



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Estudo da toxicidade inerente à utilização de fármacos baseados em endoperóxidos,
no tratamento da malária.

Nuna Cláudia Peixoto de Araújo

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Dissertação orientada pela Professora Doutora Maria de Lurdes Santos Cristiano

2014



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Estudo da toxicidade inerente à utilização de fármacos baseados em endoperóxidos,
no tratamento da malária.

Nuna Cláudia Peixoto de Araújo

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Dissertação orientada pela Professora Doutora Maria de Lurdes Santos Cristiano

2014

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

«Copyright» Nuna Cláudia Peixoto de Araújo

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Ao meu pai querido

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente à Professora Lurdes Cristiano pelo apoio e acompanhamento que prestou durante a elaboração desta monografia. Obrigada Professora por mais uma vez, em mais uma etapa profissional da minha vida, ter estado ao meu lado. O que se seguirá?!

Agradeço também as muitas palavras de carinho, encorajamento e incentivo que tive nos momentos certos (!), de várias pessoas que me são muito queridas e que o sabem!

À Jani, um obrigada especial. Obrigada por teres estado sempre lá... Sempre. Sem ti seria muito mais difícil e muito menos divertido ter concluído este desafio a que nos propusemos há já algum tempo!

Aos meus pais por tudo. Toda a coragem, a confiança, o amor, que tanto ajudaram neste percurso.

À minha filha, por existir!

Resumo

O composto natural artemisinina e os seus derivados, são fármacos da classe dos endoperóxidos usados há várias décadas no tratamento de malária, pois conduzem à rápida diminuição da massa de *Plasmodium* e apresentam elevada tolerância em humanos. [1, 2] Devido ao desenvolvimento de resistência por parte do parasita a alguns fármacos convencionais, a terapia de combinação contendo endoperóxidos é vivamente recomendada pela Organização Mundial de Saúde e tem contribuído para uma diminuição da mortalidade e morbidade devidas à malária. [3]

O potencial terapêutico das artemisininas está igualmente em estudo enquanto potenciais anti-neoplásicos, no tratamento de cancro da mama, colo-rectal e do pulmão. [2, 4]

O mecanismo de ação destes endoperóxidos é baseado na ativação dos mesmos pela presença de ferro existente em células de *Plasmodium* e em células cancerígenas, altamente proliferativas. A sua ativação celular gera espécies radicalares, de elevada reatividade, com atividade farmacológica relativamente às células alteradas, conferindo seletividade à abordagem terapêutica. [5,6] Os alvos terapêuticos propostos são vários, sendo o seu mecanismo de ação alvo de um intenso debate científico.

Apesar de muito promissores, algumas questões se levantam relativamente à segurança destes compostos, essencialmente com a possível toxicidade inerente à terapia, associada com o seu centro ativo. De facto, existem casos de neurotoxocidade e embriotoxicidade reportados em estudos com animais, apesar de não relatados no uso clínico. [2, 7-9] Relativamente à embriotoxicidade, assume-se que o benefício estimado na administração de alguns destes fármacos nos primeiros trimestres de gravidez compensam o risco associado, evitando consequências de malária tais como anemia, em ambos gestante e feto, parto prematuro, atraso do desenvolvimento embrionário, baixo peso do recém-nascido ou mesmo aborto. [10]

Esta monografia pretende elencar e discutir as evidências recolhidas relativamente à potencial toxicidade de fármacos antimaláricos contendo um centro ativo endoperoxídico, abordando a temática na perspetiva da razão custo / benefício.

Palavras-chave: Malária, *Plasmodium*, Artemisinina, Endoperóxido, Neurotoxocidade, Embriotoxicidade.

Abstract

Natural artemisinin and its derivatives were used for several decades in the treatment of malaria due to high efficacy, with rapid *Plasmodium* parasite clearance, and high human tolerance. [1, 2] Widespread selection of resistance by malaria parasites to most conventional drugs, led to the use of Artemisinin Combination Therapy, a strategy [3] strongly recommended and supported by the World Health Organization.

Presently, the potential of Artemisinins as anticancer drugs is also under evaluation, with studies underway for applications in breast, colorectal and lung cancers. [2, 4]

The action of endoperoxides requires activation by Fe(II) or heme, and this metal is present in both *Plasmodium* parasites and fast proliferating cancer cells. *In situ* bio-activation generates highly reactive radical species that react with molecular targets inside parasite cells or cancer cells. This therapeutic approach ensures efficacy and selectivity. [5, 6]

Various molecular targets have been implicated in the mode of action of peroxides but this matter remains in intense debate.

Although endoperoxide based drugs are widely used in malaria chemotherapy and the chemotype is promising for cancer chemotherapy, safety questions are raised, mostly related with neurotoxicity and embryotoxicity, which are not reported in clinical studies [2, 7-9] but are observed in animal data.

Concerning embryotoxicity, it is assumed that the benefits of such drugs during second and third trimesters of pregnancy reward the disadvantages inherent to the use of this therapy, avoiding cases of anemia in both mother and embryo, premature birth, delay [10] in development, and/or low weight in babies and even abortion.

The aim of this report is to present and discuss available evidence on potential toxicity associated to the use of endoperoxide-type drugs in the treatment of malaria, considering the ratio cost/benefit.

Keywords: Malaria, *Plasmodium*, Artemisinin, Endoperoxide, Neurotoxicity, Embryotoxicity.

Índice

1. Malária	1
2. Prevenção e controlo	3
3. Ciclo do parasita <i>Plasmodium</i>	4
4. Terapia antimalárica – dos primórdios aos dias de hoje	6
5. Artemisinina- uma alternativa farmacológica	8
6. Terapia de combinação.....	11
6.1. Artemisinina e seus derivados, como agentes de combinação terapêutica.....	13
7. Artemisinina e derivados – bioativação do centro ativo	14
8. Alguns endoperóxidos com potencial antiplasmodial: 1,2,4-trioxanos, 1,2,4,5-trioxolanos e 1,2,4,5-tetraoxanos.....	16
9. Artemisinina, seus derivados e endoperóxidos sintéticos – mecanismo e alvos de ação	21
10. Toxicidade de endoperóxidos usados no tratamento de Malária.....	24
10.1. Neurotoxicidade de ART's	24
10.2. Embriotoxicidade / Teratogenicidade associada à utilização de endoperóxidos no tratamento da Malária.....	29
11. O projeto ARTEMIP e a atualização do estado da arte.....	38
11.1. Informação relevante ARTEMIP ^[101]	40
12. Conclusão	41
<i>Bibliografia</i>	43

Índice de Figuras

Figura 1.1 Fêmea do mosquito <i>Anopheles</i>	1
Figura 1.2. Cloroquina (CQ).....	2
Figura 2.1. Incidência da Malaria Global.....	4
Figure 3.1 Ciclo de vida do parasita <i>Plasmodium</i>	5
Figura 4.1. Azul-de-metileno, quinina e seus derivados.....	7
Figura 4.2. Representação da estrutura de vários antimaláricos.....	8
Figura 5.1 Representação da estrutura da artemisinina.....	9
Figura 5.2. Representação estrutural de derivados de artemisinina.....	10
Figura 5.3. Representação estrutural de dímeros de artemisinina	11
Figura 6.1. Representação estrutural de alguns fármacos antimaláricos usados em terapia de combinação.....	12
Figura 6.1.1. Lumefantrina.....	13
Figura 7.1. ‘Docking’ artemisinina-heme.....	15
Figura 8.1. Representação estrutural de alguns endoperóxidos sintéticos.....	17
Figura 8.2. Representação estrutural dos trioxolanos OZ277 e OZ439.....	18
Figura 8.3. Representação estrutural do RKA182.....	19
Figura 10.1.1. Representação de um neurónio.	26

Índice de Esquemas

Esquema 9.1. Esquema representativo da degradação da hemoglobina e mecanismo de destoxificação do heme pelo <i>Plasmodium</i>	21
Esquema 9.2. Esquema representativo do mecanismo e alvos de ação das espécies radicalares formadas após ativação do centro ativo endoperoxídico.....	23
Esquema 10.2.1. Representação esquemática dos processos que conduzem a peroxidação lipídica induzida por artemisinina.....	35
Esquema 10.2.2. Representação esquemática do mecanismo de clivagem homolítica do farmacóforo endoperoxídico.....	36
Esquema 10.2.3. Representação esquemática o mecanismo de clivagem heterolítica da ponte endoperoxídica, catalisada pelo Fe(II).....	37
Esquema 11.1. Esquema representativo do processo de ‘spin-trapping’ de um intermediário endoperoxídico radicalar.....	39

Lista de Abreviaturas

ACT - Artemisinin-based Combination Therapy (Terapia Combinada de Artemisinina)

ADME – Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção

AL – Artesunato-Lumefantrina

ART – Artemisinina

ART's – Artemisininas

CQ – Cloroquina

DHA – Dihidroartemisinina

DDT – Diclorodifeniltricloroetano

OMS – Organização Mundial de Saúde

*Pf*ATPase – *Plasmodium falciparum* ATPase

ROS – Reactive Oxygen Species (Espécies Reactivas de Oxigênio)

SERCA – Ca²⁺ - ATPase do retículo endoplasmático

SP – Sulfadoxina-Pirimetamina

TEMPO – ,2,6,6-Tetrametil-1-piperidiniloxido

TCTP – Translationally controlled tumour protease

1. Malária

A malária é uma doença provocada por um parasita protozoário, *Plasmodium*. O seu nome ‘mal aria’, ‘mau aire’, deriva do facto de se ter pensado que a malária poderia ser proveniente de pântanos fétidos. Em 1880, o parasita unicelular *Plasmodium* foi identificado como sendo a causa da doença e, mais tarde, Ross demonstrou que a sua transmissão é feita de pessoa a pessoa, através da picada da fêmea do mosquito *Anopheles* (Figura 1.1). A infeção é então causada pela transmissão de uma das quatro espécies do protozoário *Plasmodium*, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* ou *P. malariae*, que entra na corrente sanguínea. [11, 12]



[10]

Figura 1.1. Fêmea do mosquito *Anopheles*.

A tentativa de erradicação da malária, entre 1955 e 1969, recorrendo ao uso de inseticidas como o diclorodifeniltricloroetano (DDT) e recorrendo globalmente ao uso do fármaco cloroquina (CQ, Figura 1.2), foi dissipada com o desenvolvimento de resistência quer por parte do vetor de transmissão, o mosquito, aos inseticidas, quer por parte do *Plasmodium*, à CQ.

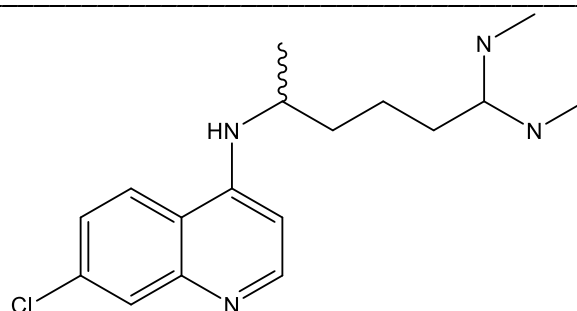


Figura 1.2. Representação da estrutura da Cloroquina (CQ).

Nos dias de hoje, e apesar de todos os esforços no combate à doença, 40% da população mundial ainda permanece em risco de contrair malária. A doença prevalece nos países mais pobres, nas regiões tropicais e sub-tropicais de África, Ásia e América Latina. A Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta para que em 2010 tenham existido 219 milhões de casos de infeção pelo parasita da malária e 660 000 mortes provocadas pelo referido *Plasmodium*. Estudos da distribuição geográfica de malária mostram que, em 2010, 80% dos casos de mortalidade ocorreram em apenas 14 países e 80% dos casos estimados ocorreram em 17 países. A República Democrática do Congo e a Nigéria representam 40% da mortalidade por malária, a nível global. O *P. falciparum* é responsável pelos casos mais severos de malária, e consequente mortalidade, sendo as principais vítimas crianças com menos de 5 anos e mulheres grávidas. [10]

A malária continua a revelar-se uma das doenças com consequências mais devastadoras ao nível de saúde pública mundial, representando uma preocupação tanto a nível de saúde como a nível económico nos países afetados.

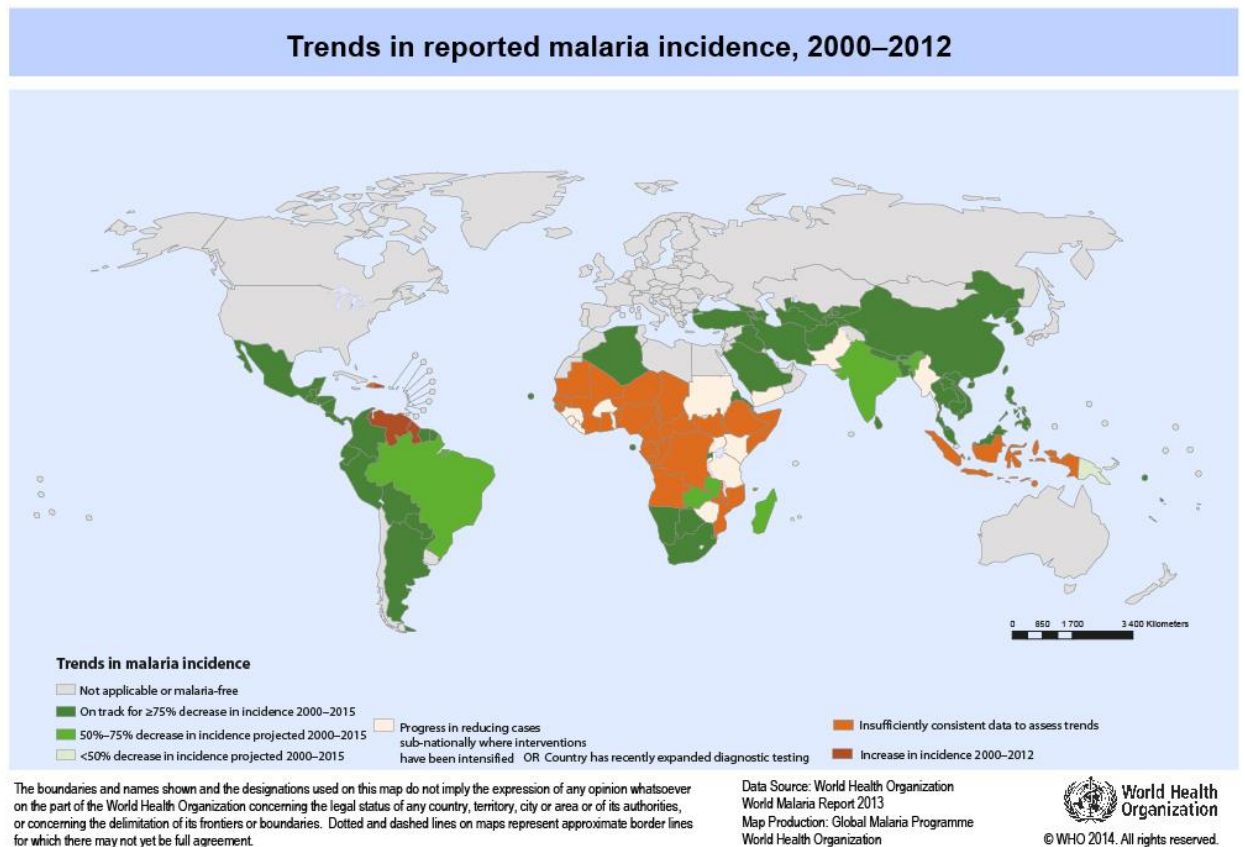
Existem várias dificuldades associadas ao controlo da malária uma vez que esta representa uma doença de países pobres e a sua transmissão envolve 3 partes distintas de um sistema complexo de hospedeiro humano-vetor de transmissão-parasita protozoário. Num passado recente, a situação agudizou com o desenvolvimento da resistência do *Plasmodium falciparum* à CQ e à combinação sulfadoxina-pirimetamina, na maioria dos países endémicos, bem como com o desenvolvimento de resistência do mosquito *Anopheles* ao DDT. A migração de populações de refugiados em áreas endémicas e as alterações climáticas globais, também contribuíram para o agravamento global da situação. [10, 13]

2. Prevenção e controlo

Nos dias de hoje, uma das estratégias de primeira linha no combate à malária continua a ser a utilização de barreiras físicas, como as redes mosquiteiras, e a gestão ambiental, no sentido de minimizar as condições de sobrevivência e reprodução do mosquito *Anopheles*,
[14]
transmissor do *Plasmodium*. Nas zonas endémicas, o tratamento da malária é feito com fármacos, selecionados de acordo com o padrão de resistência do parasita nas diferentes áreas e recorrendo maioritariamente à terapia de combinação.

Assim, recorre-se frequentemente à combinação de fármacos como artemeter+lumefantrina, artesunato+amodiaquina, artesunato+sulfadoxina ou pirimetamina, artesunato+mefloquina (em áreas com baixa ou moderada transmissão) e amodiaquina+sulfadoxina+pirimetamina (em áreas onde estas substâncias se mantêm
[15]
ativas, como por exemplo nos países do Este Africano).

Apesar dos esforços, a OMS alerta para o facto de os casos de malária poderem duplicar até 2020, caso não se tomem medidas eficazes, tanto ao nível da prevenção como
[15]
ao nível do tratamento (Figura 2.1).



