CQ		
Kruskal-Wallis test			
P value	0,0068		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	**		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	4		
Kruskal-Wallis statistic	12,19		
		Significant?	P <
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	0.05?	

ART 10 mg/Kg vs ART 50 mg/Kg	5,000	No
ART 10 mg/Kg vs LCD67 10 mg/Kg	-6,000	No
ART 10 mg/Kg vs LCD67 50 mg/Kg	5,400	No
ART 50 mg/Kg vs LCD67 10 mg/Kg	-11,00	Yes
ART 50 mg/Kg vs LCD67 50 mg/Kg	0,4000	No
LCD67 10 mg/Kg vs LCD67 50 mg/Kg	11,40	Yes

Table Analyzed

LCD67 AS-ART

Kruskal-Wallis test	
P value	0,0289
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	5
Kruskal-Wallis statistic	10,80

Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?
ART 10 mg/Kg vs ART 50 mg/Kg	11,20	No
ART 10 mg/Kg vs LCD67 10 mg/Kg	9,000	No
ART 10 mg/Kg vs LCD67 50 mg/Kg	9,200	No
ART 10 mg/Kg vs Column H	14,60	Yes
ART 50 mg/Kg vs LCD67 10 mg/Kg	-2,200	No
ART 50 mg/Kg vs LCD67 50 mg/Kg	-2,000	No
ART 50 mg/Kg vs Column H	3,400	No
LCD67 10 mg/Kg vs LCD67 50 mg/Kg	0,2000	No
LCD67 10 mg/Kg vs Column H	5,600	No
LCD67 50 mg/Kg vs Column H	5,400	No

Composto LCD67 nas 4 estirpes

Table Analyzed	LC50 AS-3CQ	
Kruskal-Wallis test		
P value	0,0030	
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation	
P value summary	**	
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes	
Number of groups	4	
Kruskal-Wallis statistic	13,91	
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?
ATN 10 mg/Kg vs ATN 50 mg/Kg	1,600	No
ATN 10 mg/Kg vs LC50 10 mg/Kg	7,300	No
ATN 10 mg/Kg vs LC50 50 mg/Kg	12,30	Yes
ATN 50 mg/Kg vs LC50 10 mg/Kg	5,700	No
ATN 50 mg/Kg vs LC50 50 mg/Kg	10,70	Yes
LC50 10 mg/Kg vs LC50 50 mg/Kg	5,000	No
Table Analyzed	LC50AS-ATN	
Kruskal-Wallis test		
P value	0,0024	
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation	
P value summary	**	
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes	
Number of groups	4	
Kruskal-Wallis statistic	14,41	
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?
ATN 10 mg/Kg vs ATN 50 mg/Kg	4,400	No
ATN 10 mg/Kg vs LC50 10 mg/Kg	8,100	No
ATN 10 mg/Kg vs LC50 50 mg/Kg	13,50	Yes
ATN 50 mg/Kg vs LC50 10 mg/Kg	3,700	No
ATN 50 mg/Kg vs LC50 50 mg/Kg	9,100	No
LC50 10 mg/Kg vs LC50 50 mg/Kg	5,400	No
Table Analyzed	LC50 AS-30CQ	
Kruskal-Wallis test		
P value	0,0024	
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation	
P value summary	**	
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes	
Number of groups	5	
Kruskal-Wallis statistic	16,55	
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?
ART 10 mg/Kg vs ART 50 mg/Kg	5,800	No
ART 10 mg/Kg vs LC50 10 mg/Kg	11,30	No

ART 10 mg/Kg vs LC50 10 mg/Kg	17,70	Yes
ART 10 mg/Kg vs Column H	6,200	No
ART 50 mg/Kg vs LC50 10 mg/Kg	5,500	No
ART 50 mg/Kg vs LC50 10 mg/Kg	11,90	No
ART 50 mg/Kg vs Column H	0,4000	No
LC50 10 mg/Kg vs LC50 10 mg/Kg	6,400	No
LC50 10 mg/Kg vs Column H	-5,100	No
LC50 10 mg/Kg vs Column H	-11,50	No

Table Analyzed

LC50AS-ART

Kruskal-Wallis test		
P value	0,0010	
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation	
P value summary	**	
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes	
Number of groups	5	
Kruskal-Wallis statistic	18,41	
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?
ART 10 mg/Kg vs ART 50 mg/Kg	9,200	No
ART 10 mg/Kg vs LC50 10 mg/Kg	3,000	No
ART 10 mg/Kg vs LC50 50 mg/Kg	17,60	Yes
ART 10 mg/Kg vs Column H	12,20	No
ART 50 mg/Kg vs LC50 10 mg/Kg	-6,200	No
ART 50 mg/Kg vs LC50 50 mg/Kg	8,400	No
ART 50 mg/Kg vs Column H	3,000	No
LC50 10 mg/Kg vs LC50 50 mg/Kg	14,60	Yes
LC50 10 mg/Kg vs Column H	9,200	No
LC50 50 mg/Kg vs Column H	-5,400	No