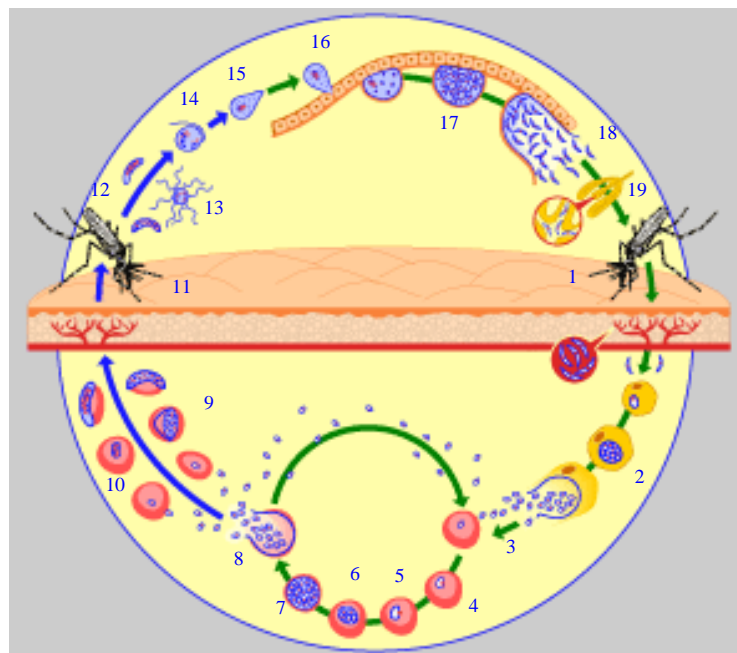
[15]

Figura 2.1. Incidência da Malaria Global.

3. Ciclo do parasita *Plasmodium*

Depois da picada pela fêmea do mosquito *Anopheles*, os parasitas invadem os hepatócitos através da corrente sanguínea (1, Figura 3.1), iniciando assim a fase assintomática do ciclo exo-eritrocitário de infecção. Os esporozoítos iniciam a sua reprodução assexuada, resultando em milhares de merozoítos (2). Em seguida, os parasitas são libertados do fígado e voltam à corrente sanguínea como merozoítos, infectando os eritrócitos (3). Nestes, verificam-se ciclos parasitários de 48 horas, evoluindo e passando por vários estádios, desde o estado de anel (4), trophozoítos (5) e finalmente esquizontes (6). No estado de segmentação (7), cada esquizonte divide-se em 16 merozoítos eritrocitários, que prontamente invadem novas hemácias (8), iniciando a fase sintomática do ciclo infeccioso. Sob fatores de stress, uma pequena parte das formas parasitárias, nesta fase do ciclo, sofre diferenciação em género, formando gametócitos

sexualmente distintos (9 e 10), que se desenvolvem no mosquito, depois de este picar o indivíduo infetado (11). Já no mosquito, os gametócitos femininos desenvolvem-se em macrogametas e os masculinos em microgametas (12 e 13, respetivamente). Estes fundem-se originando o zigoto (14), que se transforma em oócito (15), com mobilidade e capaz de penetrar (16) e de se instalar na membrana externa do zigoto (17). A divisão assexuada do oócito resulta em vários esporozoítos, que depois de romperem a membrana do oócito (18), migram para as glândulas salivares (19).



[10]

Figure 3.1. Ciclo de vida do parasita *Plasmodium*.

A sintomatologia da doença está associada unicamente à fase eritrocítica da infeção pelo *Plasmodium*. Alguns sintomas, como tremores, febre, calafrios e cefaleias, podem manifestar-se nas primeiras semanas, podendo depois evoluir para situações de anemia, devida a rutura das hemácias induzida pelo parasita. Dependendo da estirpe invasora e da intervenção terapêutica, os casos podem dividir-se entre crónicos e agudos, benignos ou letais (se não tratados ou se tratados insuficientemente). As espécies *P. vivax* and *P. ovale* podem existir em estadios latentes, durante anos, no fígado (como hipnozoítos) e causar recaídas clínicas recorrentes. Os casos de maior gravidade são provocados pelo *Plasmodium falciparum*. Nos casos de infeção por esta estirpe podem observar-se sintomas como hipoglicémia, coma, insuficiência renal aguda, edema

pulmonar agudo e também malária cerebral, a qual pode conduzir à morte ao fim de [10] poucas horas.

4. Terapia antimalárica – dos primórdios aos dias de hoje

O uso empírico da quinina (Figura 4.1), uma 4-aminoquinolina extraída das árvores de 'Chincona' na América do Sul, foi das primeiras abordagens terapêuticas da malária, no início do séc. XVII. A quinina foi purificada e isolada em 1820 e usada posteriormente como fármaco puro no tratamento da doença. Ainda é usada no tratamento de malária severa, pois a sua baixa eficácia contrasta com a sua alta solubilidade, permitindo a administração por via endovenosa. É o primeiro fármaco da classe das aminoquinolinas cujo papel no combate à malária é inquestionável. Destacam-se nesta classe o primeiro antimalárico sintético, azul-de-metileno (Figura 4.1) e, posteriormente, outras aminoquinolinas ativas, tais como a pamaquina e mepacrina (Figura 4.1), usadas extensivamente durante a 2ª Guerra Mundial. A cloroquina, sintetizada em 1935, foi dos fármacos mais eficazes no combate à malária, revelando-se ativa contra todas as formas de malária e apresentando baixa toxicidade, pelo que foi utilizada na tentativa de erradicação da doença a nível mundial. Infelizmente, no final dos anos 50, foram reportados casos de resistência do parasita *P. falciparum* à CQ e este fármaco passou a ser utilizado apenas em estirpes sensíveis e, por ser bem tolerado e a sua preparação de [16, 17] baixo custo, em abordagens de combinação terapêutica ou profiláticas.

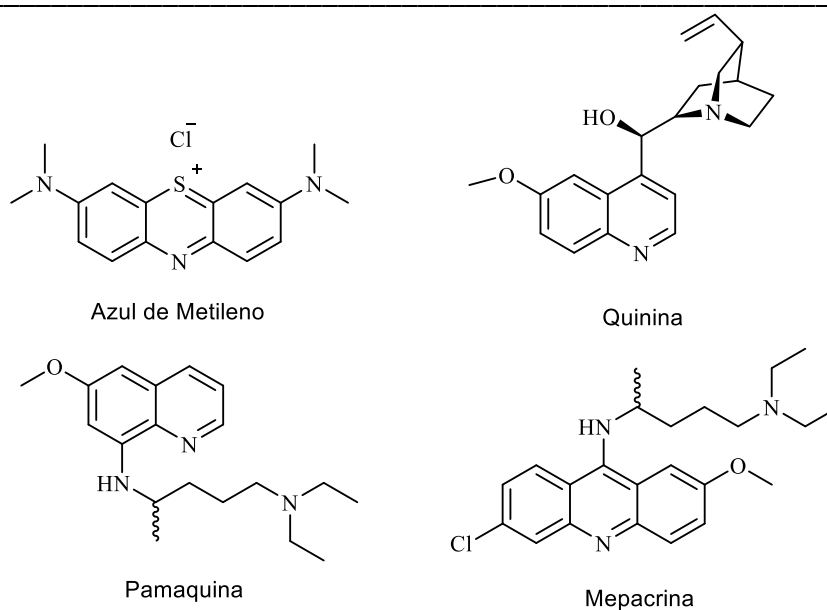


Figura 4.1. Representação da estrutura do azul-de-metileno, quinina e alguns dos seus derivados.

A amodiaquina, mais ativa, mas revelando uma maior hepatotoxicidade, surge posteriormente. Em resposta ao desenvolvimento de resistência do parasita à CQ, durante a guerra do Vietname, surgiu a mefloquina (Figura 4.2), que apresenta no entanto efeitos neurotóxicos secundários. A primaquina, uma 8-aminoquinolina, demonstrou ser ativa na fase exo-eritrocítica, e o seu derivado, tafenoquina, apresentou um tempo de semi-vida plasmático muito superior ao do seu precursor, e ativo nas fases gametocítica e eritrocítica, tendo como alvos a destoxificação do heme e processos mitocondriais do parasita. Também alguns arilaminoálcoois, como a halofantrina e a pironaridina (Figura 4.2), demonstraram atividade anti-malárica, com mecanismo de ação semelhante à CQ, mas a primeira revelou limitações ao nível da cardiotoxicidade e a segunda, apesar de se tratar do derivado quinolínico mais ativo contra estirpes resistentes à CQ, tem elevados custos de preparação. Os antifolatos, como o cloroproguanil e as diaminopirimidinas, inibidores da enzima di-hidrofolato redutase (DHFR), e a sulfadoxina (Figura 4.2), inibidora da enzima di-hidropteroato sintase (DHPS), revelaram atividade antiparasitária por inibição da biossíntese do folato, substância essencial para o crescimento do parasita. O desenvolvimento de resistência a estes fármacos, devido

essencialmente a mutações enzimáticas, e a hipersensibilidade ao componente sulfonamídico, levaram a restrições ao seu uso.

[13, 18-21]

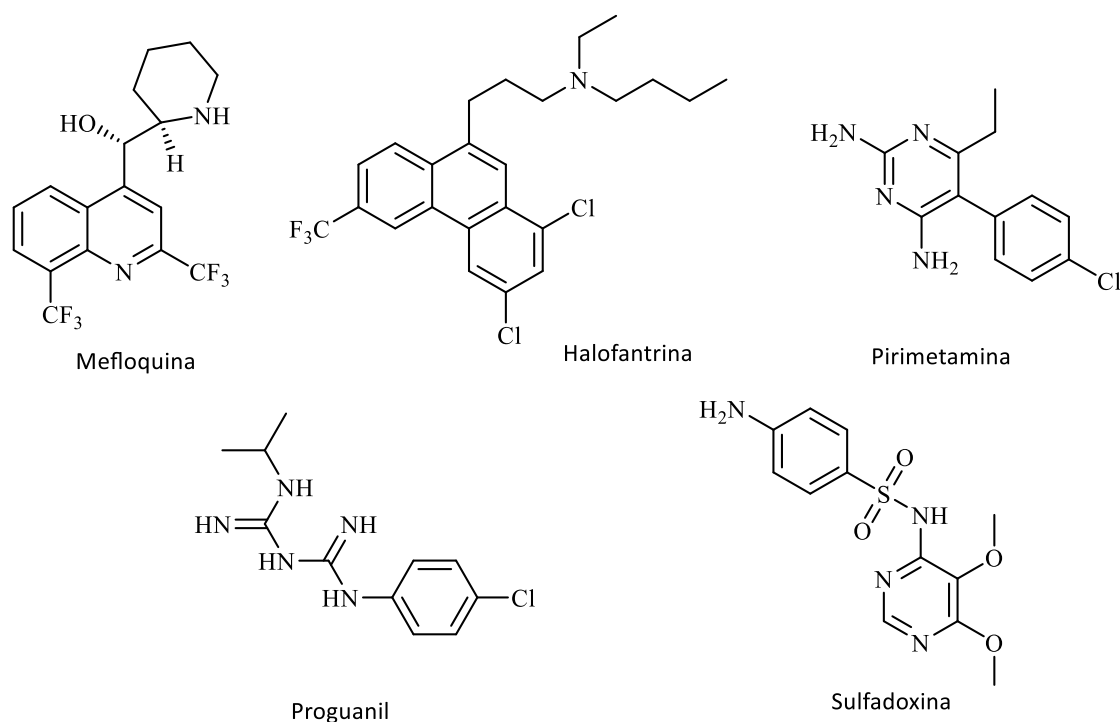


Figura 4.2. Representação da estrutura de vários antimaláricos.

5. Artemisinina- uma alternativa farmacológica

A artemisinina (ART, Figura 5.1), uma lactona sesquiterpénica extraída da planta *Artemisia annua*, foi isolada em 1972 e representou o início de uma nova geração de fármacos com elevada atividade antimalárica. Os primeiros registos da utilização de *qinghao* no tratamento de febres relacionadas com a malária remontam aos manuscritos

[18, 22,23]

de Taoist, do séc. III.

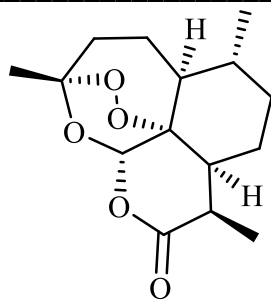


Figura 5.1. Representação da estrutura da artemisinina.

A artemisinina mostrou-se ativa contra as formas eritrocitárias do parasita mas, apesar da sua elevada atividade biológica, apresenta um tempo de semi-vida curto e consequente eliminação rápida do organismo, não tratando a infecção por completo e possibilitando situações de recrudescência do parasita. Além disso, apresenta baixa solubilidade, pelo que a sua administração é feita através de suspensões, intramuscularmente. Para contornar estas restrições, foram preparados alguns derivados semi-sintéticos de artemisinina. A dihidroartemisinina (DHA, Figura 5.2) é um lactol obtido por redução química da artemisinina e demonstrou uma atividade duas vezes superior à da lactona precursora, mas também um perfil de neurotoxicidade mais elevado e biodisponibilidade limitada.

Com o objetivo de aumentar a solubilidade lipídica da ART e torná-la mais estável metabolicamente, melhorando o seu perfil farmacocinético, foram preparados os éteres β -alquilados, artemeter e arteter (Figura 5.2). Infelizmente, verificou-se a sua rápida conversão em DHA, acarretando as mesmas limitações que esta em termos de efeitos secundários e limitando assim o seu uso. Destes dois derivados, o artemeter é o mais utilizado, sendo administrado por via intramuscular sob a forma de uma solução oleosa.

[24]

Na mesma linha de desenvolvimento, procedeu-se à síntese do artesunato (Figura 5.2), um éster da DHA, solúvel em água, podendo ser também administrado por via endovenosa. O artesunato apresenta uma ação rápida e reduz drasticamente o índice de parasitemia. Habitualmente é recomendado em terapias de combinação, uma maneira de evitar recrudescência parasitária devido à sua rápida metabolização. Foi preparado um outro derivado, o ácido artelínico (Figura 4.1.2), que mostrou ter um tempo de semi-vida

superior ao do artesunato e menor toxicidade, apesar de uma atividade antiparasitária

[10, 25]

menor.

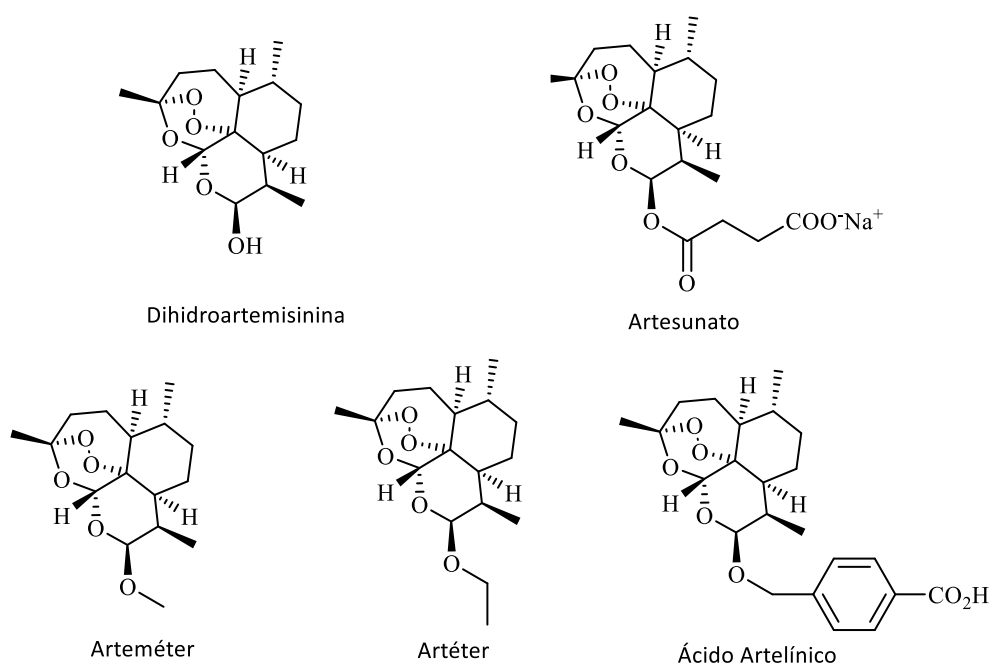


Figura 5.2. Representação estrutural de derivados de artemisinina.

Foram preparados outros compostos semi-sintéticos de artemisinina, nomeadamente alguns dímeros de ART, onde a ligação acetal C10 foi substituída, conferindo mais estabilidade química à molécula. Entre eles, pode-se destacar o dímero fosfato a) e os dímeros b) e c) de artemisinina (Figura 5.3). Todos promissores, o primeiro mostrou ser 50 vezes mais ativo que o artemeter contra *P. Falciparum*, *in vitro*, e os 2

[26, 27]

últimos revelaram-se mais eficazes que o próprio artesunato de sódio.

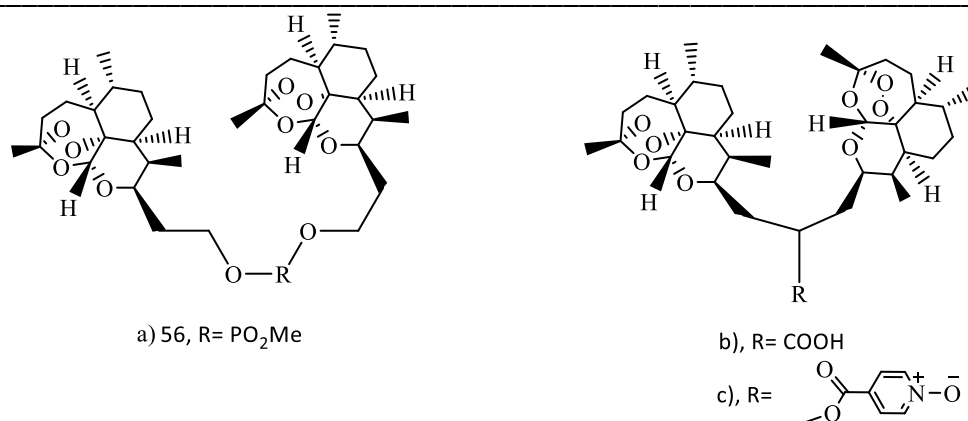


Figura 5.3. Representação estrutural de dímeros de artemisinina.

Apesar das suas limitações, a artemisinina e seus derivados têm sido muito utilizados nas últimas décadas e continuam a ser fármacos a considerar no futuro, especialmente na abordagem de terapia antimalárica de combinação que a OMS promove.

[28]

6. Terapia de combinação

A terapia de combinação representa uma opção promissora para aumentar a eficácia terapêutica e retardar o desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte do *Plasmodium*. Como verificado no uso de terapias de combinação na terapêutica contra a SIDA, tuberculose ou alguns tipos de cancro, também no tratamento da malária há redução do risco de seleção de mutantes resistentes dos parasitas *Plasmodium*, pela combinação de fármacos que não partilhem o mesmo mecanismo de ação e de resistência.

[10]

De uma maneira sucinta, um antimalárico de combinação deve ter as seguintes características:

- Combinar pelo menos dois fármacos dirigidos a alvos terapêuticos distintos ou a pontos diferentes do mesmo alvo e atuando através de mecanismos de ação diferentes;
- Pelo menos um dos componentes deve ter uma ação rápida, capaz de reduzir drasticamente o nível de parasitemia, nas primeiras 48h de tratamento;
- Os fármacos não devem ter interações negativas e o tempo de semi-vida do fármaco combinado deve ser superior ao do fármaco de ação rápida;

- A tolerância deve ser alta e a toxicidade baixa;
- O tratamento ideal deveria afetar a todos os estadios do parasita, incluindo a fase gametocítica.
- O tratamento não deve prolongar-se por mais de 3 dias, por forma a garantir uma boa adesão terapêutica.

A lógica inerente ao uso de terapias de combinação antimaláricas assenta na exploração de efeitos sinérgicos na combinação de pelo menos dois fármacos. Nomeadamente, na combinação atovaquona-proguanil (MALARONE®, Figuras 6.1 e 4.2), pensa-se que o proguanil aumenta o efeito inibidor da atovaquona, no sistema de transporte de eletrões mitocondrial. ^[29, 30] É um tratamento eficaz, e vulgarmente usado ^[31] numa abordagem profilática contra a malária. A associação cloroproguanil-dapsona (LAP DAP®, Figuras 4.2 e 6.1) é menos dispendiosa e estudos clínicos mostraram que é ^[32, 33] mais eficaz que a pirametamina-sulfadoxina, referida anteriormente.

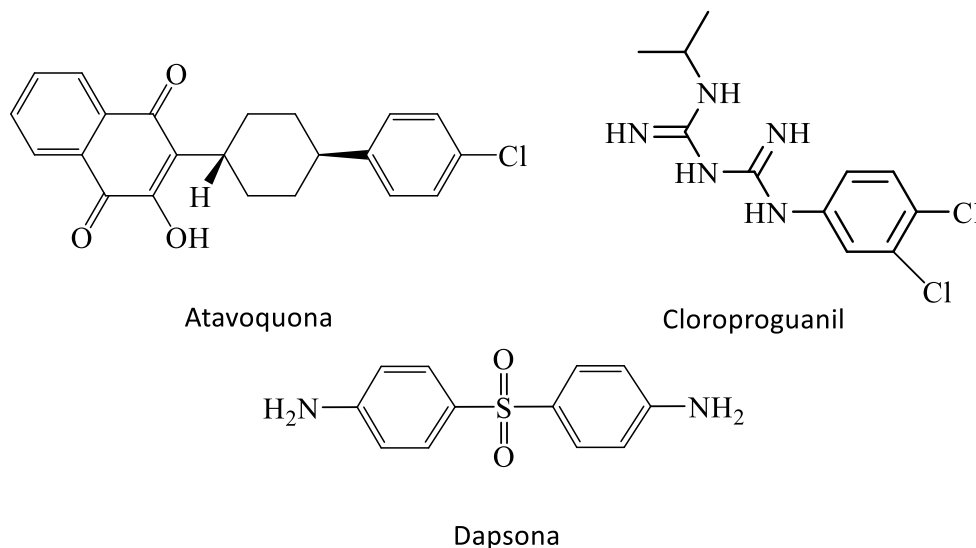


Figura 6.1. Representação estrutural de alguns fármacos antimaláricos usados em terapia de combinação.

6.1. Artemisinina e seus derivados, como agentes de combinação terapêutica

A terapia de combinação com ART ou com um dos seus derivados (ACT) é recomendada como estratégia terapêutica de primeira linha no tratamento de malária causada por *P. falciparum*.

Em 2011, 79 países e territórios adotaram a terapia combinada à base de artemisinina (Artemisinin Combination Therapy) para tratar casos de infecção por *P.*

[15] *falciparum*. O uso de artemisinina e seus derivados na terapia de combinação proporcionou novas abordagens terapêuticas, combinando um fármaco de ação rápida, o endoperóxido, com um outro de eliminação lenta, e menos ativo. Esta combinação resulta numa rápida redução de massa parasitária e em menor exposição do parasita apenas ao fármaco de resistência, traduzindo-se numa menor oportunidade de seleção para resistência ao fármaco por parte do *Plasmodium*. Acrescentar também que as artemisininas reduzem o *carriage* gametocítico e por consequência a transmissão do parasita, reduzindo a incidência da doença, o uso de fármacos e o desenvolvimento de resistência aos mesmos. De referir que as artemisininas são rapidamente eliminadas, não estando por isso expostas por muito tempo ao parasita em concentrações sub-terapêuticas.

[16]

Atualmente, a OMS recomenda as combinações artemeter-lumefantrina (Figuras 5.2 e 6.1.1), artesunato-amodiaquina-mefloquina e artesunato-sulfadoxina-pirimetamina. No sudeste asiático, a junção mefloquina-artesunato resultou numa resposta clínica rápida e a combinação permitiu contornar o problema de resistência do

[34, 35]

parasita à mefloquina.

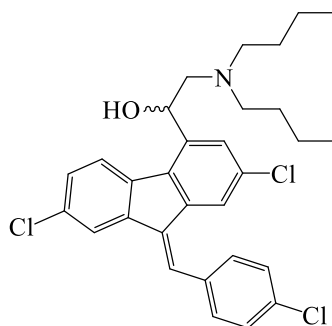


Figura 6.1.1. Lumefantrina.

A combinação lumefantrina-artemeter, resultou em elevadas taxas de cura de malária na Gâmbia e Tânzania, devido à ação de ambos os fármacos no processo parasitário de destoxificação do heme. Sabe-se que o uso de artesunato (Figura 4.2) reduz a massa parasitária em cerca de 10^4 , por cada ciclo replicativo. Apesar dos resultados encorajadores da combinação LAP DAP® acima referida observou-se desenvolvimento de resistência plasmodial em algumas áreas, através da mutação de uma das enzimas-alvo, a di-hidrofolato redutase (DHFR). A associação de artesunato, à combinação LAP DAP®, diminuiu a probabilidade de ocorrência de resistência do parasita graças ao seu efeito rápido e alta taxa de eficácia antiparasitária, originando o LAP DAP®+. [36-38]

Os recursos limitados da fonte natural da artemisinina, bem como o seu baixo rendimento de extração (0.5-0.6% em massa, da planta seca), tornam este composto natural uma matéria prima muito cara para tratar uma doença característica de países muito pobres. [18] Os relatórios de falhas terapêuticas na abordagem de ACT na fronteira entre a Tailândia e o Camboja, também suscitam preocupação. Para além destes aspetos, e como já referido anteriormente, o perfil farmacocinético das artemisininas está longe de ser o ideal, tornando-se assim urgente identificar o seu centro ativo e perceber o seu mecanismo de ação, para poder mimetizar esta família de antimaláricos, numa abordagem sintética e, preferencialmente, pouco dispendiosa e mais eficaz.

7. Artemisinina e derivados – bioativação do centro ativo

A ativação da ponte peroxídica do trioxano artemisinínico e o alvo de ação destes fármacos continua a suscitar polémica, não havendo ainda um consenso na área. A base mecanística assenta na rutura da ligação peroxídica, gerando radicais de oxigénio que rearranjam em radicais de carbono. Ambas as espécies são bastante reativas. Esta ativação pode ser feita por ligação ao ferro hémico, existente nas células infetadas como resultado da degradação da hemoglobina por parte do plasmódio, ou pela ligação ao ferro livre, existente num equilíbrio de espécies de Fe(II) e Fe(III). São vários os estudos e as evidências encontradas na literatura, que suportam as propostas mecanísticas. Por um

lado, num estudo realizado com um derivado semi-sintético de artemisinina, a presença de agentes quelantes do ferro antagonizou a ação do mesmo, dando relevância à presença [4, 5, 39]

e papel deste na ativação do fármaco. Num outro estudo, Meshnick demonstrou que a artemisinina reage com heme intraparasitário, conduzindo a radicais livres tóxicos. [40, 41]

Meunier e Posner estudaram esta interação exaustivamente, e desses estudos resultaram duas conclusões relevantes: (i) tem de existir uma interação próxima entre o peróxido e o centro contendo o metal para permitir a transferência de eletrões necessária à ativação do centro ativo (Figura 7.1.); (ii) a capacidade de alquilação é crucial para a [29, 31, 42]

atividade antimalárica deste tipo de compostos.

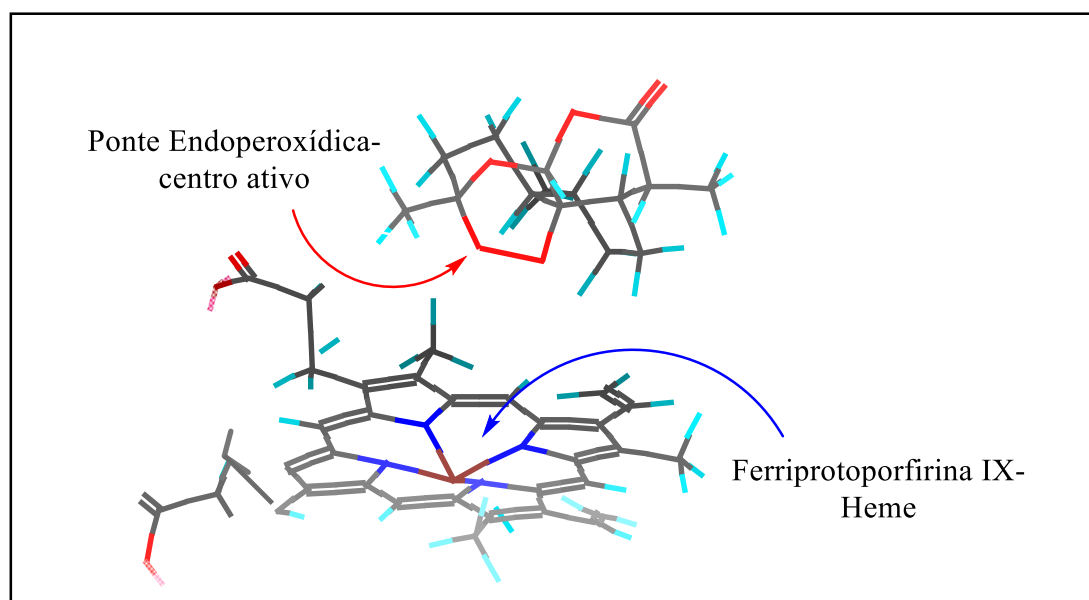


Figura 7.1. 'Docking' artemisinina-heme.

Contudo, outros estudos também demonstraram que a inibição da degradação da hemoglobina e consequente privação de heme disponível para a ativação do peróxido não antagoniza o mecanismo de ação da dihidroartemisinina, sugerindo que provavelmente a [43, 44]

interação com o heme não é a única forma de ativação do farmacóforo.

Convém salientar o facto de estes estudos serem biomiméticos, conferindo modelos semelhantes ao do possível heme existente nas células infetadas pelo parasita, e

disponibilizando fontes de ferro livre, mas não conseguindo substituir integralmente o modelo biológico do eritrócito infetado pelo parasita *Plasmodium*.

8. Alguns endoperóxidos com potencial antiplasmodial: 1,2,4-trioxanos, 1,2,4,5-trioxolanos e 1,2,4,5-tetraoxanos

Com base nas conclusões dos estudos mecanísticos realizados com os derivados da artemisinina, e considerando a hipótese de que a ação destes compostos depende da produção de radicais livres através da clivagem redutiva da ligação O-O do seu centro farmacofórico, independentemente do catalisador que possa mediar o processo, procedeu-se ao desenho e síntese de vários compostos sintéticos contendo um núcleo peroxídico.

Foram preparados vários 1,2,4-trioxanos, com uma estrutura simplificada em relação à ART, visando a possibilidade de variabilidade estrutural anexada ao seu centro ativo. Assim, foram preparados ciclopenteno- e ciclohexeno-1,2,4-trioxanos que foram subsequentemente testados em parasitas resistentes à CQ. Destes, o trioxano fenozan B07 (Figura 8.1) mostrou possuir atividade elevada quando administrado por via oral em

[45]

animais. Foram desenvolvidos por Posner e seus colaboradores trioxanos mais complexos, mantendo os anéis A, B e C da ART. Um destes compostos (trioxano b), Figura 8.1) apresentou atividade antimalárica semelhante ao ácido artenílico, mas exibe

[46]

menor toxicidade que este.

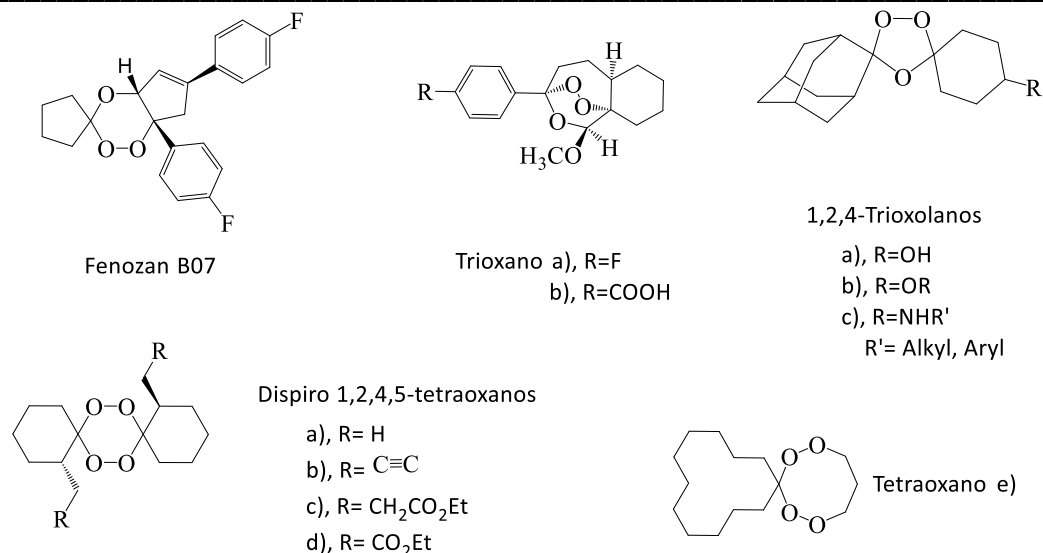


Figura 8.1. Representação estrutural de alguns endoperóxidos sintéticos.

Na procura de novos compostos sintéticos contendo a ligação peroxídica, o trabalho de Vennerstrom e seus colaboradores deve ser destacado, pelo desenvolvimento de uma nova classe de compostos, os 1,2,4-trioxolanos (Figura 8.1). Estes ozonídeos, tendo o anel adamantano como substituinte, apresentam atividade contra *P. falciparum* na escala nanomolar, em alguns casos superior à do artesunato, com um tempo de semi-vida prolongado e melhor biodisponibilidade após administração oral. [47]

A rota sintética para preparação destes compostos é simples e de poucos passos, sendo o passo determinante de síntese uma co-ozonólise de um grupo cetónico e de uma metil oxima. Assim, vários compostos foram preparados, com grande variabilidade estrutural. Um destes compostos, o arterolano, também conhecido por OZ277 (Figura 8.2), chegou à fase III de ensaios clínicos, na forma de maleato de arterolano e em combinação com fosfato de piperquina. Este composto apresenta um perfil farmacocinético superior ao do artesunato e baixos níveis de toxicidade, mesmo em doses mais elevadas (IT elevado), não se observando sinais de neurotoxicidade. No entanto apresentou alguns problemas relacionados com estabilidade plasmática durante a fase II dos ensaios clínicos, podendo implicar a utilização de uma dosagem superior. A sua metabolização a nível hepático envolve a di-hidroxição do anel adamantílico, resultando em metabolitos menos ativos que o precursor. [48, 49]

Com vista a melhorar e contornar algumas limitações dos compostos já existentes e em teste, outros trioxolanos continuam a ser desenvolvidos. De entre estes, o composto

OZ439 (Figura 8.2), já se encontra na fase II dos ensaios clínicos, apresentando até agora resultados ainda mais promissores que o arterolano OZ277, no que respeita ao perfil [50-52] ADME e eficácia terapêutica.

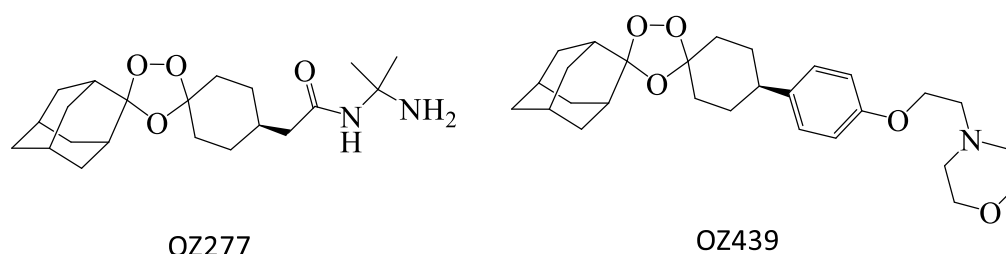


Figura 8.2. Representação estrutural dos trioxolanos OZ277 e OZ439.

Uma outra classe de derivados heterocíclicos desenvolvida por Vennerstrom, os 1,2,4,5-tetraoxanos (Figura 8.1), inclui na sua estrutura duas pontes peroxídicas. A sua preparação tem como passo determinante de síntese a ciclização de cetonas, com peróxido de hidrogénio, em meio ácido, um processo pouco dispendioso. Recentemente, o tetraoxano e) (Figure 8.1) e seus análogos demonstraram atividade na escala nanomolar, alguns mais ativos do que a artemisinina ($IC_{50} = 3 \text{ nM}$ vs $IC_{50} = 10 \text{ nM}$ para a artemisinina),

apresentando também atividade quando administrados oralmente, em ratos, e sem efeitos [53, 54]

tóxicos relevantes.

Nesta classe de endoperóxidos, destaca-se também o composto desenvolvido por O'Neill e colaboradores, o RKA182 (Figura 8.3). Este composto apresentou atividade antimalárica *in vitro* superior à ART, ao artesunato e à mefloquina, contra estirpes de *Plasmodium* do sudoeste asiático resistentes à ACT, e reduziu a parasitemia para níveis indetetáveis, em 24h, em ratinhos infetados com *P. berghei* ANKA, em dose oral única de 30mg/kg. Assim, este 1,2,4,5-tetraoxano, solúvel em água, demonstrou possuir atividade antimalárica e estabilidade excelentes, associadas a uma baixa toxicidade. As suas propriedades ADME ultrapassam a maioria das limitações associadas a outros derivados endoperoxídicos semi-sintéticos e sintéticos que evoluíram para estudo pré-clínico. Posto isto, e considerando que a sua síntese envolve apenas 4 passos não dispendiosos e de rendimento apreciável, estamos perante um composto representativo

do quão promissora pode ser esta classe de endoperóxidos no controlo e mesmo erradicação da malária.

[55]

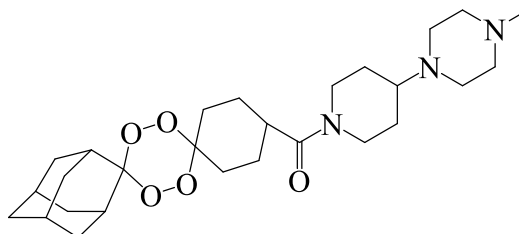


Figura 8.3. Representação estrutural do RKA182.

Dos estudos que relacionam estrutura e atividade, efetuados nas diferentes classes de endoperóxidos aqui referidas, 1,2,4-trioxanos, 1,2,4-trioxolanos e 1,2,4,5-tetraoxanos, podem destacar-se alguns aspetos em comum, que podem e devem ser considerados no desenvolvimento de novos fármacos contra a malária e que se destacam em seguida.

- Lipofilicidade/hidrofilicidade – Deve existir uma relação de equilíbrio entre as 2 propriedades para que haja uma boa disponibilidade oral, sem comprometer a estabilidade metabólica. O que se observa é que compostos mais lipofílicos são mais ativos oralmente mas são mais suscetíveis metabolicamente.
- Simetria *vs* assimetria e estereoquímica *cis vs trans* – Relativamente aos substituintes, os endoperóxidos assimétricos apresentam atividades muito superiores aos simétricos, que são quase inativos, na maioria dos casos. As atividades máximas foram observadas para estruturas em que o volumoso e rígido anel adamantilo era um dos substituintes do farmacóforo endoperoxídico, conferindo estabilidade à molécula e evitando uma exposição excessiva deste ao seu ativador, com conseqüente degradação. O segundo substituinte não deve ser tão impeditivo estericamente (pode ser ciclohexilo, por exemplo), para que o acesso do metal ao núcleo ativo do fármaco seja possível e a sua ativação suceda.
- Mais uma vez, o químico terapêutico depara-se com a necessidade de encontrar um equilíbrio entre a necessidade de rigidez e impedimento estéreo dos substituintes e de acessibilidade ao farmacóforo. A mesma lógica foi encontrada para as conformações *cis vs trans* dos endoperóxidos, permitindo substituintes axiais ou equatoriais relativamente ao centro ativo. As conformações *trans* e

substituintes equatoriais permitem aparentemente um acesso mais fácil ao farmacóforo. Estes fatores vão condicionar o acesso do metal de ativação ao núcleo peroxídico, tendo por isso de existir um equilíbrio entre os mesmos. O que se verificou foi que os enantiómeros *cis* se mostraram mais ativos que os respetivos *trans*. Mais uma vez o que parece ser determinante é a ativação do centro ativo, que não deve estar nem demasiado disponível e por isso demasiado reativo, nem inacessível.

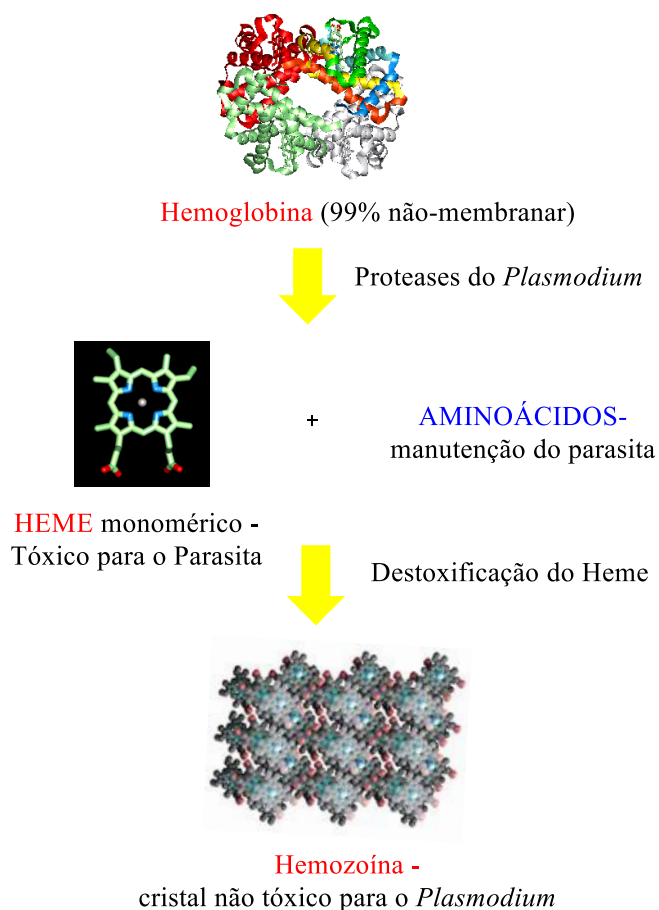
- Substituintes acídicos vs alcalinos e neutros – De uma maneira geral observa-se que os endoperóxidos substituídos com bases fracas ou grupos neutros apresentam um melhor perfil farmacocinético e maior atividade antimalárica que os substituídos com grupos acídicos.

Além dos pontos comuns, foram também observadas algumas diferenças entre as classes de endoperóxidos, que devem ser tidas em consideração em estudos futuros de desenho e otimização de fármacos. Verificou-se que os tetraoxanos apresentam maior estabilidade metabólica que os respetivos trioxanos e trioxolanos. Em estudos comparativos dos compostos trioxolano OZ277 e tetraoxano RKA182, em eritrócitos infetados e não infetados com *P. falciparum*, *in vitro*, observou-se que após 35 min o trioxolano OZ277 já se encontrava completamente degradado nas células infetadas pelo parasita, enquanto que 79% do tetraoxano RKA182 foi recuperado, após 4h de incubação. A maior atividade destes compostos relativamente às outras classes pode estar relacionada com a presença de 2 ligações peroxídicas, com potencial de ação duplicado relativamente às restantes que só contêm uma ligação endoperoxidica no seu centro ativo. As duas ligações O-O podem também melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade. Os tetraoxanos também exibem estabilidade química em meios ácido e básico. Foram realizados ensaios de cito- e genotoxicidade com estes compostos, não se tendo observado indícios de citotoxicidade ou genotoxicidade para os tetraoxanos testados. De uma forma geral, podemos afirmar que os tetraoxanos constituem a sub-classe mais promissora, na classe dos endoperóxidos com atividade antiplasmodial.

[55]

9. Artemisinina, seus derivados e endoperóxidos sintéticos – mecanismo e alvos de ação

O mecanismo de ação das artemisininas continua a suscitar muita investigação e a constituir um tópico de intenso debate entre os vários investigadores. Em termos dos alvos terapêuticos envolvidos, sabe-se que a artemisinina modifica o grupo hémico, pois foram identificados adutos, e que essa modificação contribui para a morte do parasita. Um dos pressupostos é o de que o aduto artemisinina-heme inibe a destoxificação do heme, evitando a formação da hemozoína pelo parasita e levando à sua morte (Esquema 9.1). [56]



Esquema 9.1. Esquema representativo da degradação da hemoglobina e mecanismo de destoxificação do heme pelo *Plasmodium*.^[39]

Outra hipótese colocada é a alquilação de enzimas plasmodiais-chave na degradação da hemoglobina, inibindo-as e privando o parasita da sua fonte de

aminoácidos, comprometendo deste modo o seu crescimento. De facto, foi demonstrada a alquilação de 6 proteínas plasmodiais específicas pela ART e Chauhan e seus colaboradores demonstraram que a ART inibe proteases cisteínicas do parasita, sendo [57] mais ativa quando se inclui heme na mistura de reação.

Um dos alvos mais importantes de alquilação da ART propostos é a proteína *P. falciparum* TCTP (translationally controlled tumour protein), com grande afinidade para se ligar ao grupo heme. Estudos por microscopia de fluorescência mostraram a presença desta proteína próxima do vacúolo de alimentação do parasita, onde decorre a degradação da hemoglobina e consequente libertação de heme e aminoácidos, representando mais um fator indicativo de que a interação ART- TCTP ocorre mediante [58, 59] a presença de heme.

A formação de hemozoína (Figura 9.1.), polímero constituído por aglomeração de dímeros de hematina, através do qual o parasita destoxifica o heme, é dependente da ação [60] proteica de proteínas ricas em histidina. A incubação de ART com hemozoína pura, a pH ácido (tal como no vacúolo de alimentação do parasita) leva à acumulação de unidades de hematina, sugerindo que a ART interfere com as proteínas responsáveis pela [40, 57] formação e manutenção da hemozoína.

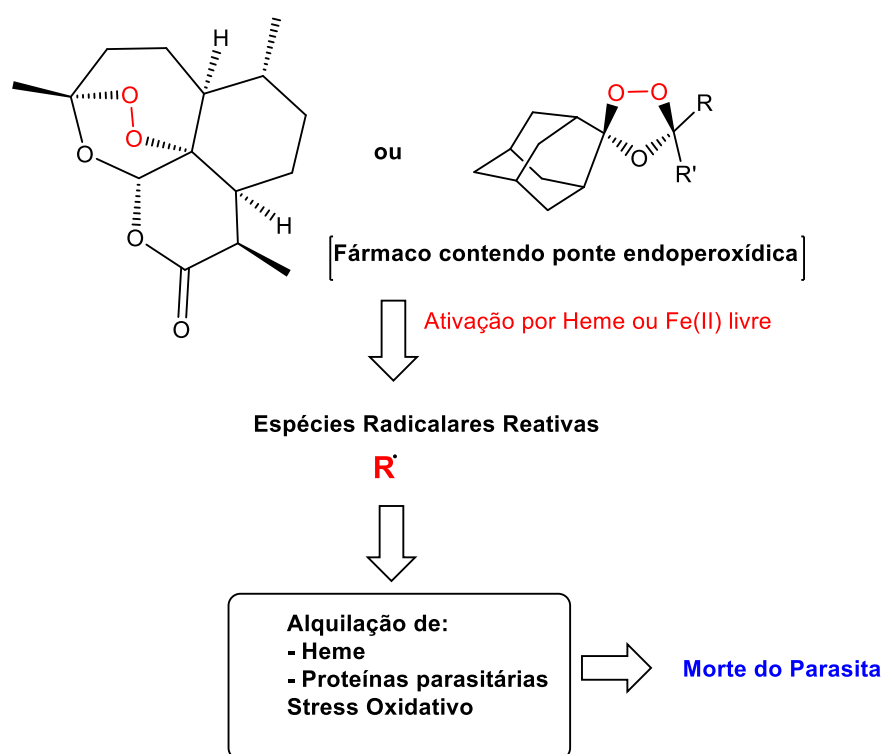
Posteriormente, num estudo desenvolvido por Krishna e seus colaboradores, verificou-se que a ART inibe a PfATP6, uma Ca^{2+} -ATPase do retículo endoplasmático (SERCA), do *P. falciparum*, sendo a inibição semelhante à observada com ‘thapsigargin’, um inibidor específico da SERCA. Foi observado que a ART antagoniza a ação deste inibidor, sugerindo uma competição para o mesmo alvo, e possivelmente um mecanismo [35, 9] de ação semelhante. Também se verificou que a presença de um agente quelante de ferro limita a atividade antiparasitária de ambos, o que é indicativo de um mecanismo mediado pelo Fe(II). Estudos de imagiologia demonstraram que tanto a ART como o thapsigargin, marcados com sonda fluorescente, acumulam fora do vacúolo parasitário [22] após ativados pelo ferro, inibindo a PfATPase6.

Foi ainda demonstrado que a ação dos endoperóxidos sintéticos, 1,2,4-trioxolanos e 1,2,4,5-tetraoxanos, está também dependente da bioativação pelo Fe(II), através de um

mecanismo semelhante ao descrito para a artemisinina e seus derivados. Estudos de microscopia confocal, recorrendo a marcadores fluorescentes, revelaram a acumulação preferencial destes compostos em eritrócitos infetados pelo *Plasmodium*, no seu vacúolo de alimentação e citoplasma, revelando também especificidade perante as células-alvo.

Estudos mecanísticos envolvendo as duas classes de endoperóxidos sintéticos descritas, em presença do composto TEMPO, conhecido pela sua elevada afinidade para espécies radiculares, revelaram a formação de radicais centrados nos átomos de carbono adjacentes ao farmacóforo. [61-63]

Estas espécies radiculares, muito reativas, podem posteriormente proceder à alquilação de heme, formando adutos, bem como à alquilação de outros alvos moleculares, por exemplo proteínas parasitárias essenciais ao *Plasmodium* (Esquema 9.2). Além desse poder alquilante, podem gerar stress oxidativo nos diferentes processos e sistemas biológicos, nas células infetadas pelo parasita, contribuindo para a sua atividade anti-plasmodial.



Esquema 9.2. Esquema representativo do mecanismo e alvos de ação das espécies radiculares formadas após ativação do centro ativo endoperóxido.

Dos estudos realizados com as várias classes de endoperóxidos podem destacar-se pontos em comum e pontos divergentes, no seu mecanismo de ação e alvos terapêuticos. É consensual que todos requerem uma ativação do seu núcleo peroxídico pelo Fe(II), livre ou não, após acumulação seletiva em eritrócitos infetados pelo *Plasmodium*, e que dessa bioativação resultam espécies radicalares, centradas em oxigénio e em carbono, com poder de oxidação ou de alquilação, respetivamente. A alquilação pode ocorrer em vários alvos, incluindo heme e proteínas vitais para o parasita, como a PfATPase ou TCTP. Muito provavelmente, estes fármacos são multi-alvo, o que justifica a elevada atividade e o desenvolvimento lento de resistência por parte do parasita a estes compostos. As diferenças de atividade entre os compostos resulta da variabilidade estrutural, conferindo-lhes reatividade e afinidade para as moléculas-alvo distintas.

10. Toxicidade de endoperóxidos usados no tratamento de Malária.

Na ausência de uma vacina efetiva contra a malária, a terapêutica farmacológica continua a ser uma das armas mais importantes no combate à doença, destacando-se o papel das artemisininas. Contudo, não existe ainda um consenso no que diz respeito à toxicidade associada à artemisinina, seus derivados e outros análogos que partilham o mesmo quimiotipo.

Nesta monografia pretende-se discutir a toxicidade potencial de fármacos contendo um centro ativo endoperoxídico, usados na terapia da malária, com base nos resultados disponíveis na literatura.

10.1. Neurotoxicidade de ART's

Relativamente aos dados de neurotoxicidade obtidos para o tratamento da malária com compostos de artemisinina, verifica-se uma discrepância entre os resultados obtidos em culturas celulares ou em animais (ratos, cães e macacos) e em humanos. Os dados *in vitro* e em animais revelam efeitos secundários sérios e relevantes, contrariamente aos dados obtidos em estudos clínicos ou pré-clínicos envolvendo humanos, que registam a presença de efeitos adversos não relevantes ou mesmo a sua ausência.

Foram efetuados vários estudos-controlo, nomeadamente com pacientes portadores de malária aguda, residentes na zona endémica do sudeste Asiático, e tratados com artemeter e artesunato oralmente, durante 3 anos. Estes estudos revelaram ausência de neurotoxicidade, com base numa avaliação dos efeitos neurotóxicos, com particular ênfase em testes de audiometria. [64]

Num outro estudo envolvendo 863 pacientes portadores de malária não-complicada, da fronteira este da Tailândia, foram administrados oralmente artemeter e artesunato, em regimes de monoterapia e de terapias de combinação com mefloquina. Os derivados artemisinínicos administrados em combinação com mefloquina provocaram episódios de náuseas, tonturas, vômitos e anorexia. Pelo contrário, quando administrados individualmente, mostraram-se bem tolerados e seguros, não se destacando nenhum efeito neurológico adverso. [65]

Contudo, o baixo número de casos-controlo e as inúmeras limitações inerentes aos estudos realizados em zonas endémicas de malária podem condicionar a recolha de dados concretos, fazendo com que a neurotoxicidade associada aos endoperóxidos em humanos continue a ser um foco de preocupação. É necessário maior vigilância e seria importante aumentar o conhecimento acerca dos processos toxicológicos, em termos mecanísticos.

Os efeitos de neurotoxicidade descritos, inerentes ao uso de artemisininas em ratos, cães e macacos, são vários, incluindo distúrbios motores, perda de reflexos visuais e da dor, entre outros. [66] O processo de toxicidade que despoleta tais efeitos pode estar associado à neurodegeneração induzida por esta classe de fármacos, pode envolver diversas estruturas celulares e apresentar padrões variados. Pode destruir estruturas neuronais e/ou não neuronais, como os axónios ou mesmo a mielina, ou levar à lise de células da glia, células não-neuronais mas que contribuem para a manutenção dos neurónios. Eventualmente, uma ou o conjunto destas alterações comprometem a viabilidade celular dos neurónios (Figura 10.1.1). É de salientar que estas alterações morfológicas devem ser precedidas de desequilíbrios bioquímicos e outras variações celulares, tais como a integridade do citoesqueleto e o próprio equilíbrio energético, e que devem ser tidos em consideração.

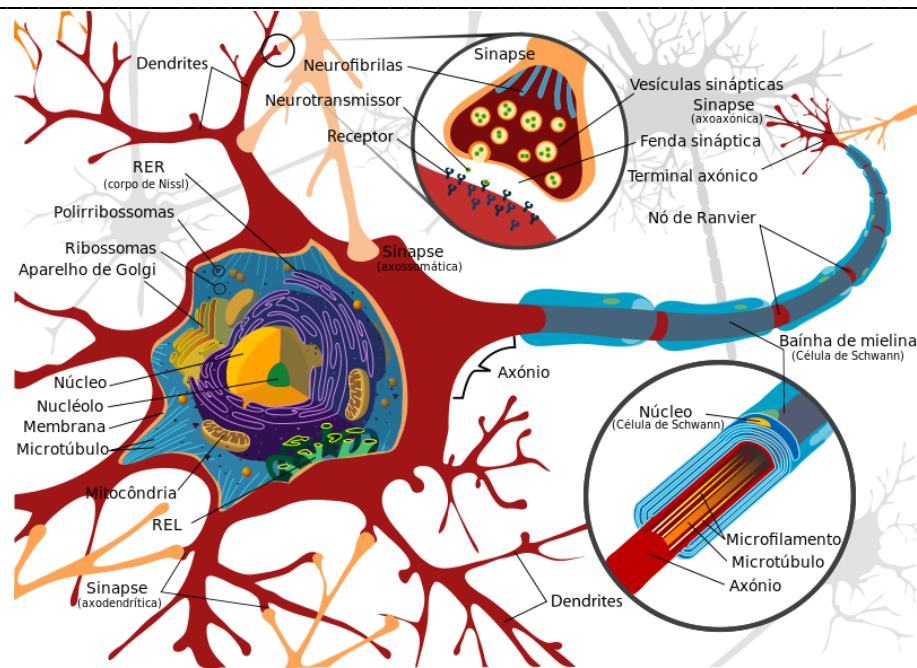


Figura 10.1.1. Representação de um neurônio. [69]

Existem evidências *in vitro* de que as células neuronais são mais sensíveis à DHA, artemeter e arteter do que as células da glia. [67, 68]

Schmuck e Haynes desenvolveram um sistema de ensaios para detecção de neurotoxicidade baseado em cultura de células estaminais cerebrais primárias do córtex de rato. Com o objetivo de averiguar os possíveis mecanismos de neurodegeneração, culturas de células estaminais neuronais sensíveis à artemisinina foram comparadas com não-sensíveis, tais como neurónios corticais e astrócitos. Foram observados efeitos adversos no citoesqueleto de células estaminais cerebrais passados 7 dias de tratamento com artemisinina, mas não em células corticais. Contudo, 7 dias após a recuperação esse efeito observou-se também nas culturas de células corticais e agravou-se nas estaminais.

Também se verificou que a artemisinina reduz os níveis de ATP intracelulares e o potencial interno da membrana mitocondrial, abaixo do limite de citotoxicidade, com maior relevância em células estaminais. Nenhum efeito relevante foi observado no mesmo estudo em neurónios corticais passados 7 dias, ou em astrócitos, passado 1 dia. Foi observado um aumento de ROS e de peroxidação lipídica em ambos os tipos celulares. [70]

Aparentemente a neurodegeneração é resultado de efeitos nocivos em vários alvos intracelulares, podendo interferir com o citoesqueleto celular e com a modulação da energia celular (ATP), através de defeitos mitocondriais ou metabólicos, e ainda causar stress oxidativo ou efeitos excitotóxicos.

O mecanismo proposto, inerente a essa toxicidade, baseia-se na ativação da ponte endoperoxídica do fármaco e consequente geração de metabólitos radicalares, entre eles ROS, que podem vir a interagir com proteínas essenciais aos processos estruturais e químicos fundamentais para a manutenção celular (ver secção 10.2. para análise mecanística detalhada). Assim, foram efetuados vários estudos no sentido de averiguar o papel de substâncias antioxidantes na redução da neurotoxicidade das artemisininas e do seu impacto no desenvolvimento e diferenciação de estruturas neuronais, outros no sentido de analisar o papel da concentração de ferro ou da presença de ferriprotoporfirina IX (heme) no seu mecanismo de ação.

Várias são as evidências de toxicidade da artemisinina e derivados na diferenciação de neuroblastos NB2a.^[71] Smith investigou o papel da glutathione endógena na toxicidade dos antimaláricos artemeter e DHA, em linhas de neuroblastos NB2a, analisando a sua influência na crescimento de extensões nervosas, que posteriormente se diferenciam em astrócitos ou dendrites. Foi verificado que a presença de antioxidantes como a dismutase superóxido, a catalase ou a glutathione diminuem a inibição do crescimento de tais prolongamentos celulares provocada tanto pela combinação artemeter+heme, como pela DHA, confirmando a geração de espécies oxidativas neste processo.^[72]

Foram conduzidos alguns estudos com o intuito de avaliar o impacto da presença de ferro ou heme na activação das artemisininas e no mecanismo de toxicidade subjacente. Assim, McLean e seus colegas observaram que o artemeter, na presença de ferriprotoporfirina IX, ambos em concentrações na escala micromolar, inibe o processo de diferenciação de neuroblastos NB2a em 76%. Adicionalmente, foi observado que esta inibição foi bloqueada na presença de ácido ascórbico e glutathione (escala micromolar), dados que concordam com outros, anteriormente reportados.^[73]

Ward e colaboradores^[74] também investigaram o impacto da presença de heme no processo de neurotoxicidade, tratando linhas de células NB2a com artemeter, arteeter

e DHA, na presença de heme (a concentrações numa escala nanomolar). Para todos os derivados de artemisinina, observou-se um aumento da inibição da formação de estruturas neuronais por diferenciação das células NB2a, em cerca de 20%. Também foi reportado um aumento da ligação destes fármacos a proteínas NB2a em cerca de 2x e a proteínas cerebrais de rato, de 3 a 6x. Curiosamente, observou-se neste mesmo estudo que a ferriprotoporfirina IX não tem qualquer impacto na neurotoxicidade do derivado desoxigenado da artemisinina, reforçando a hipótese de que o mecanismo de toxicidade destes derivados passa pela ativação da ponte O-O para produção de espécies radicalares ou intermediários electrofílicos tóxicos para as células neuronais. [74]

Mais recentemente, e com o fito de justificar a discrepância dos resultados encontrados em estudos de toxicidade em animais e humanos, foi sugerido que as formulações intramusculares de artemisinina, administradas em estudos com animais, levam à sua libertação lenta, e conseqüentemente a uma eliminação tardia, podendo potenciar a sua toxicidade. Pelo contrário, em pacientes com malária são administradas formulações orais e, por isso, de mais rápida absorção e eliminação. [76]

Esta hipótese foi reforçada mais recentemente por resultados de estudos conduzidos por Efferth e Kaina. Estes investigadores reuniram dados relativos a estudos de toxicidade em culturas de células, em animais (ratos, coelhos cães e macacos) e em humanos. Analogamente, é sugerido que a causa de toxicidade no tratamento com artemisininas em animais, que contrasta com a ausência da mesma em humanos, se justifica pela longa exposição aos fármacos, após administração intramuscular. No caso da administração em humanos verificam-se picos de concentração dos fármacos, após administração oral dos mesmos, e rápida eliminação. [77]

É por isso importante salientar que o desfasamento de resultados em relação à neurotoxicidade de artemisininas deverá estar relacionado com o perfil farmacocinético dos compostos e diferentes modos de administração, o que determina a extensão da exposição aos seus metabolitos.

10.2. Embriotoxicidade / Teratogenicidade associada à utilização de endoperóxidos no tratamento da Malária

A terapia de combinação farmacológica e, em particular, usando artemisininas como um dos fármacos da combinação, ACT, é recomendada pela OMS para tratamento de casos de malária em zonas endêmicas, tal como referido anteriormente. [78]

Apesar de esta estratégia ter sido adotada em vários países, a monitorização da sua utilização, sobretudo no que diz respeito ao seu perfil de segurança, não tem sido a mais apertada, especialmente em populações africanas, onde outros fatores de elevadíssima importância devem ser considerados. Nestas populações é habitual verificarem-se situações graves de comorbidade, tais como a presença de SIDA, tuberculose, malnutrição entre outras, que merecem particular interesse. [79]

É importante salientar que nesta realidade, e entre as vítimas de malária, se encontram também mulheres grávidas. Estima-se que engravidam anualmente cerca de 50 milhões de mulheres em zonas endêmicas. Na maioria destas zonas a transmissão de malária é intensa, e a doença em grávidas mostra-se predominantemente assintomática. No entanto, esta doença é a maior causa de anemia severa e é responsável por 30-35% dos casos de nascimento de bebés com baixo peso, levando a uma mortalidade anual que se situa entre 75000 e 100000 crianças, em África. [80, 81] Estes valores podem ser afetados por dois fatores que podem mascarar o número real de casos de malária clínica e morte materno/fetal na África sub-Sahariana: por um lado, a falta de precisão de dados e por outro a ambiguidade de, em muitos casos, a malária ser diagnosticada com outras patologias, tais como a infeção por SIDA, que aumenta o nível de parasitemia e acentua os sintomas de febre, anemia e mesmo a redução do peso dos bebés, ao mesmo tempo que reduz drasticamente a eficácia dos tratamentos, quer por deficiência imunitária quer por interação intermedicamentosa. Por exemplo, indutores do CYP3A4 do citocromo P450, tais como a rifampicina ou anticonvulsivos, aceleram a metabolização e eliminação da quinina e mefloquina, baixando a sua concentração e contribuindo para a falha terapêutica destes antimaláricos. [82, 83]

Há indícios claros dos benefícios da profilaxia e controlo da malária, na situação concomitante de gravidez. A utilização de barreiras físicas, como por exemplo o uso de redes mosquiteiras, e de terapêutica profilática com CQ, em regiões onde esta é ainda ativa, ou da combinação sulfadoxina-pirimetamina, contribuíram para resultados positivos, numa primeira abordagem. Estas medidas levaram à redução dos riscos de anemia severa materna em cerca de 40%, à redução do nascimento de bebés com peso baixo em 20-45% e à redução da perda fetal ou mortalidade perinatal em cerca de 30%,
[84, 85]

entre casos de primeira e de segunda gravidez

A malária permanece como uma ameaça à saúde pública, que se reflete diretamente no desenvolvimento socioeconómico das populações, tornando-se urgente a necessidade de contornar esta realidade. A ACT apresenta-se como uma opção no seu controlo mas, apesar de o perfil de alguns derivados da artemisinina ser aparentemente seguro para administração, é preciso ter particular cuidado quando se trata da sua administração durante a gravidez. Dados de estudos publicados desde 1984 alertam para casos de embriotoxicidade de artemisininas e potencial teratogenicidade, verificadas em
[86-88]

modelos animais, não-humanos.

Foi demonstrado recentemente, na sequência de um estudo efetuado em ratos, que o artesunato causa uma redução de eritrócitos fetais, desde uma fase inicial da hematopoiese. A anemia resultante pode levar a danos celulares que podem resultar em malformações ou mesmo morte fetal, logo após 10-14 dias de gestação. Também se verificou a diminuição dos níveis do antioxidante glutathione, indicando que a toxicidade deste fármaco pode passar por stress oxidativo celular. Nenhuma conclusão relativamente ao uso dos mesmos fármacos em humanos pode ser antecipada com base nestes resultados, pois devem considerar-se as diferenças no desenvolvimento entre as espécies. Apesar de a hematopoiese ocorrer de um modo semelhante nas 2 espécies, a extensão da mesma é distinta, durando 7 dias em ratos e 6 semanas em humanos, o que faz com que a exposição ao fármaco seja distinta. Verificou-se contudo que os eritroblastos
[89]

embrionários são, efetivamente, o primeiro alvo deste derivado de artemisinina.

Vários estudos conduzidos pelos grupos de White e Clark reforçam os resultados referidos anteriormente em relação à embriotoxicidade do artesunato, em ratos e coelhos. Quando se compara a toxicidade do derivado artesunato à da dihidroartemisinina,

artemeter e arteter, em ratos e coelhos, após 10 dias de administração oral, verifica-se que todas as artemisininas apresentam o mesmo padrão de letalidade em relação ao embrião e a mesma incidência de malformações, quer ao nível cardiovascular quer ao nível do esqueleto, em ambas as espécies. Adicionalmente, ambas as vias de administração de artesunato, oral e IV, produziram uma exposição sistémica semelhante à do metabolito DHA, sugerindo que provavelmente este é o metabolito tóxico envolvido no processo. De destacar que estes efeitos ocorreram na ausência de toxicidade materna, tendo-se apenas verificado alterações pouco significativas na contagem de reticulócitos, em doses

[90, 91]

próximas das administradas em humanos.

Apesar de se ter verificado embriotoxicidade de artemisininas em roedores, associada a mecanismos de angiogénese, vasculogénese e eritropoiese fetais, numa fase muito inicial da formação dos glóbulos vermelhos, Clark, e mais recentemente Li e Weina, alertam para o facto de nenhum efeito secundário relevante se ter verificado em ensaios clínicos efetuados com 1837 *pacientes* grávidas (das quais 176 no primeiro trimestre), expostas a artemisininas, entre 1989 e 2009. A explicação pode residir no facto de a fase sensível de produção de glóbulos vermelhos nos roedores ocorrer sincronizadamente em 1 dia, podendo ocorrer múltiplas exposições ao fármaco administrado, levando a uma maior proporção de células mortas. Já nos primatas, são necessários 12 dias de tratamento até se verificar a perda de embriões. Nos humanos, perante os dados disponíveis, e apesar da necessidade de estudos adicionais para reunir dados conclusivos, antecipa-se que será necessário um período mais extenso do que o da exposição de 2-3 dias de tratamento com o antimalárico, para se observarem efeitos secundários tóxicos relevantes. Adicionalmente, os ACT orais, usualmente administrados a mulheres grávidas, resultam num pico de concentração celular do fármaco muito baixo e, por isso, pouco passível de provocar embriotoxicidade. Clark salienta que existe uma maior sensibilidade dos eritroblastos da medula óssea de um adulto às artemisininas, que se traduz numa redução mais acentuada no número de reticulócitos (quando sujeitos a doses terapêuticas do fármaco), alertando para a possibilidade de a depleção de eritroblastos embrionários e as malformações do embrião se poderem acentuar nestes casos. Assim, as diferentes sensibilidades ao fármaco e os diferentes perfis farmacocinéticos do mesmo resultam em diferenças consideráveis ao nível da embriotoxicidade entre os casos de administração do fármaco num animal vs num

humano, mantendo os ACT como uma solução adequada para o tratamento de mulheres grávidas portadoras de malária.

[92-95]

Os estudos de Clark também demonstraram que a redução do número de reticulócitos induzida pelas artemisininas em indivíduos saudáveis foi bastante superior (cerca de 5 vezes) à observada em voluntários portadores de malária. O parasita *Plasmodium* causa hipoferrémia, o que leva à concentração de fármacos nas células infectadas. Assim, uma explicação para a menor diminuição da contagem de reticulócitos induzida por artemisininas pode passar pelo facto de a malária reduzir os níveis de tecido-alvo do fármaco, função de gradientes na concentração de Fe(II). Aparentemente, o facto de a grávida ser portadora de malária diminui o risco de embriotoxicidade devida a tratamento com artemisininas.

Apesar de não terem sido confirmados casos de embriotoxicidade induzida pelas artemisininas no primeiro trimestre de gravidez, é de salientar que em África o diagnóstico da doença é baseado em febres altas e nem sempre há confirmação de parasitémia, levando a que certas mulheres corram o risco de ser tratadas com ACTs, mesmo não sendo portadoras do parasita. Assim, poderão ocorrer casos de embriotoxicidade associada às artemisininas no início da gravidez. Por isso, são necessários estudos clínicos adicionais para determinar se efetivamente a doença protege o hospedeiro de reticulocitopenia e embriotoxicidade quando tratado com artemisininas e se o *Plasmodium* é um alvo mais ou menos sensível do que o embrião ou o próprio reticulócito.

[96]

Relativamente aos antimaláricos atualmente administrados a mulheres grávidas para o tratamento de malária não complicada, a OMS recomenda a utilização de ACT nos 2º e 3º trimestres de gravidez e de uma combinação de quinina com clindamicina no primeiro trimestre. Um estudo publicado no Malaria Journal em 2012, baseado em 1103 casos de mulheres grávidas a quem foi administrada a combinação de artesunato e lumefantrina (AL) para o tratamento da malária, indica que nos 2º e 3º trimestres o uso de AL não demonstrou qualquer efeito adverso relevante, comparativamente à utilização de quinina ou à combinação sulfadoxina-pirimetamina (SP), apresentando a mesma eficácia terapêutica e uma maior tolerância.

[97]

Porém, e tal como já referido anteriormente, existem indícios de que o perfil farmacocinético dos antimaláricos se altere na gravidez, pelo que são necessários estudos adicionais que permitam averiguar a eficácia e tolerância no primeiro trimestre de gravidez.

Apesar destes indicadores, o número de estudos que reportam a exposição de mulheres grávidas a artemisininas, especialmente durante o primeiro trimestre de gravidez, é muito reduzido, não sendo representativo da realidade ao ponto de se poder traçar um perfil clínico seguro.

Além disso, a rápida adesão ao uso de ACTs no tratamento da malária pode levar a situações de risco, quando administrados em mulheres com gravidez não confirmada, especialmente durante o primeiro trimestre. Por outro lado, a utilização de ACTs em grávidas durante os 2º e 3º trimestres também pode ocorrer com frequência, na ausência de uma confirmação da infeção pelo *Plasmodium*.

Todos estes fatores podem contribuir para uma má utilização desta abordagem terapêutica, levando a resultados negativos, gerando desconfiança e falta de adesão aos tratamentos por parte dos pacientes e, em última instância, ao desenvolvimento de resistência por parte do parasita aos antimaláricos do grupo da artemisinina.

Assim, a monitorização e farmacovigilância em grávidas expostas a estes fármacos revelam-se urgentes, especialmente em populações de regiões endémicas, certamente mais representativas da realidade do que as pertencentes a sociedades industrializadas e mais evoluídas, onde as condições de saúde e acesso à mesma são distintas, comprometendo os resultados globais.

Considerando a informação disponível, a OMS recomenda o uso de ACT, de acordo com os dados de eficácia conhecidos para a região em causa, nos 2º e 3º trimestres de gravidez mas refere todavia que, face à falta de dados de toxicidade disponíveis, a utilização de ACT no primeiro trimestre apenas deve ser considerada se não restar alternativa viável.

Face ao exposto, é consensual a necessidade de intensificar e aprofundar a investigação relativamente à embriotoxicidade e teratogenicidade de antimaláricos baseados no quimiótipo do peróxidos.

Da análise dos dados obtidos resultam alguns pontos essenciais:

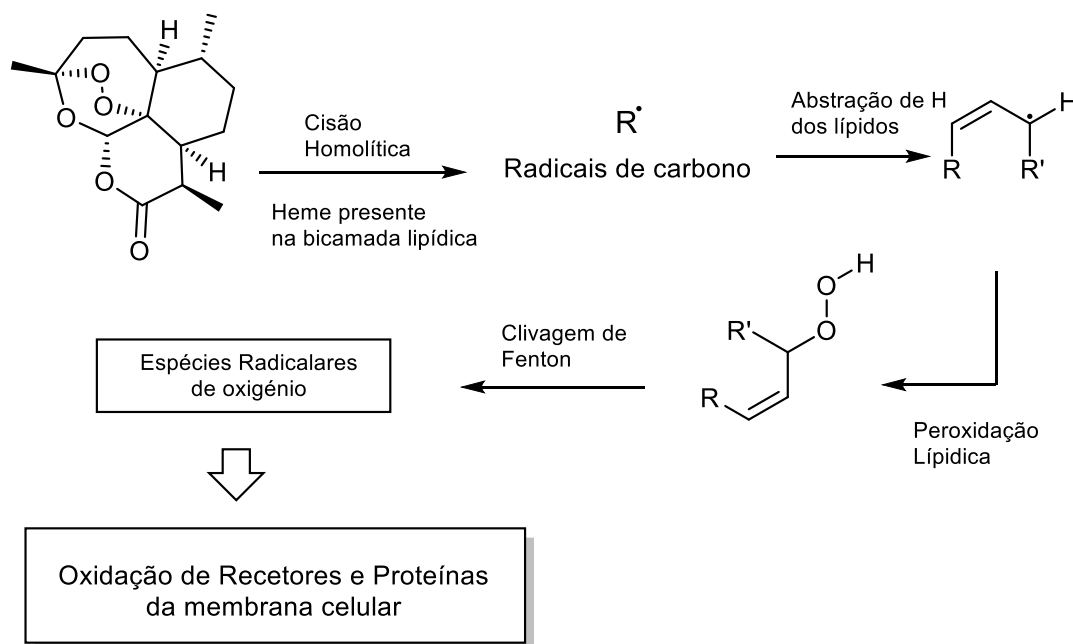
- Investigar o potencial teratogénico destes fármacos em humanos mais amplamente, usando amostras mais representativas da realidade, apesar das limitações inerentes à inclusão de mulheres grávidas em estudos clínicos;
- Efetuar estudos adicionais ao longo dos vários estádios da gravidez para poder avaliar o risco/benefício das artemisininas no tratamento da malária, fazendo a distinção entre as diferentes fases da gestação;
- Efetuar estudos que permitam comparar concentrações e eficácia de fármacos, em mulheres grávidas e não grávidas, no tratamento da malária, para poder traçar perfis farmacocinéticos dos fármacos em ambos os casos e perceber se a gravidez altera, e como altera, esses perfis (excluindo fatores como tipo de infeção ou sensibilidade do parasita, como variáveis);
- Efetuar estudos que permitam fazer uma distinção entre os efeitos associados à ACT e os da malária: anemia, peso baixo do embrião e efeitos secundários no desenvolvimento embrionário;

Relativamente ao uso de artemisininas e seus derivados no tratamento ou profilaxia da malária durante a gravidez, é prioritário compreender os mecanismos responsáveis pela potencial embriotoxicidade e teratogenicidade observadas em animais, após exposição ao fármaco.

Esta informação é crucial como ponto de partida para apurar se existe um risco associado ao uso deste tipo de compostos na terapia/profilaxia da malária durante a gravidez e, perante a informação recolhida relativamente aos processos e mecanismos indutores de toxicidade, tentar minimizar tal risco. A elucidação destes mecanismos para os compostos em estudo poderia levar ao controlo dos efeitos secundários indesejados, por exemplo através da conceção e do desenvolvimento de derivados que minimizem essa toxicidade. Adicionalmente, seria interessante investigar possíveis semelhanças e diferenças mecanísticas entre as artemisininas e outros derivados endoperóxídicos, semi-sintéticos e sintéticos, de forma a antever o seu impacto no desenvolvimento embrionário.

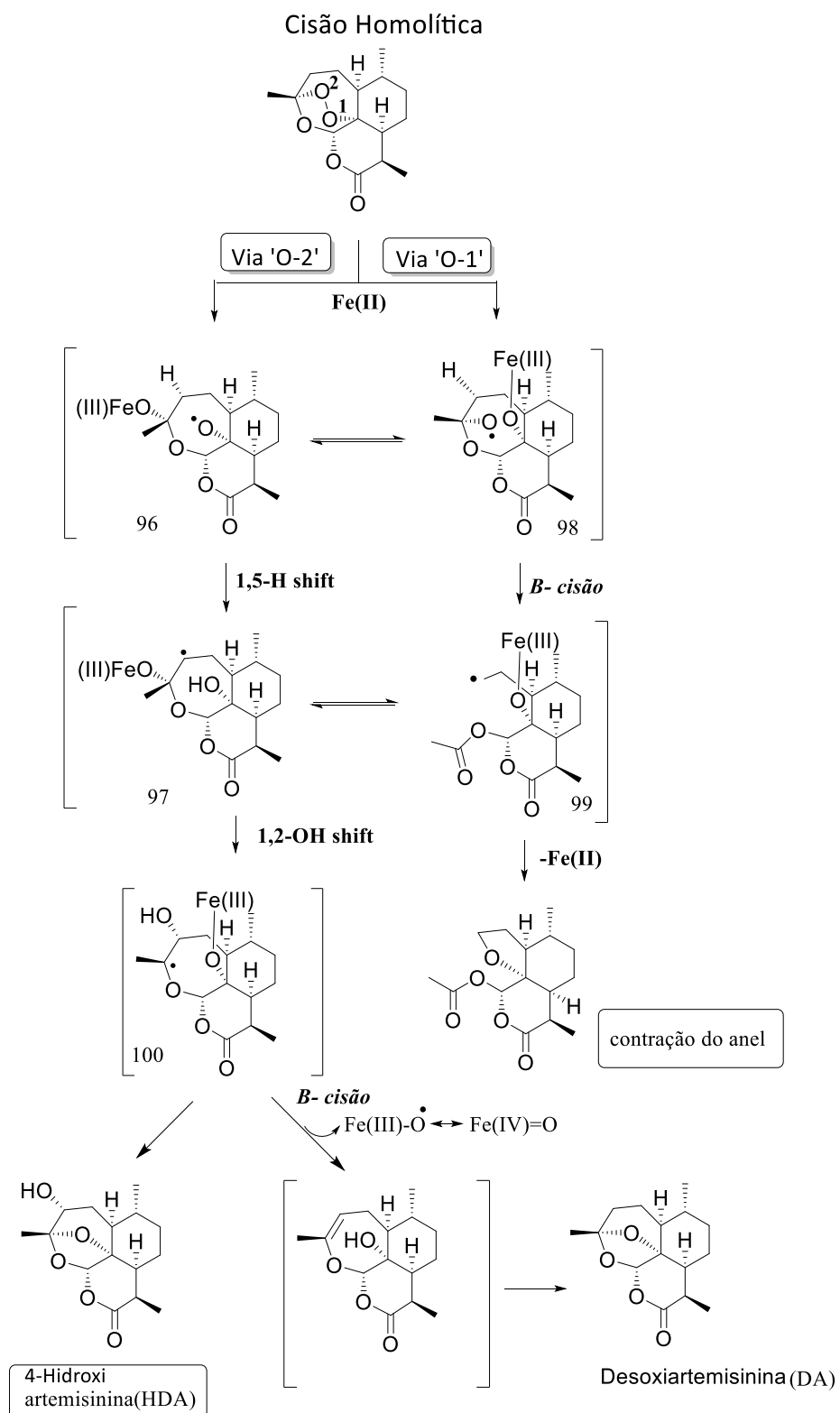
Foram propostas algumas hipóteses de mecanismos de toxicidade para fundamentar a teratogenicidade dos derivados endoperóxídicos. De uma forma geral as propostas envolvem a bioativação da ponte peróxídica pelo ferro livre ou hémico, tal como proposto para o mecanismo de ação contra o parasita, assumindo-se que a ligação peróxido é o toxóforo, na avaliação de toxicidade, e o farmacóforo, na avaliação da

atividade antimalárica. Como anteriormente referido, a ativação do peróxido pode originar uma clivagem homolítica da ponte endoperóxídica, gerando espécies reativas capazes de desencadear vários processos, como por exemplo stress oxidativo e peroxidação lipídica das membranas celulares (Esquema 10.2.1), e também de alterar significativamente a estrutura de biomoléculas essenciais, como proteínas ou o ADN. [56]



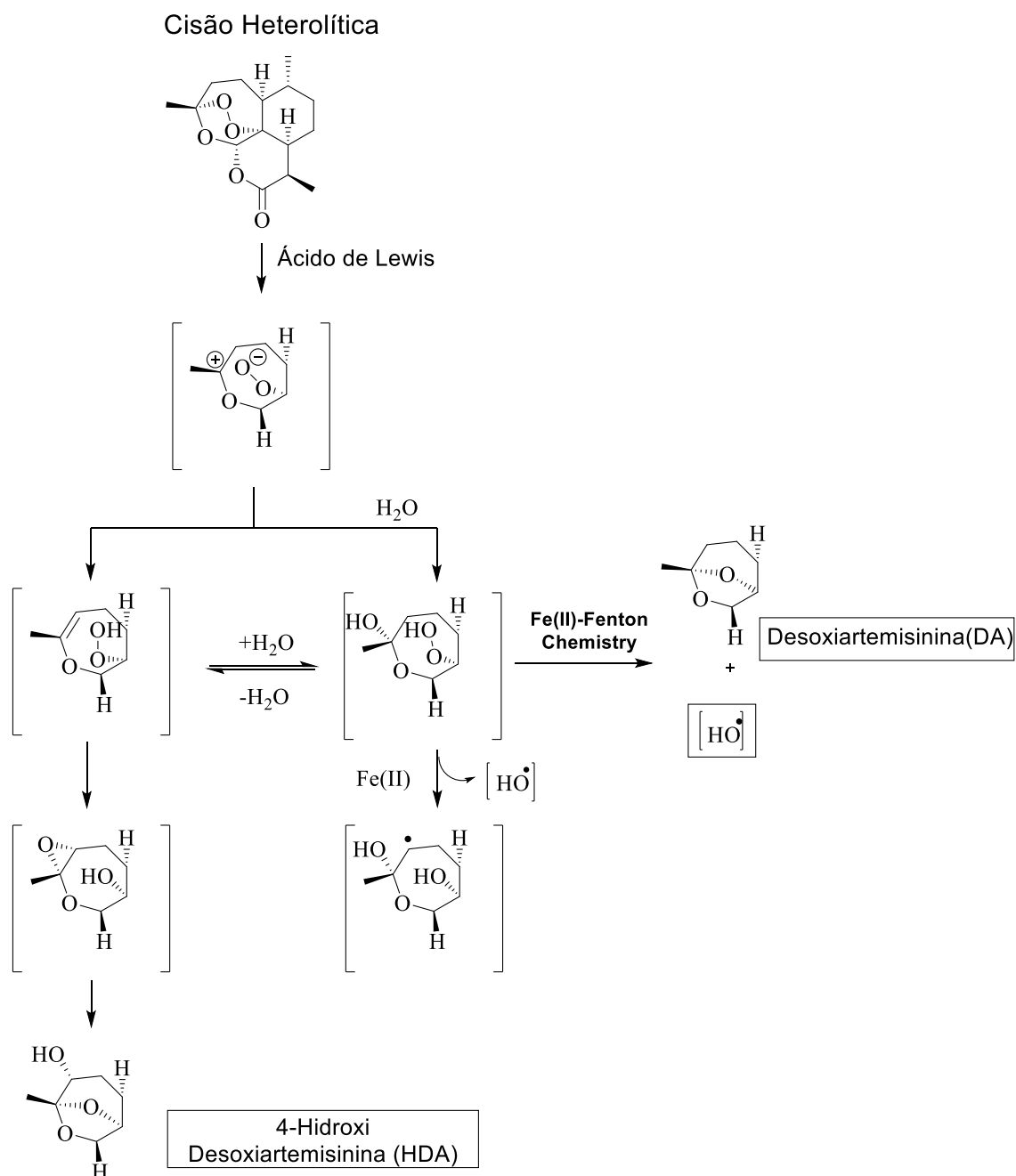
Esquema 10.2.1. Representação esquemática dos processos que conduzem a peroxidação lipídica induzida por artemisinina.

Assume-se que a cisão homolítica (Esquema 10.2.2) conduz à formação de radicais centrados em oxigénio, que posteriormente rearranjam, formando radicais centrados em carbono, primário ou secundário. As evidências destas vias mecanísticas resultaram de estudos biomiméticos de degradação com ferro da artemisinina, nos quais ambos os intermediários foram submetidos a técnicas de *spin-trapping* e os respetivos adutos isolados, comprovando a formação de radicais centrados em carbono primário e secundário. [61- 63]



Esquema 10.2.2. Representação esquemática do mecanismo de clivagem homolítica do farmacóforo endoperóxido.

Outra via de ativação dos peróxidos, proposta por Meunier e colaboradores, envolve cisão heterolítica do trioxano (Esquema 10.2.3), originando hidroperóxidos insaturados, precursores de radicais hidroxilo e promovendo a formação de várias espécies radicalares de oxigênio (ROS). [65-67]



Esquema 10.2.3. Representação esquemática o mecanismo de clivagem heterolítica da ponte endoperóxídica, catalisada pelo Fe(II).

Um outro mecanismo possível de teratogenicidade envolve a interação de peroxidases com os grupos hidroxilo resultantes da abertura do anel contendo o endoperóxido, promovendo a formação de espécies radicalares de oxigénio, com elevada capacidade de oxidação.

Estas espécies radicalares podem levar à oxidação ou à alquilação de biomoléculas estruturais e essenciais para o desenvolvimento embrionário, tais como proteínas vitais ou mesmo o ADN. Essas alterações podem ser irreversíveis, comprometendo a funcionalidade das moléculas envolvidas e podendo conduzir à morte celular. Considerando a elevada reatividade e o baixo tempo de vida destas espécies, que são por isso rapidamente extintas, é credível considerar que se formem no próprio sistema embrionário para que os efeitos embriotóxicos se possam manifestar. [98, 99]

Assim, os mecanismos de toxicidade propostos vão de encontro aos mecanismos propostos e observados, tanto ao nível da ação destes compostos enquanto agentes antiparasitários, como na sua ação indutora de apoptose em células tumorais, sendo detonados pela ativação *in situ* do farmacóforo/toxóforo que está dependente da presença de Fe(II). [100]

11. O projeto ARTEMIP e a atualização do estado da arte

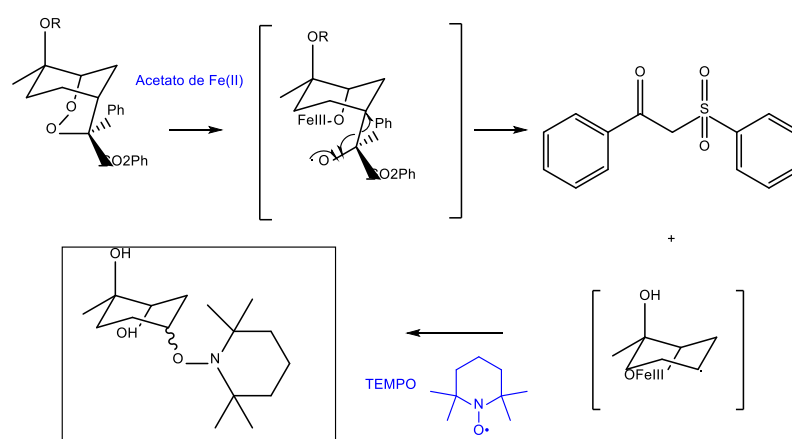
Com vista a aprofundar os estudos mecanísticos relacionados com artemisininas e outros fármacos do quimiotipo endoperóxídico no tratamento da malária durante a gravidez, vários grupos com valências complementares e ativos na investigação em malária organizaram-se num consórcio, que incluiu também a OMS, e propuseram um projecto conjunto intitulado ARTEMIP – ‘The safety pharmacology of Artemisinins when used to reverse pathophysiology of malaria in pregnancy’. [101] Os objectivos e tarefas foram definidos consoantes as diferentes especializações e valências dos grupos envolvidos.

Nesta colaboração pretendeu-se proceder à comparação química e bioquímica de compostos semi-sintéticos derivados de artemisinina, tais como o artesunato, e de novos endoperóxidos com atividade antimalárica, de origem sintética, tais como trioxolanos, e

assim perceber e antecipar qualquer efeito tóxico ou teratogénico do farmacóforo desta nova classe de compostos. Em paralelo, também se propôs o estudo de agentes teratogénicos conhecidos, como a fenitoína, como termo de comparação.

De realçar que, nesta colaboração o grupo de investigação em Reatividade Orgânica e Química Medicinal do Centro de Ciências do Mar do Algarve, liderado pela Professora M^o de Lurdes Cristiano, e ao qual a autora desta monografia pertencia, esteve envolvido no primeiro objetivo do projeto, relativo à reparação de compostos endoperóxidos com potencial antimalárico, com variedade estrutural, semi-sintéticos e sintéticos, para serem usados como sondas em estudos subsequentes de avaliação da embriotoxicidade e teratogenicidade. Foram preparadas sondas fluorescentes, sondas biotínidas e sondas radioativas a partir de peróxidos com atividade antimalárica selecionados. Estas sondas foram seguidamente usadas, por exemplo em estudos de afinidade e de bioacumulação.

A base mecanística proposta neste projeto para a embriotoxicidade dos compostos em estudo, dando continuidade a estudos prévios desenvolvidos pelos diferentes grupos, passa pela formação de espécies radiculares, tal como referido anteriormente, e sua interação em processos vitais que podem conduzir a apoptose celular. Também no caso dos endoperóxidos sintéticos, estudos biomiméticos com Fe(II) e de ‘EPR spin-trapping’ desenvolvidos pelo grupo, confirmaram a formação de adutos resultantes de intermediários radiculares (Figura 11.1.).



Esquema 11.1. Esquema representativo do processo de ‘spin-trapping’ de um intermediário endoperóxido radicalar. [102]

11.1. Informação relevante ARTEMIP^[101]

O projeto ARTEMIP forneceu dados muito relevantes relativamente aos mecanismos de toxicidade de peróxidos e atualização do estado da arte:

- A ponte peroxídica representa o farmacóforo e o toxóforo, tanto nas artemisininas como nos ozonídeos sintéticos, sendo a atividade biológica destes compostos dependente da sua presença, facto comprovado quando comparada a atividade dos peróxidos com a atividade dos compostos desoxigenados correspondentes, também preparados no grupo de ROQM do CCMAR, e que serviram como controlos negativos.
- Verificou-se a formação de adutos de espécies radicalares centradas em carbono e concomitante aumento de stress oxidativo, como base na toxicidade destes compostos.
- Foi possível confirmar que a embriotoxicidade dos endoperóxidos testados se centra na depleção de eritrócitos. A consequente anemia pode levar a uma situação de hipoxia tecidual e à morte celular. Dependendo da severidade da anemia, pode afetar o desenvolvimento fetal ou levar à morte do embrião.
- Dos estudos *in vivo* ad hoc, em ratos, definiu-se um intervalo de sensibilidade do embrião às artemisininas, compreendido entre o 9º e o 14º dia após gestação (AG); nos dias 9 e 10 AG observaram-se malformações ao nível cardiovascular dos membros; tratamentos após o 15º dia AG não conduziram a impacto observável no desenvolvimento fetal.
- A embriotoxicidade não foi específica em relação à espécie, e o alvo da DHA são eritrócitos primitivos, metabolicamente ativos, tanto no rato como em rãs.
- A mitocôndria representa o sítio de ação sub-celular nos eritrócitos.
- Relativamente ao mecanismo de ação, confirmou-se que apenas os fármacos endoperóxídicos derivados de artemisinina com atividade antiplasmodial interferiam com o desenvolvimento dos eritrócitos.
- Os novos peróxidos sintéticos mostraram que as concentrações inibitórias para o *Plasmodium* eram distintas das concentrações inibitórias para os eritroblastos, o que poderá ser promissor e traduzir-se num aumento da margem de segurança dos mesmos. Contudo, ainda existe toxicidade associada a estes novos candidatos a fármacos, pelo que ainda não é seguro excluir qualquer risco na sua administração.

- Deste estudo antecipa-se que a exposição de 48 horas aos peróxidos, numa fase crítica do desenvolvimento dos eritrócitos de aproximadamente 5 dias em ratos e xenopus, afeta significativamente os glóbulos vermelhos embrionários; já a exposição aos fármacos durante algumas horas, após um período de desenvolvimento eritrocítico de pelo menos 28 dias em humanos, não provoca os mesmos danos. Mais informação relevante sobre o desenvolvimento dos eritrócitos em embriões humanos é absolutamente crucial, para se poderem retirar mais conclusões.
- Pode afirmar-se que o período crítico no desenvolvimento da eritropoiese em ratos é de 3 dias e que o correspondente em humanos é de 10 a 14 dias. O facto deste ser mais extenso deve ser suficiente para reduzir a sensibilidade induzida pelas artemisininas durante a sua exposição de 3 dias, mas não existem ainda dados biológicos suficientes para reforçar esta hipótese e excluir a hipótese de embriotoxicidade.

Devido ao envolvimento da OMS como beneficiário no ARTEMIP, a informação gerada neste projeto pode ter impacto na recomendação do uso de antimaláricos durante a gravidez. A observação de que a ativação da ponte endoperóxídica em todos os compostos analisados é responsável quer pela sua atividade como antimaláricos quer pela sua toxicidade, antevê que vá ser difícil dissociar estas duas. O mesmo facto compromete o uso destes fármacos durante a gravidez. Assim, a recomendação da OMS de evitar a terapêutica antimalárica com artemisininas durante o primeiro trimestre de gravidez mantém-se. Mais dados serão necessários para traçar um perfil seguro dos mesmos compostos para a terapêutica durante o restante período de gravidez, mesmo numa abordagem de ACT. ^[101]

12. Conclusão

Em conclusão, a artemisinina e os seus derivados continuam a ser uma opção válida para o tratamento da malária, especialmente numa abordagem de terapia de combinação. Da mesma forma e numa perspetiva ainda mais promissora, alguns dos derivados endoperóxídicos sintéticos apresentam excelente atividade antimalárica e propriedades farmacocinéticas superiores aos artemisinínicos, para além de serem de fácil

preparação. Verificou-se que os tetraoxanos apresentam maior estabilidade metabólica que os respetivos trioxanos e trioxolanos, podendo afirmar-se que os tetraoxanos constituem a sub-classe mais prometedora, na classe dos endoperóxidos com atividade antiplasmodial.

Aparentemente, as artemisininas e os derivados endoperóxídicos sintéticos partilham o mesmo mecanismo de ação antiplasmodial, baseado na formação de espécies radicalares reativas após ativação do centro endoperóxídico por Fe(II) livre ou hémico. Tais espécies interferem com processos essenciais para a sobrevivência do *Plasmodium*, comprometendo assim a mesma.

Estas espécies responsáveis pela atividade desta classe de fármacos são também responsáveis pela sua toxicidade, como consequência de uma interação nociva com estruturas moleculares e celulares do hospedeiro.

É importante referir que essa toxicidade, das artemisininas e provavelmente dos derivados endoperóxídicos sintéticos, deverá estar relacionada com o perfil farmacocinético dos diferentes compostos e seus modos de administração, fatores determinantes para a extensão da exposição aos seus metabolitos.

Perante as observações e na ausência de mais dados relativos à embriotoxicidade das artemisininas, mantém-se a recomendação da sua utilização apenas nos últimos trimestres de gravidez.

O facto de por um lado as espécies radicalares resultantes da ativação destes fármacos serem responsáveis pela atividade biológica dos mesmos e por outro comprometerem a sua utilização pela potencial toxicidade gerada, é difícil de dissociar e cabe aos investigadores desenvolver estratégias terapêuticas com abordagens cada vez mais específicas e seletivas.

Mais estudos terão de ser efetuados em relação à atividade/toxicidade desta classe de fármacos, e uma maior farmacovigilância terá de ter lugar para obter mais evidências e dados mais conclusivos relativamente ao uso de derivados endoperóxídicos no tratamento da malária e a sua implicação em termos de toxicidade.

Bibliografia

- [1] Nosten F., White N. J., ‘Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria.’, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2007, 77, 181 – 192.
- [2] Park B. K., O'Neill P. M., Maggs J. L., Pirmohamed M., ‘Safety Assessment of peroxide antimalarials: clinical and chemical perspectives.’ *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1998, 46, 521–529.
- [3] WHO, Guidelines for the Treatment of Malaria, 2nd Edition, 2010, whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547925_eng.pdf.
- [4] Eckstein-Ludwig U., Webb R. J., Van Goethem I. D., East J. M., Lee A. G., Kimura M., O'Neill P. M., Bray P. G., Ward S. A., Krishna S., ‘Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum.’, *Nature*, 2003, 424, 957–961.
- [5] P. M. O'Neill, Barton, V. E, Ward, S. A., *Molecules*, ‘The Molecular Mechanism of Action of Artemisinin—The Debate Continues.’ 2010, 15, 1705-1721.
- [6] A. E. Mercer, Maggs, J. L., Sun, X., Cohen, G. M., Chadwick, J., O'Neill, P. M., Park, B. K., *J. Biol. Chem.*, ‘Evidence for the Involvement of Carbon-centered Radicals in the Induction of Apoptotic Cell Death by Artemisinin Compounds’, 2007, 282(13), 9372-9382.
- [7] Clark R. L., *Reprod. Toxicol.*, ‘Embryotoxicity of the artemisinin antimalarials and potential consequences for use in women in the first trimester.’, 2009, 28, 285–296.
- [8] Clark R. L., White T. E., Clode S. A., Gaunt I., Winstanley P., Ward S. A. , *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.*, ‘Developmental toxicity of artesunate and an artesunate combination in the rat and rabbit.’, 2004, 71(6), 380–394.
- [9] Toovey S., *Toxicol. Lett.*, ‘Are currently deployed artemisinins neurotoxic?’, 2006, 166(2), 95–104.
- [10] <http://www.who.int/gho/malaria/en/>
- [11] T. C. Cheng, 'General Parasitology', second edition, 1986, 194-227.
- [12] N. Kumar, *International Journal for Parasitology*, ‘Malaria: progress, problems and plans in the genomic era.’, 2002, 32, 1537.
- [13] R. G. Ridley, *Nature*, ‘Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs’, 2002, 415, 686-693.
- [14] C, Ekwaru JP, ter Kuile FO., ‘Insecticide-treated nets for preventing malaria in pregnancy.’, *Cochrane Database Syst Rev.* 2006:CD00375.
- [15] http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/wmr2012_no_profiles.pdf
- [16] J. Wiesner, R. Ortmann, H. Jomaa and M. Schlitzer, *Angewandte Chemie Int. Ed., New Antimalarial Drugs†*.’, 2003, 42, 5274-5293.

- [17]. D. Greenwood, 857-872., *J. Antimicrob. Chemother.*, 'Conflicts of interest: the genesis of synthetic antimalarial agents in peace and war.', 1995, 36, 857-872.
- [18] R. Haynes, *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 'Artemisinin and derivatives: the future for malaria treatment?', 2001, 14, 719-726.
- [19] K. C. Kain, G. D. Shanks and J. S. Keystone, *Clin. Infect. Dis.*, 'Malaria chemoprophylaxis in the age of drug resistance. I. Currently recommended drug regimens.', 2001, 33(2), 226-234.
- [20] P. Newton and N. White, *Annu. Rev. Med.*, 'Malaria: new developments in treatment and prevention.' 1999, 50, 179-192.
- [21] T. Wellems and C. V. Plowe, *J. Inf. Dis.*, 'Chloroquine-resistant malaria', 2001, 184, 770-776.
- [22] R. G. Ridley, *Nature*, 'Malaria: to kill a parasite', 2003, 424, 887-889.
- [23] D. L. Klayman, *Science*, 'Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China.', 1985, 228, 1049-1055.
- [24] D.M. & Šolaja, *J. Serb. Chem. Soc.*, 'Antimalarial peroxides.', 2009, 74 (11): 1155 – 1193.
- [25] Rosenthal, Philip J., *The New England Journal of Medicine*, 'Artesunate for the Treatment of Severe Falciparum Malaria', 2010, 358 (17): 1829-1836.
- [26] J. P. Jeyadevan, P. G. Bray, J. Chadwick, A. E. Mercer, A. Byrne, S. A. Ward, K. Park, D. P. Williams, R. Cosstick, J. Davies, A. P. Higson, E. Irving, G. H. Posner and P. M. O'Neill, *J. Med. Chem.*, 'Antimalarial and antitumor evaluation of novel C-10 non-acetal dimers of 10beta-(2-hydroxyethyl)deoxoartemisinin.', 2004, 47, 1290-1298.
- [27] G. H. Posner, A. J. McRiner, I.-H. Paik, S. Sur, K. Borstnik, S. Xie, T. A. Shapiro, A. Alagbala and B. Foster, *J. Med. Chem.*, 2004, 47, 1299.
- [28] <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241547925/en/>
- [29] A. Robert, M. Boularan and B. Meunier, *Comptes Rendus Acad. Sci. Ser.II-B*, 'Interaction of artemisinin (qinghaosu) with the tetraphenylporphyrinato-manganese(II) complex', 1997, 324, 59-66.
- [30] A. Robert and B. Meunier, *Chem. Soc. Rev.*, 'Is alkylation the main mechanism of action of the antimalarial drug artemisinin?', 1998, 27, 273-274.
- [31] J. Cazelles, A. Robert and B. Meunier, *J. Org. Chem.*, 'Alkylating Capacity and Reaction Products of Antimalarial Trioxanes after Activation by a Heme Model', 2002, 67, 609-619
- [32] G. H. Posner, C. H. Oh, D. S. Wang, L. Gerena and W. K. Milhous, *J. Med. Chem.*, 'Mechanism-Based Design, Synthesis, and in vitro Antimalarial Testing of New 4-Methylated Trioxanes Structurally Related to Artemisinin: The Importance of a Carbon-Centered Radical for Antimalarial Activity', 1994, 37, 1256-1258.
- [33] A. Robert, Y. Coppel and B. Meunier, *Chem. Commun.*, 'Alkylation of heme by the antimalarial drug artemisinin.' 2002, 414-415.

- [34] F. Nosten, C. Luxemburger, F. O. terKuile, C. Woodrow, J. P. Eh, T. Chongsuphajaisiddhi, N. J. White, *J. Infect. Dis.*, 'Treatment of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria with 3-day artesunate-mefloquine combination.' 1994, 170, 971-977.
- [35] A. Brokman, R. N. Price, M. van Vugt, D. G. Heppner, D. Walsh, P. Sookto, T. Wimonwattrawatee, S. Looareesuwan, N. J. White, F. Nosten, *Trans. R. Soc. Trop. Med.*, '*Plasmodium falciparum* antimalarial drug susceptibility on the north-western border of Thailand during five years of extensive use of artesunate-mefloquine.', 2000, 94, 537-544.
- [36] M. H. Alin, A. Bjorman and W. H. Wernsdorfer, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 'Synergism of benflumetol and artemether in *Plasmodium falciparum*.' 1999, 61-(3), 439-445.
- [37] L. Seidlein, K. Bojang, P. Jones, S. Jaffar, M. Pinder, S. Obaro, T. Doherty, M. Haywood, G. Snounou, B. Gemperli, I. Gathmann, C. Royce, K. McAdam and B. Greenwood, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 'A randomized controlled trial of artemether/benflumetol, a new antimalarial and pyrimethamine/sulfadoxine in the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in African children.', 1998, 58, 638-644.
- [38] C. Hatz, S. Abdulla, R. Mull, D. Schellenberg, I. Gathmann, P. Kibatala, H.-P. Beck, M. Tanner and C. Royce, *Trop. Med. Int. Health*, 'Efficacy and safety of CGP 56697 (artemether and benflumetol) compared with chloroquine to treat acute *falciparum* malaria in Tanzanian children aged 1-5 years.', 1998, 3(6), 498-504.
- [39] Nuna Araújo, PhD Thesis - New Concepts for Malaria Chemotherapy and Approaches to Improved Antimalarial Endoperoxides., Chapter 2 – 'Synthesis of new Trioxaquinines and Trioxolaquinines', University of Liverpool, 2004, 50-59.
- [40] Y. L. Hong, Y. Z. Yang, and S. R. Meshnick, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 'The interaction of artemisinin with malarial hemozoin.', 1994, 63, 121-128.
- [41] F. Zhang, D. K. Gosser, and S. R. Meshnick, *Biochem. Pharmacol.*, 'Hemin-catalyzed decomposition of artemisinin (qinghaosu).', 1992, 43, 1805-1809.
- [42] G. H. Posner, C. H. Oh, D. S. Wang, L. Gerena and W. K. Milhous, *J. Med. Chem.*, 'Mechanism-Based Design, Synthesis, and in vitro Antimalarial Testing of New 4-Methylated Trioxanes Structurally Related to Artemisinin: The Importance of a Carbon-Centered Radical for Antimalarial Activity', 1994, 37, 1256-1258.
- [43] P. G. Bray, O. Janneth, K. J. Raynes, M. Mungthin, H. Ginsburg and S. A. Ward, *J. Cell Biol.*, 'Cellular uptake of chloroquine is dependent on binding to ferriprotoporphyrin IX and is independent of NHE activity in *Plasmodium falciparum*.' 1999, 145(2), 363-376.
- [44] M. Mungthin, P. G. Bray, R. G. Ridley and S. A. Ward, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 'Central Role of Hemoglobin Degradation in Mechanisms of Action of 4-Aminoquinolines, Quinoline Methanols, and Phenanthrene Methanols.', 1998, 42, 2973-2977.
- [45] S. L. Fleck, B. L. Robinson, W. Peters, F. Thevin, Y. Boulard, C. Glenat, V. Caillard and I. Landau, *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, The chemotherapy of rodent malaria. LIII. 'Fenozan B07' (Fenozan-50F), a difluorinated 3,3'-spirocyclopentane 1,2,4-trioxane: comparison with some compounds of the artemisinin series. ' 1997, 91(1), 25-32.

- [46] G. H. Posner, H. B. Jeon, P. Ploypradith, I.-H. Paik, K. Bornstik, S. Xie, T. A. Shapiro, *J. Med. Chem.*, Orally active, water-soluble antimalarial 3-aryltrioxanes: short synthesis and preclinical efficacy testing in rodents., 2002, 45(18), 3824-3828.
- [47] J. L. Vennerstrom, Y. X. Dong, J. Chollet and H. Matilde, United States Patent; Medicines for Malaria Venture (MMV): US 6, 'Spiro and Dispiro 1,2,4-Trioxolane Antimalarials.', 2002, 486, 199B1.
- [48] Zhou L., Alker A., Ruf A., Wang X., Chiu F.C., Morizzi J., Charman S.A., Charman W.N., Scheurer C., Wittlin S., Dong Y., Hunziker D., Vennerstrom J.L., *Bioorg Med Chem Lett.*, 'Characterization of the two major CYP450 metabolites of ozonide (1,2,4-trioxolane) OZ277', 2008, 18(5), 1555-1558.
- [49] Dong Y., Wittlin S., Sriraghavan K., Chollet J., Charman S.A., Charman W.N., Scheurer C., Urwyler H., Santo Tomas J., Snyder C., Creek D.J, Morizzi J., Koltun M., Matile H., Wang X., Padmanilayam M., Tang Y., Dorn A., Brun R., Vennerstrom J.L., *J Med Chem.*, 'The structure-activity relationship of the antimalarial ozonide arterolane (OZ277).', 2010, 53(1), 481-491.
- [50] Vennerstrom J.L., *Proc Natl Acad Sci USA* Mar 15, 'Synthetic ozonide drug candidate OZ439 offers new hope for a single-dose cure of uncomplicated malaria.', 2011, 108(11), 4400-4405.
- [51] Joerg J. Moehrle, Stephan Duparc, Christoph Siethoff, Paul L .M. Giersbergen, J. Carl Craft, Sarah Arbe-Barnes, Susan A. Charman, Maria Gutierrez, Sergio Wittlin, and Jonathan L. Vennerstrom, *Br J Clin Pharmacol*, 'First-in-man safety and pharmacokinetics of synthetic ozonide OZ439 demonstrates an improved exposure profile relative to other peroxide antimalarials.', 2013, 75(2), 524-537.
- [52] Wang X., Dong Y., Wittlin S., Charman S.A., Chiu F.C., Chollet J., Katneni K., Mannila J., Morizzi J., Ryan E., Scheurer C., Steuten J., Santo Tomas J., Snyder C., Vennerstrom J.L., *J Med Chem.*, 'Comparative antimalarial activities and ADME profiles of ozonides (1,2,4-trioxolanes) OZ277, OZ439, and their 1,2-dioxolane, 1,2,4-trioxane, and 1,2,4,5-tetraoxane isosteres.', 2013, 56(6), 2547-2555.
- [53] J. L. Vennerstrom, H.-N. Fu, W. Y. Ellis, A. L. Ager Jr, J. K. Wood, S. L. Anderson, L. Gerena and W. K. Milhous, *J. Med. Chem.*, 'Dispiro-1,2,4,5-tetraoxanes: a new class of antimalarial peroxides', 1992, 35, 3023-3027.
- [54] H. S. Kim, Y. Nagai, K. Ono, K. Begum, Y. Wataya, Y. Hamada, K. Tsuchiya, A. Masuyama, M. Nojima, K. J. McCullough, *J. Med. Chem.*, 'Synthesis and antimalarial activity of novel medium-sized 1,2,4,5-tetraoxacycloalkanes.', 2001, 44, 2357-2361.
- [55] O'Neill PM, Amewu RK, Nixon GL, Bousejra ElGarah F, Mungthin M, Chadwick J, Shone AE, Vivas L, Lander H, Barton V, Muangnoicharoen S, Bray PG, Davies J, Park BK, Wittlin S, Brun R, Preschel M, Zhang K, Ward SA., *Angew Chem Int Ed Engl.*, 'Identification of a 1,2,4,5-tetraoxane antimalarial drug-development candidate (RKA 182) with superior properties to the semisynthetic artemisinins.', 2010 , 49(33), 5693-5697.
- [56] P. A. Berman and P. A. Adam, *Free Radical. Biol. Med.*, 'Artemisinin enhances heme-catalysed oxidation of lipid membranes.', 1997, 22(7), 1283-1288.

- [57] A. V. Pandey, B. L. Tekwani, R. L. Singh and V. S. Chauhan, *J. Biol. Chem.*, 'Artemisinin, an endoperoxide antimalarial, disrupts the hemoglobin catabolism and heme detoxification systems in malarial parasite.', 1999, 274(27), 19383-19388.
- [58] J. Bhisutthibhan, M. A. Philbert, H. Fujioka, M. Aikawa and S. R. Meshnick, *Eur. J. Cell Biol.*, The Plasmodium falciparum translationally controlled tumor protein: subcellular localization and calcium binding. ', 1999, 78(9), 665-670.
- [59] J. Bhisutthibhan and S. R. Meshnick, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 'Immunoprecipitation of [3H]Dihydroartemisinin Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) Adducts from Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes by Using Anti-TCTP Antibodies.', 2001, 45(8), 2397-2399.
- [60] A. V. Pandey, V. K. Babbarwal, J. N. Okoyeh, R. M. Joshi, S. K. Puri, R. L. Singh and V. S. Chauhan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 'Hemozoin formation in malaria: a two-step process involving histidine-rich proteins and lipids.', 2003, 308(4), 736-743.
- [61] G. H. Posner and C. H. Oh, *Trends in Parasitology*, G. H. Posner and C. H. Oh, *Trends in Parasitology*, 'A regiospecifically oxygen-18 labelled 1,2,4-trioxane: a simple chemical model system to probe the mechanism(s) for the antimalarial activity of artemisinin (qinghaosu). ', 1992, 114, 8328-8329.
- [62] W. M. Wu, Y. K. Wu, Y. L. Wu, Z. J. Yao, C. M. Zhou, Y. Li, F. Shan, *J. Am. Chem. Soc.*, Unified Mechanistic Framework for the Fe(II)-Induced Cleavage of Qinghaosu and Derivatives/Analogues. The First Spin-Trapping Evidence for the Previously Postulated Secondary C-4 Radical.', 1998, 120, 3316-3325.
- [63] P. M. O'Neill, L. P. Bishop, N. L. Searle, J. L. Maggs, R. C. Storr, *J. Org. Chem.*, 'Biomimetic Fe(II)-Mediated Degradation of Arteflene (Ro-42-1611). The First EPR Spin-Trapping Evidence for the Previously Postulated Secondary Carbon-Centered Cyclohexyl Radical', 2000, 65(5), 1578-1582.
- [64] F. Nosten, M. Van Vugt, B. J. Angus, R. N. Price, C. Mann, J. A. Simpson, C. Poletto, Saw Eh Htoo, S. Looareesuwan, N. J. White, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 'A CASE-CONTROL AUDITORY EVALUATION OF PATIENTS TREATED WITH ARTEMISININ DERIVATIVES FOR MULTIDRUG-RESISTANT PLASMODIUM FALCIPARUM MALARIA.', 2000, 62(1), 65-69.
- [65] F. Nosten, Ric Price, Michele Van Vugt, Lucy Phaipun, Christine Luxemburger, Julie Simpson, Rose Mcgready, Feiko Ter Kuile, Am Kham, Tan Chongsuphajaisiddhi, Nicholas J. White, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 'ADVERSE EFFECTS IN PATIENTS WITH ACUTE FALCIPARUM MALARIA TREATED WITH ARTEMISININ DERIVATIVES.', 1999, 60(4), 547-555.
- [66] Brewer T.G., Grate S.J., Peggins JO, Weina P.J., Petras J.M., Levine B.S., Heiffer M.H., Schuster B.G. *Am J Trop Med Hyg.*, 'Fatal neurotoxicity of arteether and artemether.', 1994, 51(3), 251-9.
- [67] David L. Wesche, Mark A. Decoster, Frank C. Tortella, Thomas G. Brewer, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 'Neurotoxicity of artemisinin analogs in vitro.', 1994, 38(8), 1813-1819.
- [68] McLean WG, Ward SA., *Med Trop* , 'In vitro neurotoxicity of artemisinin derivatives.', 1998, 58(3 suppl), 28-31.

- [69] http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Complete_neuron_cell_diagram_pt.svg
- [70] Gabriele Schmuck, Elke Roehrdanz, Richard K. Haynes and Regine Kahl, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 'Neurotoxic Mode of Action of Artemisinin.', 2002, 46(3), 821–827.
- [71] Fishwick J., Edwards G., Ward S.A., McLean W.G., 'Morphological and immunocytochemical effects of dihydroartemisinin on differentiating NB2a neuroblastoma cells.', 1998, 19(3), 393-403.
- [72] W.Graham McLean, Sharon L. Smith, Claire J. Sadler, Charlotte C. Dodd, Geoffrey Edwards, Stephen A. Ward, B.Kevin Park, *Biochemical Pharmacology*, 'The free radical-mediated neurotoxicity of artemisinin derivatives in vitro.', 2001, 61, 409–416.
- [73] Smith S.L., Maggs J.L., Edwards G., Ward S.A., Park B.K., McLean W.G., *Neurotoxicology*, 'The role of iron in neurotoxicity: a study of novel antimalarial drugs.', 1998, 19, 557-559.
- [74] Fishwick J., McLean W.G., Edwards G., Ward S.A., *ChemBiol Interact.*, 'The toxicity of artemisinin and related compounds on neuronal and glial cells in culture.', 1995, 96, 263-271.
- [75] Smith S.L., Fishwick J., McLean W.G., Edwards G., Ward S.A., *BiochemPharmacol.*, 'Enhanced in vitro neurotoxicity of artemisinin derivatives in the presence of haemin.', 1997, 53(1), 5-10.
- [76] Toufigh Gordi, Eve-Irene Lepist, *Toxicology Letters*, Artemisinin derivatives: toxic for laboratory animals, safe for humans? ', 2004, 147(2), 99–107.
- [77] Efferth T., Kaina B., *Crit Rev Toxicol.*, 'Toxicity of the antimalarial artemisinin and its derivatives.', 2010, 40(5), 405-421.
- [78] White NJ., *Drug Resistance Updates*, Preventing antimalarial drug resistance through combinations. ', 1998, 1, 3-9.
- [79] Desai M., *Lancet infectious diseases*, 'Epidemiology and burden of malaria in pregnancy.', 2007, 7(2), 93 - 104.
- [80] Steketee R.W., Nahlen B.L., Parise M.E., Menendez C., *Am J Trop Med Hyg.*, 'The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas.', 2001, 64(1-2 Suppl), 28-35.
- [81] Guyatt HL, Snow RW., *Clin Microbiol Rev.*, 'Impact of Malaria during Pregnancy on Low Birth Weight in Sub-Saharan Africa.', 2004, 17(4), 760-769.
- [82] ter Kuile F.O., Parise M.E., Verhoeff F.H., *et al*, *Am J Trop Med Hyg.*, 'The burden of co-infection with human immunodeficiency virus type 1 and malaria in pregnant women in sub-saharan Africa.', 2004, 71(2 Suppl), 41-54.
- [83] Brabin B., Maxwell S., Chimsuku L., *et al.*, *Parasitologia.*, 'A study of the consequences of malaria infection in pregnant women and their infants.', 1993, 35(suppl), 9-11.
- [84] Ekwaru J.P., ter Kuile F.O., *Cochrane Database Syst Rev*. 2006:CD003755.
- [85] Garner P., Gulmezoglu A.M., *Cochrane Database Syst Rev*. 2006:CD000169.

- [86] Chen L.J., Wang M.Y., Sun W.K., Liu M.Z., Zhongguo Yao Li Xue Bao., 'Embryotoxicity and teratogenicity studies on artemether in mice, rats and rabbits.', 1984, 5, 118-122.
- [87] Li Z.L., Zhong Yao Tong Bao., 'Teratogenicity of sodium artesunate.', 1988, 13(4):42-4, 63-4.
- [88] Xu J.H., Zhang YP., Yao Xue Xue Bao., 'Contraceptual effects of dihydroartemisinin and artesunate.' 1996, 311(9), 657-661.
- [89] Longo M., Zanoncelli S., Torre P.D., *et al.*, *Reprod Toxicol.*, In vivo and in vitro investigations of the effects of the antimalarial drug dihydroartemisinin (DHA) on rat embryos.', 2006, 22(4), 797-810.
- [90] White T.E., Bushdid P.B., Ritter S., Laffan S.B., Clark R.L., *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.*, 'Artesunate-induced depletion of embryonic erythroblasts precedes embryoletality and teratogenicity in vivo.', 2006, 77, 413-429.
- [91] Clark R.L., White T.E.K., Clode S., Gaunt I., Winstanley P.A., Ward S., *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology.*, Developmental toxicity of artesunate and an artesunate combination in the rat and rabbit ', 2004, 71(6), 380-394.
- [92] White T.C.S., Gaunt I., Ward S., Powell C. and Clark R., *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology.*', 2004;70, 265.
- [93] Clark R.L., Lerman SA, Cox EM, Gristwood WE, White TE, *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.*, 'Developmental toxicity of artesunate in the rat: comparison to other artemisinin, comparison of embryotoxicity and kinetics by oral and intravenous routes, and relationship to maternal reticulocyte count.', 2008, 83(4), 397-406.
- [94] Clark R.L., *Reproductive Toxicology*, 'Embryotoxicity of the artemisinin antimalarials and potential consequences for use in women in the first trimester.' 2009, 28(3),285-296.
- [95] Qigui Li and Peter J. Weina, *Molecules*, 'Severe Embryotoxicity of Artemisinin Derivatives in Experimental Animals, but Possibly Safe in Pregnant Women.', 2010, 15, 40-57.
- [96] Clark R.L., *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.*, 'Effects of artemisinins on reticulocyte count and relationship to possible embryotoxicity in confirmed and unconfirmed malarial patients.' 2012, 94(2), 61-75.
- [97] Manyando C., Kayentao K., D'Alessandro U., Okafor H.U., Juma E., Hamed K., Malar J., 'A systematic review of the safety and efficacy of artemether-lumefantrine against uncomplicated Plasmodium falciparum malaria during pregnancy. ', 2012, 11:141.
- [98] G. H. Posner and S. R. Meshnick, *Trends in Parasitology*, 'Radical mechanism of action of the artemisinin-type compounds.', 2001, 17(6), 266-267.
- [99] P. L. Olliaro, R. K. Haynes, B. Meunier and Y. Yuthavong, *Trends in Parasitology*, Possible modes of action of the artemisinin-type compounds.', 2001, 17(3), 122-126.

[100] Meshnick, S. R.; Taylor, T. E.; Kamchonwongpaisan, S. *Microbiological Reviews* Artemisinin and the Antimalarial Endoperoxides: from Herbal Remedy to Targeted Chemotherapy. , 1996, 60(2), 301-315.

[101] Peter Gibbons, Edite Verissimo, Nuna C Araujo, Victoria Barton, Gemma L Nixon, Richard K Amewu, James Chadwick, Paul A Stocks, Giancarlo A Biagini, Abhishek Srivastava, Philip J Rosenthal, Jiri Gut, Rita C Guedes, Rui Moreira, Raman Sharma, Neil Berry, M Lurdes S Cristiano, Alison E Shone, Stephen A Ward, Paul M O'Neill , *Journal Of Medicinal Chemistry*, Endoperoxide Carbonyl Falcipain 2/3 Inhibitor Hybrids: Toward Combination Chemotherapy of Malaria through a Single Chemical Entity . , 2010, 53(22),8202-6.

[102] http://cordis.europa.eu/publication/rcn/15303_en.html